



سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه چنل (*Rhizophora mucronata*) و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آن

وحیده عبدی: کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
ایمان سوری نژاد: دانشیار، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران (*نویسنده مسئول) sourinejad@hormozgan.ac.ir
مرتضی یوسف زادی: دانشیار، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

سنتز سبز،
نیترات نقره،
فناوری نانو،
گیاهان مانگرو،
باکتری گرم منفی

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۹

زمینه و هدف: توسعه روش‌های تولید نانوذرات که سازگار با محیط زیست و فاقد مواد سمی باشند، یکی از مهم‌ترین جنبه‌های علم نانوفناوری می‌باشد. نانوذرات نقره به دلیل خواص ضد میکروبی و ضدباکتریایی به‌طور گسترده در علوم پزشکی استفاده می‌شوند.

روش کار: در مطالعه پیش رو سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ، ساقه و ریشه گیاه مانگروی سواحل جنوب کشور به نام چنل *Rhizophora mucronata* و اثرات ضدباکتریایی آن بررسی شد.

یافته‌ها: از بین اندام‌های مختلف گیاه، عصاره برگ بیشترین مقدار سنتز نانوذرات نقره را نشان داد. طیف‌های اسپکتروسکوپی در طول موج ۴۲۰ نانومتر سنتز نانوذرات نقره را تایید کرد. آنالیز XRD نیز تشکیل نانوذرات نقره کریستالی را اثبات نمود. تصاویر TEM شکل و اندازه نانوذرات سنتز شده را کروی و ۱ تا ۸۰ نانومتر با میانگین ۳۲/۴۴ نانومتر نشان داد و بررسی FE-SEM نیز بیانگر اندازه ۱۰ تا ۱۹ نانومتر بود. طیف EDS حضور فلز نقره با بیشترین مقدار معادل ۷۳/۵ درصد را در نانوذرات نشان داد. نتایج طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز بیانگر حضور گروه‌های عاملی مانند الکل، حلقه آروماتیک، آلکان‌ها، گروه فنول و آلکیل‌هالیدها در فرآیند سنتز بود. در بررسی خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده، باکتری گرم مثبت *Bacillus cereus* با داشتن بیشترین مقدار هاله عدم رشد حساس‌ترین و باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* با کمترین مقدار هاله عدم رشد به‌عنوان مقاوم‌ترین باکتری مشخص شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از آن است که عصاره برگ گیاه چنل قادر به تولید زیستی نانوذرات نقره در محلول حاوی نیترات نقره در دمای اتاق با خاصیت ضد باکتریایی می‌باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: ستاد ویژه توسعه فناوری نانو

شیوه استناد به این مقاله:

Abdi V, Sourinejad I, Yousefzadi M. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizophora mucronata* plant aqueous extract and investigation of its antibacterial activity. Razi J Med Sci. 2019;26(4):9-21.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 1.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) صورت گرفته است.

Biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizophora mucronata* plant aqueous extract and investigation of its antibacterial activity

Vahideh Abdi, MSc, Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

Iman Sourinejad, Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran (*Corresponding author) sourinejad@hormozgan.ac.ir

Morteza Yousefzadi, Associate Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

Abstract

Background: The development of ecofriendly and non-toxic processes for synthesis of nanoparticles is one of the most important aspects of nanotechnology. Silver nanoparticles are widely used in medicine because of their antimicrobial and antibacterial properties.

Methods: Biosynthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the aqueous extract of leaf, stem and root of *Rhizophora mucronata* as the mangrove plant of southern coasts of Iran and its antibacterial activity was investigated.

Results: Leaf extract showed the maximum synthesis of AgNPs. UV-visible spectroscopy in 420 nm confirmed the synthesis of AgNPs. The crystalline nature of AgNPs was confirmed based on the XRD pattern. TEM images showed that the shape and size of nanoparticles was circle and in the range of 0 to 80 nm with the mean size of 32.44 nm. FE-SEM analysis showed nanoparticles with a size range from 10 to 19 nm. EDS spectrum confirmed the presence of silver in the nanoparticles with the maximum percentage of 73.5 %. FTIR indicated the presence of different functional groups like alcohol, aromatic loops, alkanes, phenol group and alkyl halides in the synthesis process. Gram-positive *Bacillus cereus* bacteria with the largest growth inhibition zone and gram-negative *pseudomonas aeruginosa* bacteria with the smallest growth inhibition zone were found the most sensitive and the most resistant bacteria, respectively.

Conclusion: Results indicate that *Rhizophora mucronata* leaf extract is capable of synthesizing silver nanoparticles in the solution of nitrate silver at room temperature with antibacterial activity.

Conflicts of interest: None

Funding: Iran Nanotechnology Innovation Council

Keywords

Green synthesis,
Silver nitrate,
Nanotechnology,
Mangrove plants, Gram-negative bacteria

Received: 09/12/2018

Accepted: 07/04/2019

Cite this article as:

Abdi V, Sourinejad I, Yousefzadi M. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizophora mucronata* plant aqueous extract and investigation of its antibacterial activity. Razi J Med Sci. 2019;26(4):9-21.

This work is published under [CC BY-NC-SA 1.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

استفاده از فشار، دما و انرژی زیاد در طی فرآیند واکنش است (۱). از این رو محققین درصدد جایگزین کردن روش‌های سازگار با محیط زیست، مقرون به صرفه و فاقد مواد شیمیایی که موسوم به سنتز سبز هستند می‌باشند (۱۳، ۱۱، ۷).

یکی از روش‌های تولید نانوذرات، تولید به روش زیستی است و توجه به این روش برای تولید نانوذرات رو به افزایش است (۱۴، ۱۳). در سال‌های اخیر سنتز زیستی نانوذرات به وسیله گیاهان و میکروارگانیسم‌ها به عنوان روش زیست سازگار و سبز مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. به نظر می‌رسد روش‌های زیستی برای سنتز نانوذرات فلزی با استفاده از عصاره‌های گیاهی جایگزین مناسبی برای روش‌های فیزیکی و شیمیایی باشند چرا که نقش بسیار مهم و قابل توجهی را در اصلاح مواد شیمیایی سمی از طریق احیای یون‌های فلزی ایفا می‌کنند (۱۵، ۱۲). سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از میکروارگانیسم‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و جلبک‌ها به جای روش‌های شیمیایی و فیزیکی مورد توجه می‌باشد (۱۶، ۷). روش سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از احیای یون‌های نقره به وسیله توده زیستی در مقایسه با روش‌های الکتروشیمیایی، فتوشیمیایی و یا میدان فراصوت روش نسبتاً ساده‌ای است، به عبارت دیگر اساس سنتز نانوذرات نقره احیای یون‌های نقره است. در این میان، گیاهان به علت سازگاری با محیط می‌توانند به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند، بدون اینکه منجر به بروز آسیب‌های زیست‌محیطی شود (۱۷-۱۹). عصاره این ارگانیسم‌ها، در فرآیند سنتز هم به عنوان عوامل احیاء کننده و هم عوامل پوشش‌دهنده نانوذرات نقره عمل می‌کنند به طوری که احیای یون‌های نقره از طریق مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، آمینواسیدها، آنزیم‌ها، آلکالوئیدها، تانن‌ها، فنولیک‌ها، ساپونین‌ها، کربوهیدرات‌ها، فلاونوئیدها و ویتامین‌ها که در عصاره‌های گیاهی وجود دارد به صورت سازگار با محیط زیست انجام می‌گیرد (۲۰، ۱۲). گیاهان مانگرو مجموعه‌ای از گیاهان شور پسند و

نانوفناوری حوزه‌ای از علوم جدید است که به سرعت در حال رشد می‌باشد و دارای کاربردهای وسیع و فراوان در علوم و صنایع مختلف است (۱-۳). در این فناوری تولید نانوذرات با اندازه، شکل و خواص متنوع و کنترل شده و پتانسیل استفاده از آن‌ها در خدمت به بشر مدنظر است (۴). نانوذرات به دلیل اندازه بسیار کوچک و نسبت سطح به حجم زیاد دارای خواص منحصر به فرد مکانیکی، نوری، الکتریکی، حرارتی، شیمیایی و مغناطیسی می‌باشند (۵، ۶). در بین انواع مختلف نانوذرات، نانوذرات نقره از فواید زیادی در زمینه‌های نانو فناوری، زیست نانو فناوری، پزشکی، صنعت، کشاورزی و مواد غذایی برخوردار هستند و دارای کاربردهای بالقوه در زندگی بشر می‌باشند (۷، ۸). یکی از پتانسیل‌های نانوذرات خاصیت ضد میکروبی آن‌ها می‌باشد. مطالعات بیانگر آن است که نانوذرات نقره نسبت به سایر نانوذرات اثرات بیشتری در برابر باکتری‌ها و ویروس‌ها از خود نشان می‌دهند (۹). نانوذرات نقره به دلیل داشتن سطح بیشتر نسبت به فلزات نقره رشد میکروارگانیسم‌ها را به تأخیر می‌اندازند و می‌توانند مستقیماً با سلول‌های باکتری فعل و انفعالاتی را انجام دهند که موجب اکسید شدن و در نهایت مرگ سلول‌های باکتریایی می‌شود بدون اینکه سمیتی برای انسان داشته باشند (۱۰). روش‌های مختلفی از جمله روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای سنتز نانوذرات نقره در اندازه‌های مختلف وجود دارد (۸). اگرچه روش‌های فیزیکی و شیمیایی تولید نانوذرات ممکن است تولید خالص موفق و شناخته شده‌ای داشته باشند اما به‌طور کلی گران و برای محیط زیست خطرناک هستند (۴). نانوذرات حاصل از این روش‌ها به دلیل استفاده از مواد شیمیایی سمی مانند سدیم، نیترات سدیم و الکل که نقش احیایی و تثبیت‌کننده را ایفا می‌کنند آتش‌زا بوده و در طبیعت به صورت تجزیه نشده باقی می‌مانند که در نهایت موجب آلودگی‌های شیمیایی محیط زیست می‌شوند (۱۱، ۱۲). از معایب دیگر این روش‌ها میزان تولید کم نانوذرات و

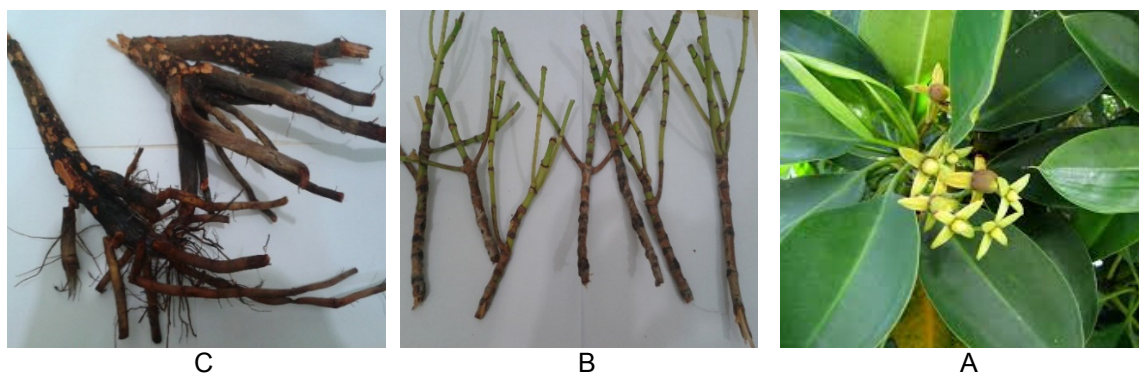
باکتریایی نانوذرات نقره تولید شده با استفاده از قسمت‌های مختلف گیاه مانگرو *Avicennia marina* نظیر برگ‌ها، پوست و ریشه را مورد بررسی قرار دادند که عصاره برگ بیشترین سنتز نانوذرات را نشان داد. با توجه به مطالب ارائه شده در خصوص سنتز زیستی نانوذرات و همچنین رویش گونه چندل در قسمت‌های محدودی از سواحل هرمزگان و گزارش خواص دارویی گیاهان مانگرو در تحقیقات گذشته، سعی بر آن شد تا سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره اندام‌های مختلف گیاه چندل و فعالیت ضد باکتریایی آن مورد بررسی قرار گیرد.

روش کار

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها: به منظور سنتز نانوذرات نقره، اندام‌های مختلف نظیر ریشه، ساقه و برگ گونه چندل (*Rhizophora mucronata*) از تالاب خورآذینی واقع در بندر سیریک در استان هرمزگان جمع‌آوری شد (شکل ۱). نمونه‌های جمع‌آوری شده ابتدا با آب دریا و سپس با آب معمولی و در انتها با آب مقطر شسته شده و در دمای اتاق و در سایه به مدت ۲ هفته خشک گردیدند و سپس با استفاده از دستگاه آسیاب پودر شدند.

آماده‌سازی عصاره گیاهی: ۱۰۰ گرم پودر برگ، ساقه و ریشه به صورت جداگانه با ۷۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای جوش روی هیتر نگه داشته شد و بعد از سرد شدن از کاغذ واتمن شماره ۱ عبور داده و عصاره آبی حاصل درون آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید و

مقاوم به نمک دریا بوده و به‌طور عمده در نواحی جزر و مدی گرمسیری و نیمه گرمسیری به‌صورت پراکنده در بعضی نقاط دنیا شکل گرفته‌اند (۲۱). حدود ۱۲۳ ترکیب مختلف شیمیایی از قسمت‌های مختلف این گیاهان جداسازی شده است که برخی از این ترکیبات شامل ترپنوئیدها، استروئیدها، تانن‌ها، نفتالین‌ها، فلاونوئیدها، گلوکوزیدها، گلیکوزیدها و آلکالوئیدها می‌باشند (۱۷، ۲۲). این ترکیبات دارای خواص بیولوژیکی متنوعی از جمله خواص ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی و خواص ضد سرطان و ضد دیابت هستند (۲۳-۲۵). گونه چندل از گیاهان مانگرو با نام علمی *Rhizophora mucronata* از جنس *Rhizophora* و خانواده Rhizophoraceae است و دارای پراکنش وسیعی در دنیا می‌باشد. پراکنش این گونه مانگرو در ایران منحصر به خورهای بین بندر سیریک تا بعد از بندر جاسک در سواحل استان هرمزگان می‌باشد و در سایر نقاط خلیج فارس و دریای عمان دیده نشده است. با توجه به کاربردهای گسترده نانوذرات و اهمیت آن‌ها در حوزه‌های مختلف علوم و همچنین مزیت‌های سنتز زیستی در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به ساخت نانوذرات با استفاده از گیاهان و عصاره‌های گیاهی به‌ویژه گیاهان مانگرو شده است که از جمله مطالعات انجام شده در گیاهان مانگرو می‌توان به پژوهش Sangeetha و همکاران (۲۶) در سنتز نانوذرات نقره با استفاده از گیاه مانگرو *Excoecaria agallocha* اشاره کرد. این مطالعه کاهش زیستی یون‌های نقره توسط گیاه مانگرو مذکور را نشان داد. همچنین Gnanadesigan و همکاران (۱۷) اثر ضد



شکل ۱- (A) برگ چندل، (B) ساقه چندل، (C) ریشه چندل.

Cereus PTCC 1665 بررسی گردید (۲۹). سویه های باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان در بندرعباس تهیه شد. به منظور تهیه محیط کشت، پودر مولر هینتون آگار برای محیط کشت جامد و پودر مولر هینتون برات برای محیط کشت مایع بر اساس دستورالعمل تولید کننده در آب مقطر حل شده و روی هیتر قرار داده شد تا یک ماده شفاف حاصل گردد. پس از اتوکلاو شدن، محیط مولر هینتون آگار در پلیت های استریل و محیط مولر هینتون برات در لوله های آزمایش به حجم ۵ میلی لیتر توزیع گردید. از تمام سویه های باکتری با روش خطی پلیت تهیه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا باکتری ها کاملاً رشد کنند. سپس در شرایط کاملاً استریل و در کنار شعله از پلیت کشت باکتری، تک کلونی برداشته و در لوله های حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع مولر هینتون برات انتقال داده شدند. جهت رشد باکتری، لوله ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت قرار گرفتند. غلظت نهایی هر نمونه بر اساس کدورت نیم مک فارلند در حدود $10^8 \times 1/5$ واحد کلونی باکتری در میلی لیتر تنظیم شد. با آغشته کردن یک سواب استریل به سوسپانسیون باکتری ها، سواب آلوده به باکتری ها به طور یکنواخت و در سه جهت روی محیط کشت مولر هینتون آگار حرکت داده شدند تا باکتری ها روی پلیت ها کشت شوند. مقدار ۱۰ میلی گرم پودر نانوذرات نقره ساخته شده از گیاه چنل و پودر عصاره گیاه چنل استریل شده به طور جداگانه در یک میلی لیتر آب دیونیزه حل شده و سپس نمونه ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سونیکت و نیز ورتکس شدند. در هر پلیت سه چاهک با استفاده از پیپت پاستور در فواصل منظم ایجاد شد و با استفاده از سمپلر حدود ۲۰ میکرولیتر نمونه به هر چاهک تزریق گردید. قطر هاله های عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تعیین شد. قطر این هاله ها به کمک خط کش معمولی اندازه گیری و نتایج میانگین سه بار تکرار محاسبه شدند (۳۰).

عصاره خشک تهیه شد. عصاره برای آزمایشات بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال نگه داری شد. **سنتر نانوذرات نقره:** ۰/۱ گرم عصاره خشک برگ، ساقه و ریشه به صورت جداگانه در ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل شد. سپس با ۹۰ میلی لیتر محلول نیترا نقره ۲۰ میلی مولار ترکیب گردید و به مدت ۹۰ دقیقه جهت مشاهده تغییر رنگ و بررسی روند میزان جذب آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV-Visible) با طول موج ۴۲۰ نانومتر تحت کنترل قرار گرفت.

تعیین ویژگی های نانوذرات نقره: احیای زیستی یون های نقره عصاره آبی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل CECIL CE 2501) در فواصل زمانی مختلف (۰ دقیقه، ۲۰ دقیقه، ۴۰ دقیقه، ۶۰ دقیقه، ۸۰ دقیقه و ۹۰ دقیقه) و در طول موج ۴۲۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. بعد از ۹۰ دقیقه انکوباسیون محلول حاوی نانوذرات ساخته شده، با دور ۱۲۰۰۰rpm سه مرتبه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل SIGMA 2-16P محصول کشور آلمان) شد. نهایتاً محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل در آن با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت برای خشک شدن نگهداری گردید. سر انجام پودر خشک شده نانوذرات نقره برای بررسی کریستالی بودن با دستگاه XRD (X-ray Diffraction Pert pro مدل X' شرکت Panalytical) مورد بررسی قرار گرفت (۲۷، ۲۸).

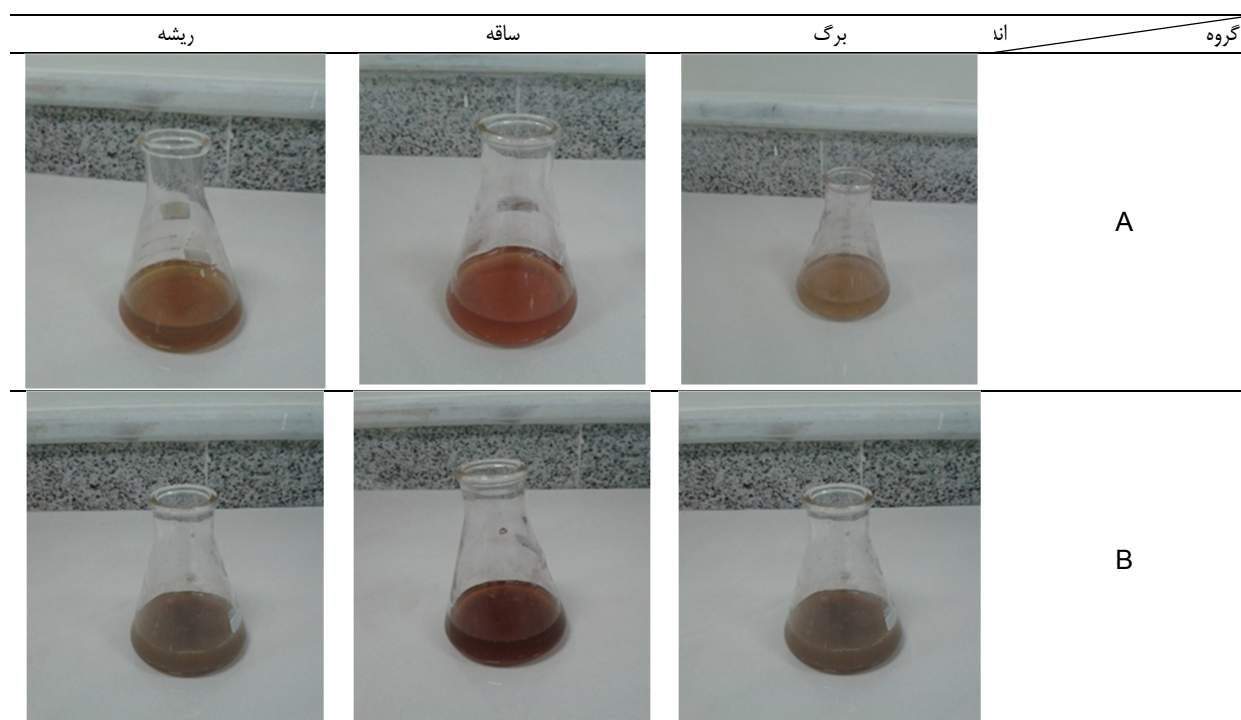
با استفاده از دستگاه TEM (مدل Zeiss - EM10C - 100 KV، شکل و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ویژگی های ریخت شناسی و اندازه نانوذرات با استفاده از دستگاه FE-SEM (مدل SIGMA VP-500) مطالعه شد. همچنین پودر خشک شده نانوذرات نقره جهت بررسی گروه های عاملی که مسئول احیاء یون های نقره هستند با دستگاه FT-IR (مدل Spectrum Two از شرکت PerkinElmer) مورد بررسی قرار گرفت.

فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده: اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از روش انتشار در چاهک در برابر باکتری های گرم منفی (*Vibrio*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619) (*harveyi* PTCC 1755) و گرم مثبت (*Bacillus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 1764)

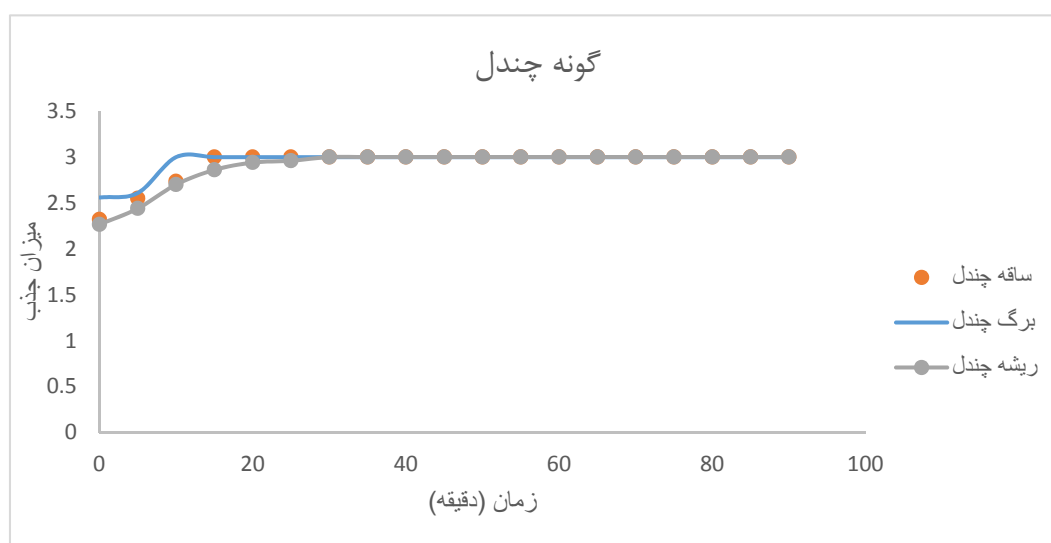
یافته‌ها

ریشه با محلول نیترات نقره در لحظه شروع واکنش به ترتیب به رنگ زرد روشن، قهوه ای روشن و قهوه ای روشن بود (شکل ۲ A). بعد از ۹۰ دقیقه محلول به رنگ قهوه ای تیره درآمد (شکل ۲ B). آشکار شدن رنگ قهوه ای تیره در عصاره آبی گونه ی چندل بعد از واکنش با یون‌های نقره، یک نشانه واضح از تبدیل شدن یون‌های فلزی به فلز نقره و تشکیل نانوذرات نقره می‌باشد.

در مطالعه حاضر سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره برگ، ساقه و ریشه گونه چندل مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، عصاره برگ، ساقه و ریشه گونه چندل به محلول نیترات نقره ۲۰ میلی مولار اضافه گردید و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق تحت کنترل قرار گرفت. اولین نشانه از تولید نانوذرات نقره تغییر رنگ محلول است. محلول حاوی عصاره برگ، ساقه و



شکل ۲- سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره برگ، ساقه و ریشه چندل. (A) لحظه شروع واکنش (B) بعد از ۹۰ دقیقه آنکوباسیون

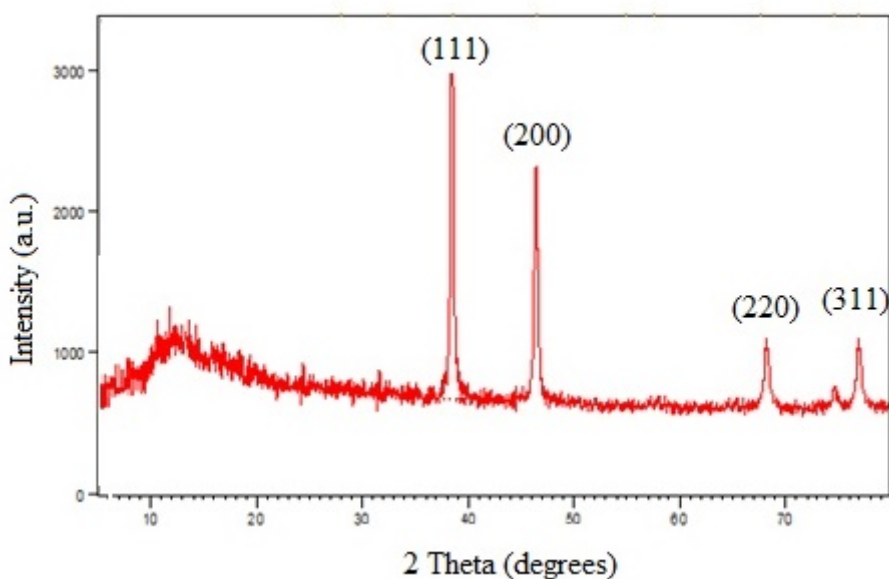


شکل ۳- میزان جذب نانوذرات سنتز شده از برگ، ساقه، ریشه چندل به همراه محلول نیترات نقره در طول موج ۴۲۰ نانومتر.

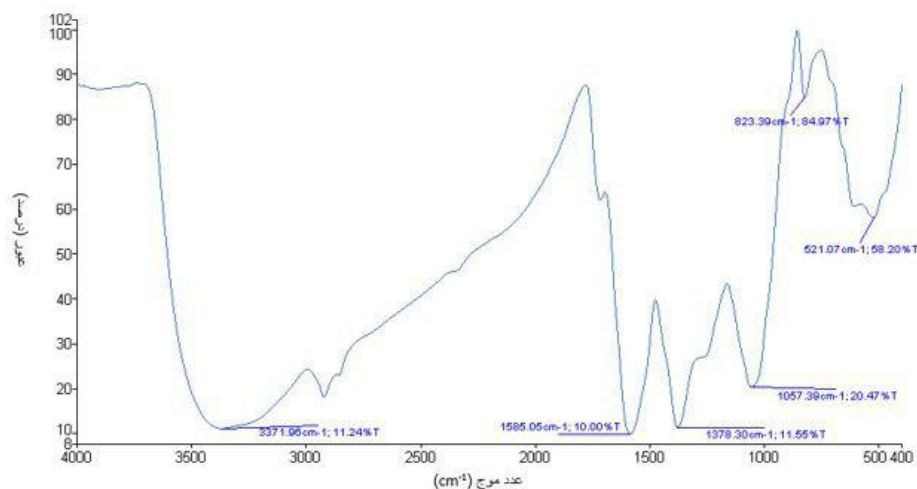
از روش پراش اشعه ایکس استفاده شد. با توجه به پیک های نشان داده شده حضور کریستال های نانوذرات نقره تایید گردید. موقعیت پیک های مشخصه نانوذرات نقره در مقادیر $38/47^\circ$ ، $46/38^\circ$ ، $67/59^\circ$ و $76/86^\circ$ قرار داشتند (شکل ۴).

به منظور شناسایی گروه های عاملی که مسئول احیای نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاهی هستند از روش طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز استفاده گردید. نتایج حاصل پیک هایی را

از بین اندام های مختلف، عصاره برگ حداکثر مقدار تولید نانوذره را نسبت به ساقه و ریشه نشان داد که ممکن است به علت حضور بالای متابولیت های ثانویه مانند پلی فنول ها، فلاونوئید ها و تانن ها باشد (۱۷). با استناد بر میزان جذب های بدست آمده از اسپکتروسکوپی UV-Visible در طول موج ۴۲۰ نانومتر، تولید نانوذرات نقره توسط عصاره آبی گیاه چندل تایید شد (شکل ۳). جهت تایید کریستالی بودن نانوذرات نقره تولید شده



شکل ۴- الگوی XRD از نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره برگ چندل.



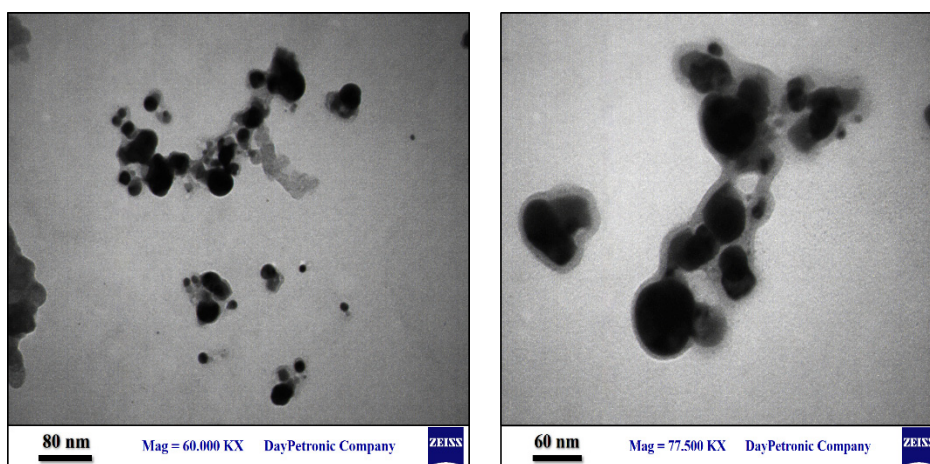
شکل ۵- طیف FT-IR نانو ذرات نقره سنتز شده توسط عصاره برگ چندل.

میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده گردید. ارزیابی تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری ثبت شده از نانوذرات نقره نشان داد که شکل ذرات کروی (شکل ۶) و اندازه نانوذرات ۰ تا ۸۰ نانومتر می‌باشد. اندازه بیشتر نانوذرات در حدود ۲۰ تا ۲۵ نانومتر بوده و میانگین اندازه نانوذرات ۳۲/۴۴ نانومتر می‌باشد (شکل ۷).

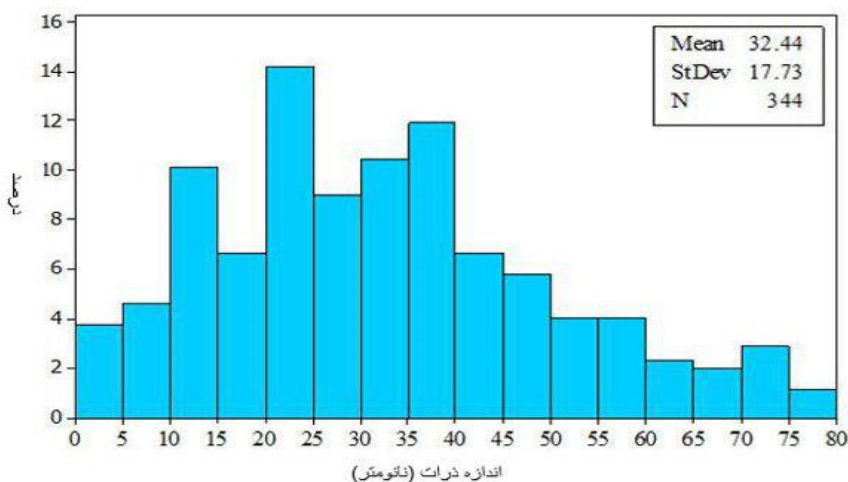
نتایج آنالیز تصویر FE-SEM نشان می‌دهد که نانوذرات نقره سنتز شده، اندازه ۱۰ تا ۱۹ نانومتر دارند (شکل ۸). همچنین طیف EDS حضور عناصری مانند فلز نقره، کربن، کلر و اکسیژن را در نانوذرات حاصل از برگ گونه چنل نشان داد که فلز نقره دارای بیشترین درصد، یعنی ۷۳/۵ درصد بود (شکل ۹). نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضد باکتریایی عصاره

در ۳۳۷۱/۹۶، ۱۵۸۵/۰۵، ۱۳۷۸/۳۰، ۱۰۵۷/۳۹، ۸۲۳/۳۹ و ۵۲۱/۰۷ cm^{-1} نشان داد (شکل ۵). پیک cm^{-1} ۳۳۷۱/۹۶ فرکانس جذب الکل O-H، پیک cm^{-1} ۱۵۸۵/۰۵ فرکانس جذب حلقه آروماتیک C=C، پیک cm^{-1} ۱۳۷۸/۳۰ فرکانس جذب آلکانها CH_2 ، پیک cm^{-1} ۱۰۵۷/۳۹ فرکانس جذب الکل و فنول C-O، پیک cm^{-1} ۸۲۳/۳۹ پیک مشخص و ویژه‌ای نیست مربوط به C-H های روی حلقه آروماتیک ولی از نوع خمشی خارج صفحه ای است و پیک cm^{-1} ۵۲۱/۰۷ فرکانس جذب آلکیل هالیدها (آلکیل برمید) C-Br را نشان می‌دهد (۳۱، ۳۲، ۳۳).

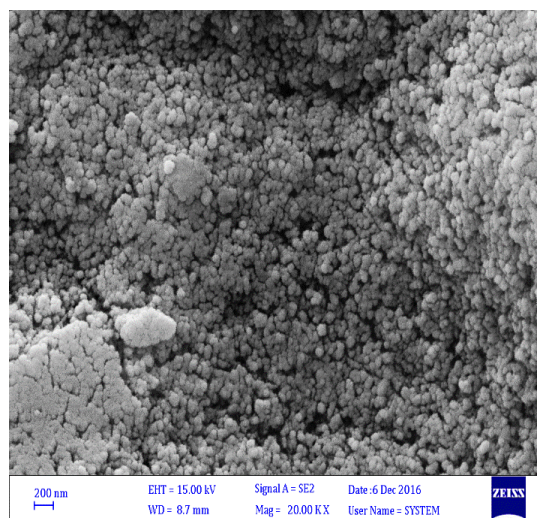
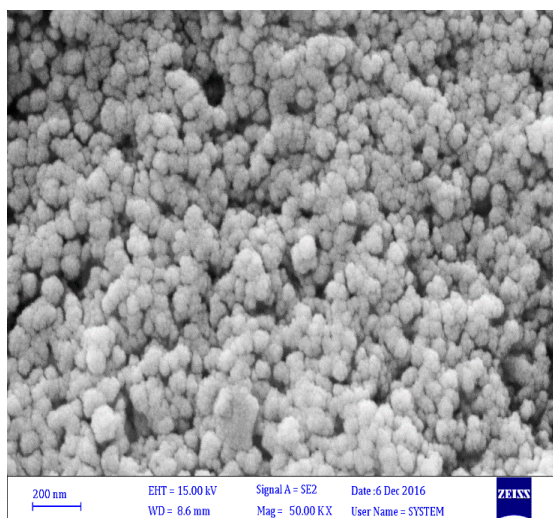
برای پی بردن به اندازه، شکل و ریخت‌شناسی نانوذرات نقره ساخته شده توسط عصاره گیاهی، از



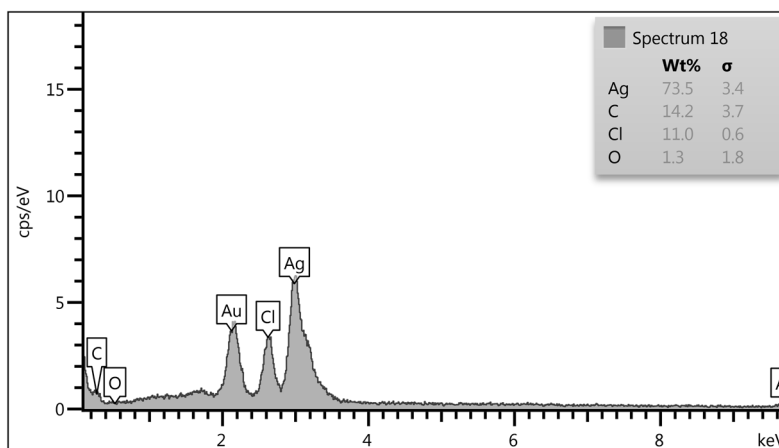
شکل ۶- تصاویر TEM نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره برگ چنل.



شکل ۷- هیستوگرام توزیع اندازه نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره برگ چنل.



شکل ۸- تصویر FE-SEM نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره برگ چندل.



شکل ۹- طیف EDS نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره برگ چندل.

چندل قادر به تولید نانوذرات نقره به روش زیستی می‌باشد که این نتایج، با نتایج حاصل از پژوهش Gnanadesigan و همکاران در سال (۱۷) که سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره برگ، پوست و ریشه گیاه *Avicennia marina* و خاصیت ضد باکتریایی آن را مورد مطالعه قرار دادند مطابقت دارد. تغییر رنگ مشاهده شده هنگام اضافه کردن عصاره گیاهی به محلول نیترات نقره که در اثر واکنش عصاره گیاهی با محلول نیترات نقره و احیای یون‌های نقره توسط عصاره آبی گیاه چندل است نشانه تشکیل نانوذرات نقره می‌باشد. در واقع افزایش ارتعاشات القاء شده بوسیله پلاسمون سطحی می‌تواند باعث افزایش شدت رنگ محلول نانوذرات نقره شود (۱۷، ۳۴). نتایج تحقیق

گیاه چندل و نانوذرات نقره سنتز شده به روش انتشار در چاهک در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده گویای این است که از بین سویه‌های انتخابی، باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیشتری از خود نشان دادند. باکتری گرم مثبت *Bacillus cereus* با داشتن بیشترین مقدار هاله عدم رشد حساس‌ترین و باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* با داشتن کم‌ترین مقدار هاله عدم رشد به عنوان مقاوم‌ترین باکتری مشخص شد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه

جدول ۱- اثر مهاری رشد نانوذرات نقره سنتز شده و عصاره چندل در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

منطقه مهاری رشد عصاره گیاهی (mm)			منطقه مهاری رشد نانوذرات نقره سنتز شده (mm)			میکروارگانیسم ها
ساقه	ریشه	برگ	ساقه	ریشه	برگ	
۱۲/۳۳±۰/۵۷	۱۱±۱/۷۳	۱۲±۱	۱۸/۳۳±۰/۵۷	۱۵/۶۶±۳/۰۵	۱۲/۳۳±۰/۵۷	باسیلوس سرئوس
۱۴±۳/۴۶	۱۳/۳۳±۰/۵۷	۱۴/۶۶±۱/۵۲	۱۷/۶۶±۱/۵۲	۱۷±۱/۷۳	۱۴±۱/۷۳	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۰±۳	۹/۶۶±۱/۵۲	-	۱۳/۶۶±۰/۰۵۷	۱۴±۲	۱۰/۳۳±۱/۵۲	ویبریو هاری
۸±۱	۸±۱/۷۳	۹±۱	۱۵/۳۳±۰/۵۷	۱۲/۶۶±۲/۰۸	۷/۶۶±۱/۵۲	سودوموناس آئروژینوزا

- هاله عدم رشد تشکیل نشد.

- قطر هاله عدم رشد شامل قطر چاهک (۶ میلی متر) می‌باشد.

در مطالعه Gnanadesigan و همکاران (۱۷) میزان جذب نانوذرات نقره بعد از ۸ ساعت انکوباسیون به ۱/۳۹ رسید. وجود پیک نانوذرات نقره در طول موج ۴۲۰ نانومتر با نتایج حاصل از پژوهش Gnanadesigan و همکاران (۳۸) و Ali و همکاران (۳۴) در گونه‌های مختلف مانگرو مطابقت داشت.

با توجه به پیک‌های نشان داده شده در XRD حضور کریستال‌های نانوذرات نقره تایید گردید. نتایج حاصل از آنالیز پراش پرتو ایکس با نتایج Gnanadesigan و همکاران (۱۷) و Sankar و Abideen (۴۰) در گونه مانگرو *Avicennia marina* همخوانی دارد. همچنین در مطالعه دیگری که بر روی گیاه مانگرو *Excoecaria agallocha* انجام شد آنالیز حاصل از پراش پرتو ایکس وجود کریستال‌های نقره را نشان داد (۲۶). پیک‌های قوی و تیز در نمودار XRD، نشان دهنده کریستالی بودن نانوذرات نقره سنتز شده می‌باشد. وجود پیک‌های مربوط به صفحات (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) سنتز ذرات نقره را نشان می‌دهد (۸، ۱۷). از تکنیک‌های میکروسکوپی مانند میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ الکترونی عبوری برای تعیین اندازه، شکل و ریخت‌شناسی نانوذرات سنتز شده استفاده می‌شود (۱۲، ۴۰). در مطالعه حاضر بر اساس بررسی میکروسکوپی، نانوذرات نقره سنتز شده به شکل کروی و با اندازه ۰ تا ۸۰ نانومتر بودند. Sankar و Abideen (۴۰) اندازه‌ی نانوذرات نقره سنتز شده توسط گیاه *Avicennia marina* را بر اساس تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ۱۵ تا ۲۵ نانومتر گزارش نمودند. در آزمایش دیگری که بر روی گیاه *Acalypha indica* انجام گرفت، اندازه‌ی نانوذرات نقره ۲۰ تا ۳۰ نانومتر گزارش شد که این با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد (۴۱). از دیگر مطالعات، مطالعه Jagtap و Bapat

Umashankari و همکاران (۳۵) نیز نشان داد که عصاره آبی گیاه *Rhizophora mucronata* بعد از ترکیب شدن با محلول نیترات نقره، بعد از ۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد شروع به تغییر رنگ و احیای یون‌های نقره نمود و از رنگ زرد به قهوه‌ای تغییر رنگ داد که این نشان دهنده کاهش یون‌های نقره است. نظیر این نتایج در سایر مطالعات انجام گرفته بر روی گیاهان مانگرو و نیز سایر گیاهان گزارش شده است (۲۶، ۳۲، ۳۶، ۳۹).

تشکیل نانوذرات نقره علاوه بر بررسی از طریق تغییر رنگ محلول، با استفاده از روش اسپکتروسکوپی UV-Visible به راحتی قابل تشخیص می‌باشد (۱، ۸، ۳۳). معمولاً نانوذرات نقره در محدوده مرئی در طول موج‌های بین ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر پیک جذبی از خود نشان می‌دهند (۷). با بررسی مطالعات انجام شده بر روی سنتز نانوذرات نقره توسط ارگانسیم‌ها (جلبک‌ها، قارچ‌ها، باکتری، گیاهان و ...) می‌توان پی برد که پیک جذب نانوذرات نقره بیشتر در طول موج حدود ۴۲۰ تا ۴۳۰ نانومتر اتفاق می‌افتد (۳۷). در مطالعه پیش رو، با استناد بر میزان جذب‌های بدست آمده از اسپکتروسکوپی UV-Visible در طول موج ۴۲۰ نانومتر، سنتز نانوذرات نقره توسط عصاره آبی گیاه چندل تایید شد. نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره برگ چندل بیشترین میزان جذب را در کم‌ترین زمان در مقایسه با ساقه و ریشه گیاه چندل نشان داد. به این صورت که برگ در مدت زمان ۱۵ دقیقه انکوباسیون و ساقه در مدت زمان ۲۰ دقیقه و ریشه در مدت زمان ۲۵ دقیقه به بیشترین میزان جذب (در حدود ۳) رسیدند. در حالی که در مطالعه Balakrishnan و همکاران (۳۹) میزان جذب نانوذرات نقره بعد از ۸ ساعت انکوباسیون به ۰/۵ رسید. همچنین

(۷) با استفاده از گیاه *Annosa squamosa* می‌باشد که سنتز نانوذرات نقره با اندازه بین ۱۴ تا ۴۰ نانومتر و کروی شکل را گزارش کردند. نانوذرات نقره دارای کاربردهای فراوانی در زمینه‌های مختلف می‌باشند که یکی از مهم‌ترین این کاربردها داشتن اثر کشندگی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا است. اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره از نقره بسیار بیشتر می‌باشد. توان فعل و انفعالات نانوذرات به دلیل نسبت بالای سطح به حجم آن‌ها بیشتر می‌شود که این امر خود موجب افزایش فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره می‌شود (۴۲). شایان توجه است که خاصیت ضد باکتریایی نانوذراتی که از روش زیستی تولید می‌شوند بسیار بیشتر از فعالیت ضد باکتریایی نانوذراتی است که از طریق شیمیایی تولید می‌شوند (۱۰). لذا این نانومواد با نشان دادن پایین‌ترین سطح سمیت، می‌توانند گزینه‌ای مناسب جهت مبارزه با باکتری‌های بیماری‌زا باشند. در مطالعه حاضر، فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده به خوبی توسط منطقه مهار رشد در برابر باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی نشان داده شد. نتایج گویای آن بود که از بین سویه‌های انتخابی، باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیشتری از خود نشان دادند. این موضوع به دلیل وجود غشاء‌های خارجی احاطه کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی منطقی به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها در برابر اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره حساسیت کمتری از خود نشان دهند. Suriya و همکاران (۴۳) گزارش دادند که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به نانوذرات نقره سنتز شده توسط جلبک دریایی *Urospora sp* حساس‌تر هستند بطوری که مقدار هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus subtilis* و باکتری‌های گرم منفی *Staphylococcus aureus* بیشتر از باکتری گرم منفی *Escherichia coli* بدست آمد. Yousefzadi و همکاران (۴۴) در ارزیابی اثر نانوذرات نقره سنتز شده توسط جلبک سبز *Enteromorpha flexuosa* بر روی سویه‌های مختلف باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی نشان دادند که باکتری‌های گرم مثبت با داشتن بیشترین مقدار هاله عدم رشد حساس‌ترین و باکتری‌های گرم منفی با داشتن کم‌ترین مقدار هاله عدم رشد، مقاوم‌ترین باکتری‌ها بودند. همچنین مطالعه

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از ستاد ویژه توسعه فناوری نانو به دلیل حمایت مالی سپاسگزاری نمایند.

References

1. Rajeshkumar S, Malarkodi C, Gnanajobitha G, Paulkumar K, Vanaja M, Kannan C. Seaweed – mediated synthesis of gold nanoparticles using *Turbinaria conoides* and its characterization. *J Nanostructure Chem*; 2013. 3:1-7.
2. Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B, Muthumary J, Srinivasan K. Biosynthesis of silver nanoparticles using *citrus sinensis* peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*; 2011. 79: 594-598.
3. Dubey S, Lahtinen M, Sillanpaa M. Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of *Rosa rugosa*. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*; 2010. 364: 34-41.
4. Nadagouda MN, Hoag G, Collins J, Varma RS. Green synthesis of Au nanostructures at room temperature using biodegradable plant surfactants. *Cryst. Growth Des*; 2009. 9: 4979-4983.
5. Marchiol L. Synthesis of metal nanoparticles in living plants. *Ital J Agron*; 2012. 7:274-282.

۱۹

6. Song JY, Kim BS. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess Biosyst Eng*; 2009. 32:79–84.
7. Jagtap UB, Bapat VA. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* Lam. seed extract and its antibacterial activity. *Industrial Crops and Products*; 2013. 46:132-137.
8. Vanaja V, Annadurai G. *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bacterial activity. *Appl Nanosci*; 2013. 3:217-223.
9. Rekha VA. Biological synthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of endophytic fungus *Aspergillus terreus* and its antibacterial activity. *Int J Nanomater Biostruct*; 2013. 3:35-37.
10. Mohseniazar M, Barin M, Zarredar H, Alizadeh S, Shanebandi D. Potential of microalgae and lactobacilli in biosynthesis of silver nanoparticles. *BioImpacts*; 2011. 1:149-152.
11. Senapati S, Syde A, Moez S, Kumar A, Ahmad A. Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga *Tetraselmis Kochinensis*. *Mater Lett*; 2012. 79:116-118.
12. Sahayaraj K, Rajesh S. Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications. *Curr Res Technol Adv*; 2011. 23:228-244.
13. Kaushik N, Thakkar MS, Snehit S, Mhatre MS, Rasesh Y, Parikh MS. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomed: Nanotechnol Biol Medicine* 2010. 6:257-262.
14. Ponarulselvam S, Panneerselvam C, Murugan K, Aarthi N, Kalimuthu K, Thangamani S. Synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Catharanthus roseus* Linn. G. Don and their antiplasmodial activities. *Asian Pac J Trop Med*; 2012: 574-580.
15. Lee HJ, Song JY, Kim BS. Biological synthesis of copper nanoparticles using *Magnolia Kobus* leaf extract and their antibacterial activity. *J. Chem. Technol. Biotechnol*; 2013. 88:1971-1977.
16. Devina Merin D, Prakash S, Bhimba BV. Antibacterial screening of silver nanoparticles synthesized by marine micro alga. *Asian Pac J Trop Med*; 2010. 3:797-799.
17. Gnanadesigan M, Anand M, Ravikumar S, Maruthupandy M, Ali MS, Vijayakumar V, et al. Antibacterial potential of biosynthesized silver nanoparticles using *Avicennia marina* mangrove plant. *Appl Nanosci*; 2012. 2:143-147.
18. Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh VN, Shamsi SF, Mehta BR, et al. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. *Colloids Surf B Biointerfaces*; 2010. 81:81-86.
19. Wang Y, He X, Wang K, Zhang X, Tan W. Barbated Skullcup herb extract-mediated biosynthesis of gold nanoparticles and its primary application in electrochemistry. *Colloids Surf B Biointerfaces*; 2009. 73:75-79.
20. Sanjukta RK, Samir D, Puro K, Ghataak S, Shakuntal L, Sen A. Green synthesis of silver Nanoparticles using plant. *Int J Nanomed Nanosurg*; 2016. 2.
21. Patra JK, Thatoi HN. Metabolic diversity and bioactivity screening of mangrove plants: a review. *Acta Physiol Plant*; 2011. 33:1051-1061.
22. Zhu F, Chen X, Yuan Y, Huang M, Sun H, Xiang W. The chemical investigations of the mangrove plant *Avicennia marina* and its endophytes. *The Open Nat Prod J*; 2009. 2:24-32.
23. Bakshi M, Chosh S, Chaudhuri P. Green synthesis, characterization and antimicrobial potential of silver nanoparticles using tree mangrove plants from Indian sundarban. *BioNano Sci*; 2015. 5:162-170.
24. Ravikumar S, Syed Ali M., Ramu A, Ferosekhan M. Antibacterial activity of chosen mangrove plants against bacterial specified pathogens. *World Appl Sci J*; 2011. 14:1198-1202.
25. Bobbarala V, Vadlapudi VR, Naidu CK. Antimicrobial potentialities of mangrove plant *Avicennia marina*. *J Pharm Res*; 2009. 2:1019-1021.
26. Sangeetha A, Saraswathi U, Singaravelu GJ. Green synthesis of silver nanoparticles using a mangrove *Excoecaria agallocha*. *Int J Pharm Sci Invent*; 2014. 3:54-57.
27. Anandalakshmi K, Venugobal J, Ramasamy V. 2016. Characterization of silver nanoparticles by green synthesis method using pedaliu murex leaf extract and their antibacterial activity. *Appl Nanosci*; 2016. 6:399-408.
28. Singaravelu G, Arockiamary JS, Kumar VG, Govindaraju K. 2007. A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. *Colloids Surf B Biointerfaces*; 2007. 57:97-101.
29. Nanda A, Saravanan M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomed: Nanotechnol Biol Med*; 2009. 5:452-456.
30. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test (6th ed). Approved Standard. M100-A6. Wayne, Pennsylvania, USA. 1997
31. Bankar A, Joshi B, Kumar AR, Zinjarde S. Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of silver nanoparticles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*; 2010. 368:58-63.
32. Jyoty K, Baunthiyal M, Singh, A. Characterization of silver nanoparticles synthesized using urtica dioica Linn. Leaves and their synergistic effects with antibiotics. *J Radiat Res Appl Sci*; 2015. 9:217-227.
33. Ibrahim HM. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using

banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms. J Radiat Res Appl Sci; 2015. 8:265-275.

34. Ali M, Anuradha V, Yogananth N, Rajathilagam R, Chanthuru A, Morzook SM. Green synthesis of silver nanoparticles by *Acanthus ilicifolius* mangrove plant against *Armigeressubalbatus* and *Aedesaegypti* mosquito larvae. Int J Nano Dimens; 2015. 6:197-204.

35. Umashankari J, Inbakandan D, Ajithkumar TT, Balasubramanian T. Mangrove plant *Rhizophora mucronata* (Lamk, 1804) mediated one pot green synthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity against aquatic pathogens. Aquat Biosyst; 2012. 8(1):11.

36. Nabikhan A, Kandasamy K, Raj A, Alikunhi NM. Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, *Sesuvium portulacastrum* L. Colloids Surf B Biointerfaces; 2010. 79(2): 488-493.

37. Ingle A, Rai M, Gade A, Bawaskar M. *Fusarium solani*: a novel biological agent for the extracellular synthesis of silver nanoparticles. J Nanopart Res; 2008. 11:2079-2085.

38. Gnanadesigan M, Anand M, Ravikumar S, Maruthupandy M, Vijayakumar V, Selvam S, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by using mangrove plant extract and their potential mosquito larvicidal property. Asian Pac J Trop Med; 2011. 4:799-803.

39. Balakrishnan S, Srinivasan M, Mohanraj J. Biosynthesis of silver nanoparticles from mangrove plant (*Avicennia marina*) extract and their potential mosquito larvicidal property. J Parasit Dis; 2014. 40:991-996.

40. Sankar MV, Abideen S. Pesticidal effect of Green synthesized silver and lead nanoparticles using *Avicennia marina* against storage pest *Sitophilus oryzae*. Int J Nanomater Biostruct; 2015. 5:32-39.

41. Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extract and its antibacterial activity against water borne pathogens. Colloids Surf B Biointerfaces; 2010. 76(1):50-56.

42. Thangaraju N, Venkatalakshmi RP, Arulvasu C, Pandian K. Synthesis of silver nanoparticles and the antibacterial anticancer activities of the crude extract of *Sargassum polycystum* C.agardh. Nano-Biomed Engineer; 2012. 4:89-94.

43. Suriya J, Raja SB, Sekar V, Rajasekaran R. Biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity using seaweed *Urospora* sp. Afr J Biotechnol; 2012. 11:12192-12198.

44. Yousefzadi M, Rahimi Z, Ghafari V. The green synthesis, characterization and antimicrobial

activities of silver nanoparticles synthesized from green alga *Enteromorpha flexuosa* (Wulfen). J Agardh Mater Lett; 2014. 137:1-4.