



## ستنر سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه شاهتره و بررسی خواص آنتیاکسیدانی و ضدمیکروبی آن

بهروز دوستی: استادیار، گروه زیست شناسی، واحد خرم آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم آباد، ایران (نویسنده مسئول) [dousti@khoiau.ac.ir](mailto:dousti@khoiau.ac.ir)

فاطمه نبی‌پور: کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد خرم آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم آباد، ایران

امین حاجی امرایی: دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد خرم آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم آباد، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

نانوذرات نقره،

شاهتره،

ضدباکتریابی،

آنتی‌اکسیدان

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۰۷

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۵/۱۲

**زمینه و هدف:** روش تولید زیستی نانوذرات به علت دارا بودن ویژگی‌هایی مانند سازگاری با محیط زیست، ساده و کم هزینه بودن مورد توجه واقع شده است. در این مطالعه ستنر سبز نانوذرات نقره از عصاره گیاه شاهتره و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریابی آن در قیاس با دو آنتی‌بیوتیک رایج مورد بررسی قرار گرفت.

**روش کار:** ابتدا عصاره آبی گیاه شاه تره تهیه و به محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار اضافه شد. پس از تغییر رنگ عصاره، محصول واکنش به وسیله روش‌های اسپکتروفتومتری، پراش پرتوی ایکس و میکروسکوپ الکترونی روشنی مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت خواص آنتی‌اکسیدانی و خواص ضدباکتریابی نانوذرات ستنر شده با استفاده از روش ۲-۲ دی‌فنیل-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و روش انتشار دیسک به ترتیب بررسی شد. همچنین MIC (حداقل غلظت ممانعت از رشد) MBC (حداقل غلظت باکتری کشی) با دو روش میکرودایلوشون و رقت در لوله تعیین شد.

**یافته‌ها:** نانوذرات نقره ستنر شده بیشترین جذب را در ۴۳۰ نانومتر نشان دادند و دارای شکل کروی و میانگین اندازه آن‌ها بین ۱۰-۵۰ نانومتر بود. نانوذرات ستنر شده دارای خواص آنتی‌اکسیدانی با IC<sub>50</sub> برابر با ۲۱ میکروگرم بر میلی لیتر بودند. نتایج بررسی‌های ضدباکتریابی نشان داد که نانوذرات نقره ستنر شده، فعالیت ضدباکتریابی بیشتری بر علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس نسبت به باکتری گرم منفی اشریشیاکلی داشتند.

**نتیجه گیری:** عصاره شاهتره قادر به اجتیاion<sup>+</sup> Ag به نانوذرات نقره می‌باشد. همچنین نانوذرات نقره ستنر شده دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی مناسبی می‌باشند.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت کننده:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد

**شیوه استناد به این مقاله:**

Dousti B, Nabipour F, Hajiamraei A. Green synthesis of silver nanoparticle by using the aqueous extract of *Fumaria Parviflora* and investigation of their antibacterial and antioxidant activities. Razi J Med Sci. 2019;26(6):105-117.

\* انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

## Green synthesis of silver nanoparticle by using the aqueous extract of *Fumaria Parviflora* and investigation of their antibacterial and antioxidant activities

**Behrooz Dousti**, Assistant Professor, Department of Biology, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran (\*Corresponding author) dousti@khoiau.ac.ir

**Fatemeh Nabipour**, MSc, Department of Biology, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran

**Amin Hajiamraei**, MSc, Department of Biology, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran

### Abstract

**Background:** The bio-production method has been respected due to the lack of energy consumption and environmental compatibility. In this study, the green synthesis of silver nanoparticles was investigated from the extract of *Fumaria Parviflora* and its antioxidant and anti-bacterial properties compared to two common antibiotics.

**Methods:** First, aqueous extract of *Fumaria Parviflora* was prepared and admixed with AgNO<sub>3</sub> solution at a concentration of 1 mM. After changing the color of extract, the reaction product was examined by spectrophotometric, X-ray diffraction and scanning electron microscopy. Finally, antioxidant properties and antibacterial properties of synthesized nanoparticles were investigated using DPPH method and disk diffusion method, respectively. Also, the MIC (minimum inhibitory concentration of growth and MBC (minimum bactericidal concentration) were determined by two methods of microdilution and dilution in the tube.

**Results:** The synthesized silver nanoparticles showed the most absorbance at 430 nm and had a spherical shape with an average size of 10-50 nm. The synthesized nanoparticles have antioxidant properties with IC<sub>50</sub> of 21 µg / ml. The results of the antibacterial studies showed that the synthesized silver nanoparticles had more antibacterial activity against the gram-positive bacteria of *Staphylococcus aureus* than the gram-negative bacteria of *Escherichia coli*.

**Conclusion:** The extract of *Fumaria Parviflora* has the ability of reducing Ag<sup>+</sup> ion to silver nanoparticles. Also, synthesized silver nanoparticles have good antioxidant and antibacterial activities.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** Islamic Azad University Khorramabad Branch

### Keywords

Silver nanoparticles,

Green synthesis,

*Fumaria Parviflora*,

Antibacterial,

Antioxidant

Received: 27/04/2019

Accepted: 03/08/2019

### Cite this article as:

Dousti B, Nabipour F, Hajiamraei A. Green synthesis of silver nanoparticle by using the aqueous extract of *Fumaria Parviflora* and investigation of their antibacterial and antioxidant activities. Razi J Med Sci. 2019;26(6):105-117.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

## مقدمه

عنوان جایگزین آسان و مناسب برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی مطرح شده است (۱۲). سنتز بیولوژیکی نانوذرات نقره بوسیله گیاهانی از قبیل عصاره آبی و الکلی آلوئه ورا (۱۳)، عصاره برگ گیاه درمنه آفریقای جنوبی *Artemisia afra* (۸)، عصاره آبی بخش هوایی گیاه شقایق شاخدار *Glaucium Corniculum* (۵)، عصاره آبی برگ گیاه شیکاکی (۱۴)، عصاره برگ گیاه برگ نمدی *Abutilon indicum* (L.) Sweet (۱۵) و بسیاری از گیاهان دیگر انجام گرفته است.

گزارش‌های متعددی در رابطه با استفاده از سنتز زیستی نانوذرات نقره و فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها وجود دارد. به عنوان مثال نتایج مطالعات عزیزیان شرمه و همکاران از نانوذرات سنتز شده از عصاره آبی گیاه آقطی (۱۶)، حیدرزاده و همکاران از نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه بهارنارنج (۱۷) و Rafi و Shaik (۱۸)، نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده از این گیاهان رشد باکتری‌های اشريشياکلي و استافيلوكوك اورئوس را مهار می‌کنند

شاهتره با نام علمی *Fumaria officinalis* متعلق به تیره شاهتره می‌باشد. شاهتره، گیاهی یک‌ساله بالارونده با برگ‌های کاملاً شکافدار و تقسیم شده و آبدار است که به رنگ سبز متمایل به آبی می‌باشد. گل‌های صورتی این گیاه دارای یک خار است که قسمت سر آن تیره رنگ می‌باشد. میوه‌ها نیز خشک، کروی شکل و کوچک بوده و حاوی یک دانه می‌باشند (۱۹). بررسی فیتوشیمیایی نشان داد که گیاه شاهتره دارای فلاونوئیدها، گلایکوزیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، استروئیدها، تریترپروئیدها، فنل‌ها، آلکالوئیدها و آنتراکینون‌ها را نشان داد (۲۰). مطالعات فارمولوژیکی نشان داد که گیاه شاهتره دارای اثرات آرامبخشی، ضد درد، ضدالتاہبی، ضد تب، ضد میکروبی، ضد انگلی، تولید مثل و اثرات آرام بخش عضله صاف می‌باشد (۲۱).

در این پژوهش برای اولین بار سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه شاهتره و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضرباکتریایی نانو ذرات سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت.

در سال‌های اخیر با افزایش مشکلات زیست محیطی، توجه فراوانی به بحث شیمی سبز شده، و تلاش برای سنتز نانو مواد از طریق روش‌های پاک زیست محیطی شدیداً افزایش یافته است (۱۱ و ۲۰). شیمی سبز یک روش پژوهش یا بداعی است که شامل بخش کاربردی برای طراحی، توسعه و تولید کارآمد محصولاتی می‌شود که توان به حداقل رساندن مواد خطرناک برای سلامت را دارا می‌باشند. هدف پژوههای فناوری سبز جدید، به حداقل رساندن خطرات احتمالی کاربردهای نانو برای انسان و هم‌چنین محیط زیست است (۳). نانو ذرات حاصل از روش‌های شیمیایی که امروزه به کار برده می‌شوند به دلیل استفاده از مواد شیمیایی خطرناک و سمی بودن و آسیب‌های زیست محیطی حاصل از آن‌ها، نگرانی‌های زیادی را ایجاد کرده‌اند. نانو فناوری زیستی یکی از امیدوار کننده‌ترین حوزه‌های علم و فناوری نانو در عصر جدید است (۴). نانوذرات به دلیل ویژگی‌های خاص از قبیل اندازه، شکل و مورفولوژی یک تأثیر عمده بر همه جوانب زندگی انسان دارند و در میان آن‌ها نانوذرات فلزی از قبیل نقره، طلا، پلاتین و پالادیوم دارای کاربردهای زیادی در زمینه‌های مختلف علمی مانند دارو، پزشکی، مهندسی پزشکی و سلامتی هستند (۵). از دیرباز نقره به عنوان یکی از عوامل ضدمیکروبی برای درمان بیماری‌ها و حفظ مواد غذایی و آب استفاده شده است. به همین دلیل می‌توان گفت بیشترین کاربرد نانوذرات نقره در صنعت پزشکی است (۶). هم‌چنین نانوذرات نقره دارای خواص ضدمیکروبی، ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (۷ و ۸). استفاده از گیاهان به عنوان منابع پایدار و در دسترس در تهیه نانو ذرات زیست سازگار، در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از پژوهشگران می‌باشد و از مزایای این روش می‌توان به زیست سازگار بودن، ارزانی، غیررسمی بودن و تولید نانو ذرات با خلوص بالا اشاره کرد (۱۰). سوخت و سازهای ثانویه گوناگون، آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و انسن‌ها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، فنول‌ها، تانن‌ها، اسیدها، ویتامین‌ها، ترکیبات رنگی، سولفور، رزین‌ها و ترپن‌ها در تهیه نانو ذرات فلزی به وسیله گیاهان نقش اساسی دارند (۱۱). در سال‌های اخیر استفاده از عصاره گیاهان برای تهیه نانو ذرات فلزی به

شبکه کریستالی و اندازه نانوذرات سنتز شده استفاده شده است. نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از دستگاه XRD، ولتاژ KV ۴۰ و جریان mA ۴۰ و جنس آند از مس بود در آزمایشگاه دانشگاه لرستان انجام شده است.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopic) به منظور بررسی اندازه نانوذرات نقره سنتز شده و مورفولوژی نانوذرات نقره سنتز شده از این آنالیز استفاده شد. برای این منظور رسوب حاصله از نانوذره سه مرتبه و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد و از رسوب حاصل توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره عکسبرداری شد به این صورت که نانوذرات بر روی مسی پوشیده شده از کربن ثابت شدند و پس از خشک کردن با لامپ مادون قرمز، عکسبرداری با دقیق ۲/۳۲ آنگستروم انجام شد.

بررسی خواص آنتی اکسیدانی نانوذره نقره سنتز شده از گیاه شاهتره: فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره با استفاده از مهار رادیکال آزاد ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل ۲-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (شرکت سیما آذریج کشور آمریکا) ارزیابی شد. ۰/۵ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده و آسکوربیک اسید به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد در لوله آزمایش جداگانه ریخته و سپس به هر کدام ۱ میلی لیتر محلول متانولی /۱ میلی مولار از DPPH (مقدار ۲ میلی گرم از DPPH با متانول به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد) اضافه کرده و بعد از مخلوط کردن و پس از گذشت ۳۰ دقیقه، در دمای اتاق و در تاریکی، در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی- فرابینفش در برابر شاهد خوانده شد. در این روش از آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سپس غلظتی از نانوذره سنتز شده که دارای درصد مهار رادیکالی (IC<sub>50</sub>) بود، محاسبه گردید (فرمول ۱). بدیهی است که هر چه این عدد کوچک‌تر باشد قدرت آنتی اکسیدانی یا مهار رادیکال‌های آزاد، بیشتر می‌باشد و کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

#### فرمول ۱- نحوه محاسبه درصد مهار رادیکال

## روش کار

تهیه عصاره گیاه شاهتره: در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی گیاه شاهتره در اواسط فروردین ماه سال ۱۳۹۷ از شهرستان خرم‌آباد جمع‌آوری و پس از تائید گیاه‌شناسی در مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان لرستان به عنوان گونه *F.Parviflora* از خانواده شاقاقیان شناسایی شد. پس از تمیز کردن و شستشوی گیاه، در سایه خشک و سپس آسیاب گردید. به منظور تهیه عصاره گیاه از روش خیساندن تهیه شد بدین منظور، ۲۰ گرم از پودر گیاه شاهتره در یک اrlen به ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه گردید و به مدت ۷۰ دقیقه درون بن‌ماری گذاشته تا عصاره اولیه گیاه به دست آید. عصاره آبی با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک و فیلتر سرنگی فیلتر شد و در لوله فالکون در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۲۲).

سنتز نانوذرات نقره: ۱۰ میلی لیتر از عصاره مورد نظر به ۹۰ میلی لیتر نیترات نقره (شرکت مرک کشور آلمان) ۱ میلی مولار اضافه شد و به منظور کاهش یون‌های نقره، محلول در دمای اتاق و در شرایط تاریکی به مدت یک شبانه روز نگهداری شد (۲۳). تغییر رنگ عصاره از زرد کمرنگ به قهوه ای تیره تا سیاه نشان دهنده تولید نانوذرات نقره است (۲۴). سپس عصاره‌های حاوی نانوذرات با دور ۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده در آون ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت خشک گردید. نانوذرات نقره بدست آمده جهت مطالعه بیشتر در داخل میکروتیوب در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۵).

طیف سنجی فرابینفش/مرئی (UV-Vis): ۲۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی عصاره و نیترات نقره را به حجم ۱ میلی لیتر رسانده و سپس توسط طیف‌سنجی فرابینفش/مرئیدر طول موج ۳۰۰-۷۰۰ نانومتر بررسی گردید.

طیفسنجی پراش اشعه ایکس (X-ray diffraction): در این پژوهش از طیف پراش اشعه ایکس به منظور استخراج صحت سنتز نانوذرات نقره، پی بردن به نوع

$$\frac{\text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل منفی}} = \frac{\text{درصد مهار رادیکال}}{\text{جذب نمونه}}$$

جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی نانوذره MBC (Minimum Bactericidal concentration) چاهک‌های فاقد کدورت که در آنها رشد مهار شده بود به کمک لوب استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. کمترین غلظتی از نانوذره که هیچ باکتری در آن زنده نمانده به عنوان MBC در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه تاثیر نانوذره سنتز شده مورد آزمایش روی نمونه استاندارد ۳ مرتبه تکرار شد و برای هر سری رقت ۲ شاهد در نظر گرفته شد.

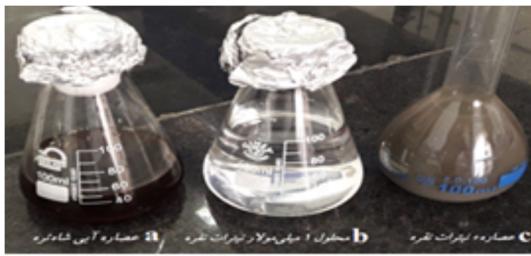
تعیین MIC به روش رقت لوله: ابتدا ۸ لوله استریل انتخاب کرده و سپس در هر لوله ۱ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث ریخته شد و در لوله اول ۱ میلی‌لیتر نانوذره ریخته شد و خوب بهم زده شد سپس از آن ۱ میلی‌لیتر برداشته و به لوله بعدی اضافه شد و تا آخرین لوله ادامه یافت. سپس  $100 \mu\text{g}$  میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری ( $\text{CFU}/\text{ml} = 10^{8} \times 1/5$ ) از باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و اشرشیاکلی به صورت جداگانه به هر لوله تلقیح شد و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه انکوبه شدند. آنگاه کدورت لوله‌ها به صورت چشمی خوانده شد و رشد یا عدم رشد باکتری در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی نانوذره (MBC)، از لوله‌های فاقد کدورت که در آنها رشد مهار شده بود به کمک لوب استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. کمترین غلظتی از نانوذره که هیچ باکتری در آن زنده نمانده به عنوان MBC در نظر گرفته می‌شود.

تجزیه و تحلیل آماری: تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد و مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA-oneway) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون تی تست درسطح احتمال ( $P < 0.05$ ) صورت گرفت. از نرمافزار SPSS و یرایش ۱۶ برای آنالیز آماری و Excel برای رسم نمودار استفاده شد.

بررسی اثرات ضدبакتریایی نانوذرات سنتز شده به روش انتشار دیسک: سویه‌های باکتریایی استاندارد اس‌تافیلوکوک اورئوس (ATCC ۶۵۳۸) و اشرشیاکلی (ATCC ۱۱۳۰۳) روی مولر هینتون آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند، سپس غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده در آب دیونیزه (۱۰۰، ۵۰، ۲۵ میکروگرم بر میکرولیتر) روی دیسک‌های (شرکت پادتن طب) ۶ میلی‌متری بلانک استریل شده در اتوکلاو، ریخته و پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطره هاله عدم رشد اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌مترگزارش می‌گردد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آمیکاسین، وانکومایسین ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (شرکت پادتن طب) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

بررسی حداقل غلظت مهار کننده رشد MIC (Minimum inhibitory concentration) میکرودایلوشن: در این روش با استفاده از میکروپلیت ۹۶ خانه غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره در مقابل باکتری‌ها قرار داده شد و رشد باکتری‌ها در مقابل نانوذرات نقره سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت به این صورت که ابتدا در ۹۶ خانه میکروپلیت به مقدار مساوی  $95 \mu\text{l}$  میکرولیتر محیط مولر هینتون براث ریخته شد. به لوله اول به مقدار  $100 \mu\text{l}$  نانوذرات نقره با غلظت  $100 \mu\text{g}$  میکروگرم بر میکرولیتر اضافه شد که بعد از مخلوط شدن، رقت نانوذره مورد نظر در لوله اول به نصف رسید. سپس  $100 \mu\text{l}$  از لوله اول برداشته و به لوله دوم اضافه شد و به این ترتیب تا لوله آخر سری رقتی تهیه شد که رقت نانوذره در هر لوله نصف لوله ماقبل است. چاهک آخر حاوی  $195 \mu\text{l}$  میکرولیتر مولر هینتون براث و  $5 \mu\text{l}$  میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی ولی فاقد ترکیب مورد آزمایش بود این چاهک به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. غلظت نهایی چاهک  $200 \mu\text{l}$  میکرولیتر بود. سپس به تمام چاهک‌ها به غیر از چاهک شماره  $12, 1, 1, 5 \mu\text{l}$  از سوسپانسیون باکتریایی معادل  $10^{8} \times 1/5 \text{ CFU/ml}$  تلقیح شد پس از بسته شدن درب، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه انکوبه شدند. آنگاه کدورت چاهک‌ها به صورت چشمی خوانده شد و رشد یا عدم رشد باکتری در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.



**شکل ۱-۱** تغییرات رنگ عصاره در حضور نیترات نقره. (a) عصاره آبی (b) محلول امیلی مولار نیترات نقره (c) عصاره تیمار شده با نیترات نقره

شکل و اندازه نانو ذرات نقره تولید شده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM استفاده شد که در شکل ۴ نشان داده شده است. طبق تصاویر به دست آمده با میکروسکوپ الکترونی SEM نانو ذرات نقره به شکل کروی هستند و از نظر اندازه نسبتاً یکنواخت در محدوده ۳۰ تا ۵۰ نانومتر می‌باشند.

شکل ۵ نتایج خواص آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره سنتز شده را نشان می‌دهد که میزان درصد مهار رادیکالی  $IC_{50}$  (۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات سنتز شده برابر میلی‌لیتر محاسبه شد.

هم‌چنین نتایج نشان داد که نانو ذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه شاهتره دارای خاصیت ضدبакتریایی بیشتری بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به باکتری گرم منفی اشريشیاکلی می‌باشد. بیشترین هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره سنتز شده و کمترین هاله رشد مربوط به غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (جدول ۱). میانگین قطر هاله عدم رشد نانوذره سنتز شده در تمامی غلظتها بر باکتری استافیلوکوک اورئوس بیشتر از میانگین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک و انکومایسین و آمیکاسین می‌باشد که در  $p < 0.05$  دارای اختلاف معنی‌دار است. هم‌چنین میانگین قطر هاله عدم رشد نانوذره سنتز شده در تمامی غلظتها بر باکتری اشريشیاکلی بیشتر از میانگین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک و انکومایسین می‌باشد که در  $p < 0.05$  دارای اختلاف معنی‌دار است و البته قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک آمیکاسین  $21 \pm 0.3$  میلی‌متر می‌باشد و قدرت مهار بیشتر آن را در قیاس با غلظتها مختلف نانوذره سنتز شده مذکور نشان می‌دهد که با نتایج مطالعات اعتمادی و همکاران (۱۳۹۶) که در آن آنتی-

## یافته‌ها

نتایج بیوسنتر نانو ذرات نقره و طیف سنجی مرئی- فرابینفس: در اثر احیای یون‌های نقره، و تولید نانو ذرات، تغییر رنگ نمونه از زرد کمرنگ به قهوه‌ای یا خرمایی اولين نشانه سنتز نانو ذرات نقره می‌باشد (شکل ۱).

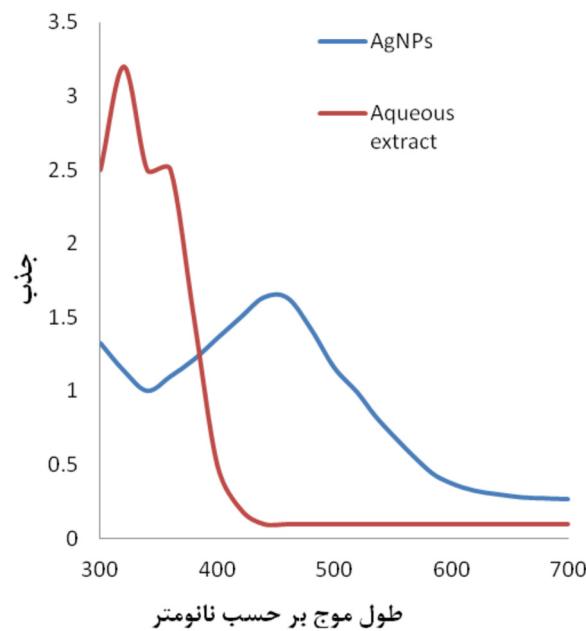
شکل ۲، نشان دهنده نتایج طیف سنجی مرئی- فرابینفس می‌باشد و همانطور در شکل دیده می‌شود، محلول حاوی نانوذرات نقره در محدوده ناحیه ۴۳۰ نانومتر ماکزیمم جذب را نشان می‌دهد که وجود پیک در ناحیه مورد نظر، دلیلی برای سنتز نانوذرات نقره می‌باشد چون پیک تشکیل شده در طول موج ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر، نشان دهنده تشکیل نانو ذرات نقره و مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانو ذرات نقره می‌باشد که به القای الکترون آزاد در نانو ذرات نسبت داده می‌شود (۲۶). آنالیز با دستگاه پراش اشعه ایکس: از دیگر آزمون‌هایی که جهت تایید تولید نانو ذرات استفاده شده پراش اشعه ایکس بوده که اطلاعات جامعی درباره ترکیبات شیمیایی ارائه می‌دهد..

در شکل ۳، الگوی پراش اشعه ایکس X-ray diffraction (XRD) نانو ذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه شاهتره را نشان می‌دهد. اسکن توسط دستگاه پراش پرتوی ایکس با زاویه اسکن ۲ تا و محدوده اسکن از ۵ تا ۹۰ درجه انجام شد. پیک‌های (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) در  $44/26^{\circ}$ ،  $38/20^{\circ}$  و  $64/43^{\circ}$  مربوط به ساختار مکعبی (Facecenter cubic) نانو ذرات نقره می‌باشد که با الگویی پراش اشعه ایکس نقره تطابق کامل را دارد. سایز کریستالی نانوذرات نقره از رابطه شر بده دست می‌آید.

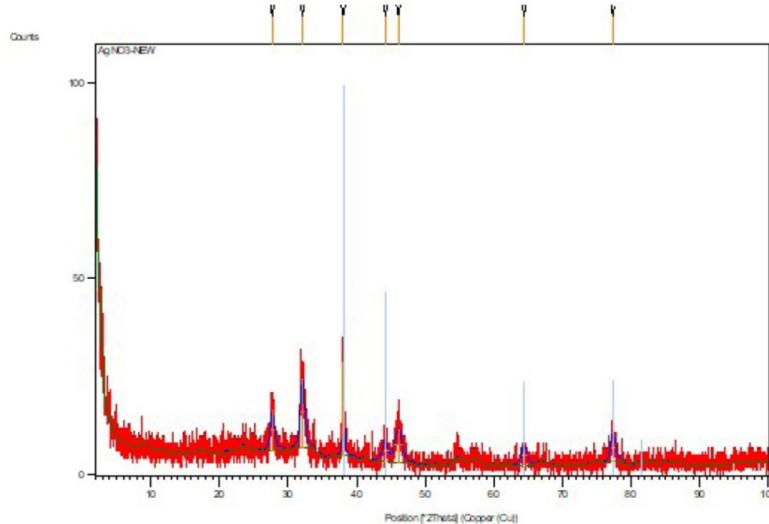
$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)}$$

که در رابطه فوق  $D = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)}$  فاکتور شکلی بوده،  $\lambda$  طول موج پرتو ایکس و معادل  $1/540.6$  آنگستروم می‌باشد و  $\beta$  پهنه‌ای کامل در نصف ماکزیمم پیک پراش،  $\theta$  زاویه مربوط به پیک پراش می‌باشد. از محاسبه این رابطه اندازه نانوذرات نقره ۳۰ نانومتر بدست آمد.

آنالیز با میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM (Scanning Electron Microscopic): به منظور بررسی



شکل ۲- طیف اسپکتروفوتومتر مرئی-فرابنفش عصاره آبی گیاه شاهتره و نانوذره نقره سترن شده

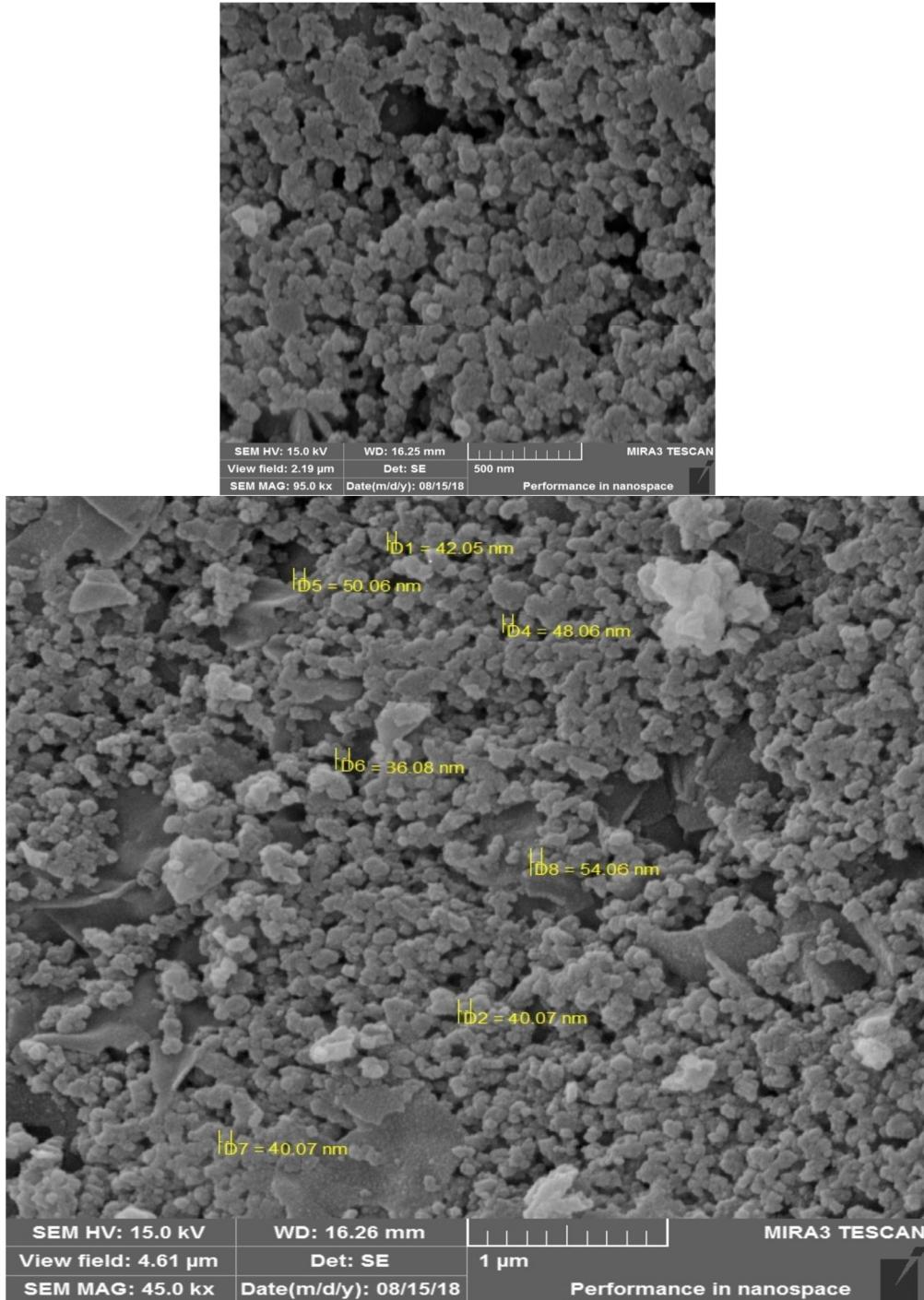


شکل ۳- الگوی پراش اشعه X نانوذره نقره سترن شده با عصاره آبی گیاه شاهتره

کشی MBC نانوذرات نقره بیوسنتر شده بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی به ترتیب ۱/۵۶ و ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید. جدول ۲ نتایج تعیین MIC و MBC نانوذرات نقره سترن شده با روش رقت لوله را نشان می دهد. حداقل غلظت بازدارندگی MIC نانوذره مورد نظر بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی به ترتیب ۱/۵۶ و ۳/۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت باکتری کشی MBC این نانوذرات بیوسنتر شده بر

بیوتیک قطره هاله عدم رشد بیشتری نسبت به غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سترن شده از عصاره گیاه چای سبز بر علیه باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و اشریشیاکلی را نشان داد (۲۷).

نتایج تعیین MIC و MBC روش میکرودایلوشن در جدول ۲ نشان داده شده است. حداقل غلظت بازدارندگی MIC نانوذره مورد نظر بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی به ترتیب ۰/۷۸ و ۳/۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت باکتری کشی MBC این نانوذرات بیوسنتر شده بر

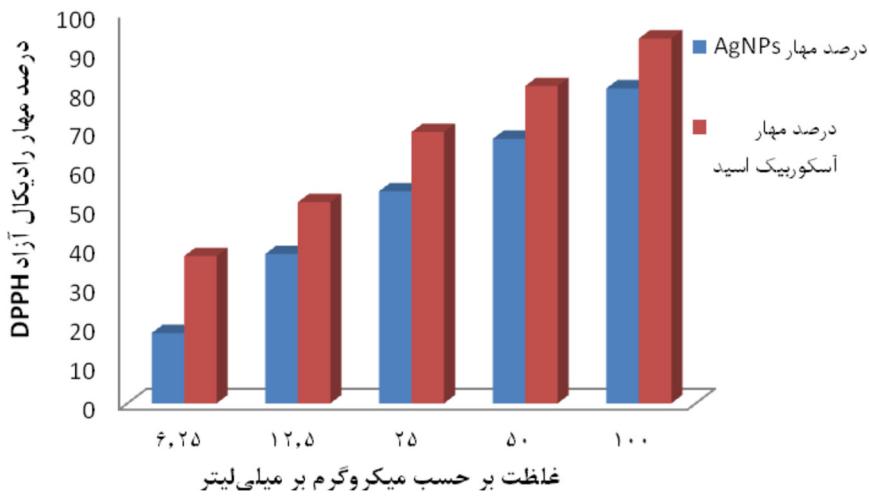


شکل ۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی رویشی از نانوذرات سنتز شده

نانوذرات نقره‌ای است که اثرات مهاری و ضد باکتریایی آن‌ها شناخته شده است. یون‌های نقره می‌توانند به گروه‌های دهنده الکترون مثل گلوکز، اکسیژن یا نیتروژن در مولکول زیستی متصل شوند (۲۱). نانوذرات نقره موجب از هم گستن اجزای ممانعت کننده موجود در غشای خارجی باکتری می‌شود که باعث آزاد

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشريشياکلی ۱/۵۶ و ۳/۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید.

**بحث و نتیجه‌گیری**  
سنتز نانو مواد در حال حاضر یکی از فعال‌ترین زمینه‌ها در علوم نانو است. یک مورد از نانو مواد،



**شکل ۵**- فعالیت مهار رادیکال های آزاد ۲-و-۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل تحت تأثیر نانوذرات سنتز شده از عصاره آبی گیاه شاهتره در مقایسه با کنترل مثبت استاندارد آسکوربیک اسید در غلظت های مختلف

**جدول ۱**- نتایج میانگین قطر هاله عدم رشد نانو ذرات سنتز شده با عصاره آبی گیاه شاهتره بر باکتری ها

Amikacin	Vancomycin	۲۵	۵۰	۱۰۰	µg/ml-Sample
۱۴±۰/۵	۲۲±۰/۶	۲۵±۰/۲۸	۲۶±۰/۳۴	۲۸±۰/۱۳	<i>S. aureus</i>
۲۱±۰/۳	۱۰±۰/۱۴	۱۱±۰/۶	۱۲±۰/۰۲۲	۱۵±۰/۷۵	<i>E. coli</i>

**جدول ۲**- نتایج تعیین MIC و MBC نانوذرات سنتز شده با عصاره آبی گیاه شاهتره بر روی باکتری ها

MBC µg/ml	MIC µg/ml	MBC µg/ml	MIC µg/ml	سویه های باکتری
۱/۵۶	۱/۵۶	۱/۵۶	۰/۷۸	استافیلوکوک اورئوس
۳/۱۲	۳/۱۲	۶/۲۵	۲/۱۲	اشریشیاکلی

حداقل غلظت های کشنندگی (MBC)، حداقل غلظت های بازدارندگی (MIC)

شوند (۳۰). گیاهان به دلیل وجود متابولیت های ثانویه از جمله فنول و فلاونوئید، دارای فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی بوده و برای جلوگیری از آسیب های اکسیداتیو سلول ها عمل می کنند. برخی از گیاهان دارای توانایی بالقوه برای احیاء زیستی یون های  $\text{Ag}^+$  به  $\text{Ag}^0$  را دارا بوده و سبب تولید نانوذراتی با خاصیت آنتی اکسیدانی می شوند (۳۱).

به همین دلیل در سال های اخیر بیوسنتز نانو ذرات به وسیله گیاهان و میکرو اگانیسم، به عنوان روش زیست سازگار و سبز مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است.

در این پژوهش نحوه سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه شاهتره و خواص آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی نانوذرات سنتز شده مورد

شدن تصاعدی مولکول های نظیر لیپوپلی ساکارید و پورین از سیتوپلاسم می شود. نانو نقره پس از نفوذ به داخل سلول باکتری آنزیم های آن را غیر فعال کرده و با تولید هیدروژن پراکسید باعث مرگ باکتری می شود (۲۸).

روش های مختلفی برای سنتز نانو ذرات وجود دارد اما روش های فیزیکی و روش های شیمیایی به دلیل ایجاد آلودگی های زیست محیطی می توانند با روش های سبز که در آن مواد با اثرات زیان بار محیطی کمتری تولید یا مصرف می شوند، جایگزین گردند (۲۹). همچنان مطالعات نشان داد که یون های نقره تولید گونه های فعال اکسیژن از جمله رادیکال آئینون سوپراکسید را به شدت افزایش می دهند و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول ها و در سطوح مولکول ها، اندام ها و کل سلول

نقره تولید شده از عصاره برگ گیاه سلمک با استفاده از آزمایش DPPH سنجش گردید. قدرت مهار نانو ذره در غلظت  $5 \text{ میلی‌گرم بر لیتر}$   $12 \pm 0.27$  و با افزایش غلظت تا  $20 \text{ میلی‌گرم بر لیتر}$   $18 \pm 0.43$  گزارش شد. این امر نشان دهنده اثر آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت نانو ذرات نقره بود و نتایج پژوهش ما نشان داد که قدرت مهار نانوذره سنتز شده از عصاره آبی گیاه شاهتره در غلظت  $6 \pm 0.25 \text{ میکروگرم بر میلی‌لیتر}$   $16 \pm 0.17$  و با افزایش غلظت تا  $100 \text{ میلی‌گرم بر لیتر}$   $17 \pm 0.51$  گزارش شد که در سطح  $p < 0.05$  دارای اختلاف معنی ار است و با نتایج سایر مطالعات هم مطابقت دارد (۳۵، ۳۶).

نتایج بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده از عصاره آبی گیاه شاهتره نشان داد که فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده با افزایش غلظت نانوذرات افزایش می‌یابد به طوری که در غلظت  $100 \text{ میکروگرم بر میلی‌لیتر}$  بر علیه استافیلوکوک اورئوس و اشريشياکلي ميانگين قطر هاله عدم رشد به ترتيب برابر  $13 \pm 0.28$  و  $15 \pm 0.75 \text{ را نشان دادند}$ .

در مطالعه‌ای که توسط Rafi shaik و همکاران در صورت گرفت نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه *Origanum vulgare* بر علیه استافیلوکوک اورئوس و اشريشياکلي به ترتيب قطر هاله عدم رشد  $18 \text{ میلی‌متر}$  و  $16 \text{ میلی‌متر}$  را نشان دادند (۱۸). همچنان نيكبحت و همکاران (۲۲) اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه عناب را مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه عناب ميانگين قطر هاله عدم رشد  $13 \text{ میلی‌متر}$  و  $6 \text{ میلی‌متر}$  را به ترتيب بر علیه استافیلوکوک اورئوس و اشريشياکلي نشان داند.

در مطالعه‌ای که توسط Brian و همکاران انجام شد، نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه *Moringa adefara* ميانگين قطر هاله عدم رشد  $14 \pm 0.15$  و  $12 \pm 0.15$  را به ترتيب بر علیه استافیلوکوک اورئوس و اشريشياکلي نشان داد. همچنان نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه *Murray akoingii* بر علیه استافیلوکوک اورئوس و اشريشياکلي ميانگين قطر هاله

بررسی قرار گرفت. در این پژوهش تغییر رنگ مشاهده شده از زرد کمرنگ به قهوه‌ای تیره در اثر برهمنکنش عصاره گیاهی و محلول نمک نقره کاملاً با نتایج حاصل از پژوهش Reddy و همکاران (۷) مشابه بوده و اولین نشانه از تولید نانو ذرات نقره محسوب می‌شود. نقره در حالت توده‌ای دارای پیک جذبی در طول موج  $316 \text{ نانومتر}$  است. در حالی که پیک تشکیل شده در طول موج  $400 \text{ تا } 450 \text{ نانومتر}$  نشان دهنده تشکیل نانو ذرات نقره و مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانو ذرات نقره می‌باشد که به القای الکترون آزاد در نانو ذرات نسبت داده می‌شود. در این پژوهش، وجود پیک نانو ذرات نقره در طول موج  $430 \text{ با نتایج حاصل از}$  پژوهش سایر محققین هم خوانی داشت (۳۲).

الگوی XRD نانوذرات سنتز شده چهار پیک مجزا در زوایای  $111$ ،  $200$ ،  $220$  و  $311$  را نشان می‌دهد که با نتایج حاصل از پژوهش سایر محققین هم خوانی دارد (۵، ۱۴، ۲۸).

با توجه به ضرورت شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و طبیعی به منظور جلوگیری از استرس اکسیدانتیو و اثرات مخرب آن‌ها، یکی دیگر از اهداف این مطالعه بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی نانوذرات سنتز شده بود که نتایج این بررسی نشان داد که نانوذرات سنتز شده قادر به حذف رادیکال‌های آزاد  $-O_2^-$  و  $-OH$ - پیکریل هیدرازیل می‌باشد به این صورت که با دریافت یک الکترون یا رادیکال آزاد هیدروژن به یک مولکول پایدار تبدیل شد. کاهش جذب در  $517 \text{ نانومتر}$  و تغییر رنگ محلول از بنفش به زرد نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده از گیاه شاهتره دارای توانایی انتقال هیدروژن به اکسیدان و خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند به طوری که و نتایج نشان داد که خواص آنتی‌اکسیدانی نانو ذرات سنتز شده وابسته به غلظت آن‌ها است و با افزایش غلظت فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. نانو ذرات نقره با  $IC_{50}$  برابر با  $21 \text{ میکروگرم بر میلی‌لیتر}$  در مقایسه با آنتی‌اکسیدان استاندارد آسکوربیک اسید با  $IC_{50}$  برابر با  $12 \text{ میکروگرم بر میلی‌لیتر}$  فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار خوبی را نشان دادند که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (۳۳). در مطالعه‌ای که عبدالعزیز و همکاران (۳۴) انجام دادند نشان داده شد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانو ذرات

ذرات نقره از عصاره گیاه شاهتره به جهت استفاده از منابع زیست محیطی بی خطر به عنوان یک روش سبز محسوب می‌گردد و بسیاری از مزایایی این روش مانند زیست سازگاری، مقرون به صرفه بودن، اجتناب از حضور حلال‌های سمی، زائد و فعالیت ضد میکروبی و سایر کاربردهای زیست پزشکی اجازه می‌دهد تا این روش در مقایس بزرگ تجاری بکار رود.

### تقدیر و تشکر

از همکاران گروه زیست شناسی و معاونت محترم پژوهش و فن آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد به خاطر حمایت مادی و معنوی در اجرای این کار پژوهشی تشکر و قدردانی می‌گردد.

### References

1. Sintubin L, De Windt W, Dick J, Mast J, van der Ha D, Verstraete W, et al. Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Appl Microbiol Biot*; 2009. 84(4):741-91.
2. Mukherjee A, Roy M, Mandal BP, Dey GK, Mukherjee PK, Ghatak J, et al. Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *asperellum*. *Nanotechnology*; 2008. 19(7):075103.
3. Ahmad N, Sharma S. Green synthesis of silver nanoparticles using extracts of *Ananas comosus*. *GSC*; 2012. 2(04):141.
4. Shankar SS, Rai A, Ankamwar B, Singh A, Ahmad A, Sastry M. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. *Nature Mat*; 2004. 3(7):482.
5. Allafchian AR, Jalali AH, Aghaei F, Farhang HR. Green synthesis of silver nanoparticles using *Glaucium corniculatum* (L.) Curtis extracts and evaluation of its Antibacterial activity. *IET Nanobiotechnol*; 2018. 12(5): 574-578.
6. Vithya K, Sen S. 'Biosynthesis of nanoparticles'. *Int J Pharm Sci Res*; 2011. 2:2781-2785.
7. Reddy NJ, Nagoor Vagoor Vali D, Ranimand Rani Ss. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by *piper longum* fruit mater. *Sci Eng C mater Biol*; 2014. 1(34):115-122.
8. Elemike E, Onwudiwe DC, Ekennia A, Jordaan

عدم رشد به ترتیب برابر با  $0/14 \pm 0/35$  و  $0/35 \pm 0/25$  را نشان دادند. همچنین نتایج حاصل از پژوهش آنها نشان داد که استافیلوکوک اورئوس نسبت به اشريشياکلی حساسیت بیشتری نسبت به نانوذرات نقره سنتزه شده نشان داد (۳۷).

بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده از عصاره آبی گیاه شاهتره به وسیله روش‌های انتشار دیسک، میکرودایلوشن و رقت لوله نشان داد که استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشريشياکلی از حساسیت بیشتری برخوردار بود که با نتایج پژوهش Arokiyaraj و همکاران (۱۵) نیز مطابقت دارد (۳۸). در مطالعه‌ای که توسط Tripathi و همکاران (۱۰) انجام شد نتایج نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس گرم مثبت، نسبت به اشريشياکلی گرم منفی در مقابل نانو ذره، حساس‌تر بوده و در غلظت‌های کمتری از نانو ذرات نابود شده‌اند یکی از علل حساسیت پایین‌تر اشريشياکلی می‌تواند به این دلیل باشد که غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی چون اشريشياکلی بطور غالباً از لیپو-پلی-ساکارید (LPS) مستحکم تشکیل شده‌اند که سد مقاومی در برابر نانو ذره محسوب می‌شود. در این مطالعه مشخص شد که میزان غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری‌ها بسته به نوع باکتری متفاوت بوده و باکتری گرم مثبت حساسیت بیشتری دارند و این حساسیت می‌تواند مربوط به نوع دیواره باکتری‌های گرم مثبت باشد (۳۹).

در مطالعه‌ای Kim و همکاران (۴۰) اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره را بر اشريشياکلی و استافیلوکوکوس اورئوس و مخمر مطالعه کردند با توجه به این نکته که اشريشياکلی در دسته باکتری‌های گرم منفی مواجه است، لذا دیرتر از باکتری‌های گرم مثبت به نانو ذرات پاسخ می‌دهند. همچنین Dallas و همکاران (۲۱) گزارش کردند که متغیرهای نوع باکتری، زمان تماس و غلظت نانو ذرات نقره عوامل موثر بر بروز خاصیت ضدباکتریایی آن است.

باتوجه به عوارض آنتی بیوتیک‌ها و از طرفی، تولید و نگهداری خیلی ارزان‌تر و ساده‌تر نانو ذرات نقره از داروهای رایج، می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنها باشد. روش استفاده شده در این پژوهش برای سنتز نانو

- A. Synthesis and characterisation of silver nanoparticles using leaf extract of *Artemisi aafra* and them in vitro antimicrobial and antioxidant activities. IET Nanobiotechnol; 2018. 12(6):722-726.
9. Phull AR, Abbas O, Ali A, Raza H, Jakim S, Zia M, et al. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from crude extract of *Bergenia ciliata*. Future J Pharm Sci; 2016. 3:1-36.
10. Sharma NC, Sahi SV, Nath S, Parsons JG, Gardea-Torresde JL, Pal T. Synthesis of plant-mediated gold nanoparticles and catalytic role of biomatrix-embedded nanomaterials. Environ Sci.Techol; 2007. 41(14):5137-42.
11. Marshall AT, Haverkamp RG, Davies CE, Parsons JG, Gardea-Torresde JL, van Agterveld D. Accumulation of gold nanoparticles in Brassic juncea. Int J Phytoremed; 2007. 9(3):197-206.
12. Narayanan KB, Sakthivel N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. Adv Colloid Inter Face; 2011. 169(2):59-79.
13. Vélez E, Campillo G, Morales G, Hincapié C, Osorio J, Arnache O. Silver Nanoparticles Obtained by Aqueous or Ethanolic *Aloe vera* Extracts: An Assessment of the Antibacterial Activity and Mercury Removal Capability. J Nanomater; 2018.1-7.
14. Kumar Sur U, Ankamwar B, Karmakar S, Halder A, Das P. Green synthesis of Silver nanoparticles using the plant extract of *Shikakai* and *Reetha*. Mater Today; 2018. 5(1);2321–2329
15. Prathap M, Alagesan A, Ranjitha Kumari BD. Anti-bacterial activities of silver nanoparticles synthesized from plant leaf extract of *Abutilon indicum* (L.) Sweet J Nanostruct Chem; 2014. 4:106
16. Azizian shermeh O, Valizadeh J, Noroozifar M, Qasemi A. [Bioproduction and effect of antibacterial of Ag nanoparticle by aqua extract Osare Aghti] . J Ilam Uni Med Sci 2015. 24(4). (persian)
17. Heydarzadeh S, Yaghoubi H. [Bioproduction and antibacterial of Ag nanoparticle by aqua extract Baharnarang]. RJMS 2017. 24(157); 15-24. (Persian)
18. Raffi Shaik M, Khan M, Kuniyil M, Al-Warthan A, Alkhathlan ZH, Siddiqui MR, et al. Plant-Extract-Assisted Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Origanum vulgare* L. Extract and Their Microbicidal Activities. Sustainability; 2018. 10:913.
19. Amin Gh. 'Traditional herbs of Iran. Research Deputy of the Ministry of Health and Medical Education; 1992. 1(5).
20. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nano toxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ Health Perspect; 2005. 113(7):823-39.
21. Dallas P, Sharma VK, Zboril R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: classification synthetic paths, applications, and perspectives. Adv Colloid Inter Face; 2011. 166(1-2):119-35.
22. Nikbakht M, Pour Ali P. [Biological Production and antibacterial effect of synthesized Ag with aqua extract and methanol anab]. Med Sci J Islam Azad Uni; 2015. 12(5):112-118. (Persian)
23. Jacob SJ, Finub JS, Narayanan A. Synthesis of silver nanoparticles using *Piper longum* leaf extracts and its cytotoxic activity against Hep-2 cell line. Colloids and Surf B Biointer Faces; 2012. 91:212-4.
24. Karimi j, Mohsenzade S. [Production of nanoparticle of Ag with Daroee *Bomadara*]. Razi J Med Sci; 2013. 20(111):64-69. (Persian)
25. Ajitha B, Reddy YA, Reddy PS. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Lantana camara* leaf extract. Mat Sci Eng R; 2015. 49:373-81.
26. Jegadeeswaran P, Shivaraj R, Venkatesh R. Green synthesis of silver nanoparticles from extracts of *Padina tetrastromatica* leaf. Digest. Dig J Nanomaterial Bios; 2012. 7(3):991 – 998
27. Etemadi M, Mohebbi-Kalhor D, Azizian Sherme O, Qasemi A. [Photosyntetize of nanoparticle of Ag with aqua extract of green tea and antibacterial effect]. J Fasa Uni Med Sci 2017. 7: 39-52. (Persian)
28. Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. Biotechnol Adv; 2013. 31(2):346-56.
29. Gnanasangeetha D, Thambavani DS. One pot synthesis of zinc oxide nanoparticle chemical and green method. Razi J Med Sci; 2013. 1:1-8
30. Bunghez I. Antioxidant silver nanoparticles green synthesized using ornamental plants. J Adv Mat; 2012. 14:1016-22.
31. Gorbani P, Hamidalamdari D, namvar F, Yaghmaei P. [Charactrization of antioxidant of nanoparticle aqua somagh with green method]. J Ilam Uni Med Sci 2015. 23(7); 181-189. (Persian)
- 32.Haji Rastamloo B, Ziyani R, Omrani Sh. Biosynthesis of silver nanoparticles by using *Salvia officinalis* extract and evaluation of antioxidant activity and Their antimicrobials against bacteria of food corruption. J Food Sci Technol; 2018. 11(2):108-118.
- 33.Inbatha Y, Mizhlponnu TM, Mare E. Evaluation if antioxidant and anticancer potential of morinda pubescens synthesized Silver nanoparticle. J Pharmees; 2013. 6:328.
34. Abdelaziz MS, Elnekeety AA, Abdelwahhab MA. Antioxidant and antibacterial activity of Silver nanoparticles biosynthesizes using *chenopodium murale* leaf extract. J Saudi Chem Soc; 2014. 18:536.
35. Sudha A, Jeyakanthan J, Srinivasan P. Green synthesis of silver nanoparticles using *Lippia nodiflora* aerial and evaluation of their antioxidant,

antibacterial and cytotoxic effects. Res Eff Tech; 2017. 3:506-515.

36. Phull AR, Abbas Q, Ali A, Rasa H, Kim SJ, Zia M, et al. Antioxidant cytotoxic and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from crude extract of *Bergenia* ciliate. Future J Pharm Sci; 2016. 2:31-36.

37. Brian MO, hemachitra P, Deepa R, selvi VS. synthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity from *Moringa Oleifera*, *murraya Koingii* and *Ocimum sanctum* against *E.Coli* and *S.aureus*. Der Pharmacia Lettre; 2016. 8(10):150-160.

38. Arokiyaraj S, Vincent S, Saravanan M. Green synthesis of silver nanoparticles using *Rheum Palmatum* root extract and Their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Artif Cells Nanomed Biotechnol; 2016. 45(2):372-379.

39. Tripathi RM, Saxena A, Gupta n, Kapoor H, Sing RP. High antibacterial activity of silver nanoballs against *E.Coli* MTCC 1302, *S.Typhimurium* MTCC 1254, *B. Subtilis* MTCC 1133 and *P. Aeruginosa* MTCC 2295. Digest J Nanomater Biostruct; 2010. 5:323-330.

40. Kim JK, YuK P, Lee H. Antimicrobial effect of silver nano particles. Nano Medicine; 2007. 3(1):95-101.