



سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه شاه‌تره و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن

بهرز دوستی: استادیار، گروه زیست شناسی، واحد خرم آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران (*نویسنده مسئول) 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، خرم‌آباد، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

نانو ذرات نقره،
شاه‌تره،

ضدباکتریایی،

آنتی‌اکسیدان

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 سنتز سبز نانو ذرات نقره از عصاره گیاه شاه‌تره و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی آن در قیاس با دو آنتی بیوتیک 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 روبشی مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت خواص آنتی‌اکسیدانی و خواص ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده با استفاده از روش ۲-۲-دی فنیل-۱-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 میکروداپلوشن و رقت در لوله تعیین شد.

یافته‌ها: نانو ذرات نقره سنتز شده بیشترین جذب را در ۴۳۰ نانومتر نشان دادند و دارای شکل کروی و میانگین اندازه آن‌ها بین ۵۰-۱۰۰ نانومتر بود. نانوذرات سنتز شده دارای خواص آنتی‌اکسیدانی با IC_{50} برابر با ۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. نتایج بررسی‌های ضدباکتریایی نشان داد که نانو ذرات نقره سنتز شده، فعالیت ضدباکتریایی بیشتری بر علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس نسبت به باکتری گرم منفی اشریشیاکلی داشتند.

نتیجه‌گیری: عصاره شاه‌تره قادر به احیای یون Ag^+ به نانوذرات نقره می‌باشد. همچنین نانوذرات نقره سنتز شده دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی مناسبی می‌باشند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۰۷

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۵/۱۲

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](https://creativecommons.org/licenses/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 AgNO₃ 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 IC₅₀ 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⁺ 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

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 (۲۱). شیمی سبز یک روش پژوهش یا بداعی است که شامل بخش کاربردی برای طراحی، توسعه و تولید کارآمد محصولات می‌شود که توان به حداقل رساندن مواد خطرناک برای سلامت را دارا می‌باشند. هدف پروژه‌های 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 ضد میکروبی 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 ضد میکروبی، ضد سرطانی 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، ارزان، غیرسمی بودن و تولید نانو ذرات با خلوص بالا اشاره کرد (۱۰). سوخت و سازهای ثانویه گوناگون، آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و اسانس‌ها، 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

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 Corniculatum* (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 ضد میکروبی آن‌ها وجود دارد. به عنوان مثال نتایج مطالعات عزیزیان شرمه و همکاران از نانوذرات سنتز شده از عصاره آبی گیاه آقطنی (۱۶)، حیدرزاده و همکاران از نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه بهارنارنج (۱۷) و Rafi Shaik و همکاران از نانوذرات سنتز شده از عصاره گیاه مرزنجوش (۱۸)، نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده از این گیاهان رشد باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوک 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، گلیکوزیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، استروئیدها، تریترپروئیدها، فنل‌ها، آلکالوئیدها و آنتراکینون‌ها را نشان داد (۲۰). مطالعات فارمولوژیکی نشان داد که گیاه شاه‌تره دارای اثرات آرامبخشی، ضد درد، ضد التهابی، 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 ضدباکتریایی نانو ذرات سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت.

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 تأیید گیاه‌شناسی در مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان لرستان به عنوان گونه *F. Parviflora* از خانواده شقایق‌یان 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 ارلن به ۱۰۰ میلی‌لیتر 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 سانتی‌گراد نگهداری گردید (۲۲).

سنتز نانوذرات نقره: ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره مورد نظر به ۹۰ میلی‌لیتر نیترات نقره (شرکت مرک کشور آلمان) ۱ میلی‌مولار 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 قهوه‌ای تیره تا سیاه نشان دهنده تولید نانو ذرات نقره است (۲۴). سپس عصاره‌های حاوی نانوذرات با دور ۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتی‌فیوژ شد. رسوب به دست آمده در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت خشک گردید. نانوذرات نقره بدست آمده جهت مطالعه‌ی بیشتر در داخل میکروتیوب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۵).

طیف‌سنجی فرابنفش/مرئی (UV-Vis): ۲۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی عصاره و نیترات نقره‌ها به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده و سپس توسط طیف‌سنجی فرابنفش/مرئی طول موج ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر بررسی گردید.

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

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

$$\text{جذب نمونه}$$

شبکه کریستالی و اندازه نانوذرات سنتز شده استفاده شده است. نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از دستگاه XRD، ولتاژ ۴۰ KV و جریان ۴۰ mA 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 12000 دور در دقیقه (rpm) سانتی‌فیوژ شد و از رسوب حاصل توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره عکسبرداری شد به این صورت که نانوذرات بر روی توری مسی پوشیده شده از کربن ثابت شدند و پس از خشک کردن با لامپ مادون قرمز، عکس‌برداری با دقت ۲/۳۲ آنگستروم انجام شد.

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی نانوذره نقره سنتز شده از گیاه شاه‌تره: فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره با استفاده از مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل 2-2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (شرکت سیما آلد ریچ کشور آمریکا) ارزیابی شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده و آسکوربیک اسید به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد در لوله آزمایش جداگانه ریخته و سپس به هر کدام ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی ۰/۱ میلی‌مولار از DPPH (مقدار ۲ میلی‌گرم از DPPH با متانول به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر 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 اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش 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 ۵۰ (half maximal inhibitory concentration) IC_{50} بود، محاسبه گردید (فرمول ۱). بدیهی است که هر چه این عدد کوچک‌تر باشد قدرت آنتی‌اکسیدانی یا مهار رادیکال‌های آزاد، بیشتر می‌باشد و کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

فرمول ۱- نحوه محاسبه درصد مهار رادیکال

جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی نانوذره MBC (Minimum Bactericidal concentration)، از چاهک‌های فاقد کدورت که در آنها رشد مهار شده بود به کمک لوپ استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و در دمای 37°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 برات 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 $10^8 \times 1/5$ Cfu/ml از سوسپانسیون باکتری استافیلوکوک اورئوس و اشرشیاکلی به صورت جداگانه به هر لوله تلقیح شد و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C درجه انکوبه شدند. آنگاه کدورت لوله‌ها به صورت چشمی خوانده شد و رشد یا عدم رشد باکتری در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

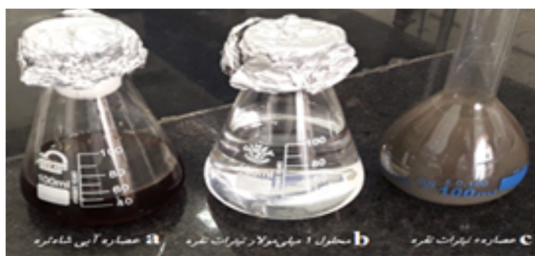
جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی نانوذره (MBC)، از لوله‌های فاقد کدورت که در آنها رشد مهار شده بود به کمک لوپ استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. کم‌ترین غلظتی از نانوذره که هیچ باکتری در آن زنده نمانده به عنوان MBC در نظر گرفته می‌شود.

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 در سطح احتمال ($P < 0.05$) صورت گرفت. از نرم‌افزار Spss و پرایش ۱۶ برای آنالیز آماری و Excel برای رسم نمودار استفاده شد.

بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده به روش انتشار دیسک: سویه‌های باکتریایی استاندارد استافیلوکوک اورئوس (ATCC ۶۵۳۸) و اشریشیاکلی (ATCC ۱۱۳۰۳) روی مولر هینتون آگار در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند، سپس غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره سنتز شده در آب دیونیزه (100 ، 50 ، 25 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 37°C درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش می‌گردد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آمیکاسین، وانکومايسين ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (شرکت پادتن طب) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

بررسی حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC Minimum inhibitory concentration) به روش میکرودايلوشن: در این روش با استفاده از میکرو پلیت 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 ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات ریخته شد. به لوله اول به مقدار $100 \mu\text{l}$ نانوذرات نقره با غلظت 10^8 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 نانو ذره در هر لوله نصف لوله ماقبل است. چاهک آخر حاوی ۹۵ میکرولیتر مولر هینتون برات و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی ولی فاقد ترکیب مورد آزمایش بود این چاهک به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. غلظت نهایی چاهک ۲۰۰ میکرولیتر بود. سپس به تمام چاهک‌ها به غیر از چاهک شماره ۱۲، $5 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون باکتریایی معادل $10^8 \times 1/5$ Cfu/ml تلقیح شد پس از بسته شدن درب، میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C درجه انکوبه شدند. آنگاه کدورت چاهک‌ها به صورت چشمی خوانده شد و رشد یا عدم رشد باکتری در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها



شکل ۱- تغییرات رنگ عصاره در حضور نیترات نقره. (a) عصاره آبی شاه‌تره (b) محلول ۱ میلی 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 ۵۰، (IC₅₀) نانوذرات سنتز شده ۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

هم‌چنین نتایج نشان داد که نانو ذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه شاه‌تره دارای خاصیت ضدباکتریایی بیشتری بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به باکتری گرم منفی اش‌ریشیاکلی می‌باشد. بیش‌ترین هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره سنتز شده و کمترین هاله عدم 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 وانکومایسین 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 اش‌ریشیاکلی بیشتر از میانگین قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک وانکومایسین می‌باشد که در $p < 0.05$ دارای اختلاف معنی‌دار است و البته قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک آمیکاسین 3 ± 0.21 میلی‌متر می‌باشد و قدرت مهار بیشتر آن را در قیاس با غلظت‌های مختلف نانوذره سنتز شده مذکور نشان می‌دهد که با نتایج مطالعات اعتمادی و همکاران (۱۳۹۶) که در آن آنتی

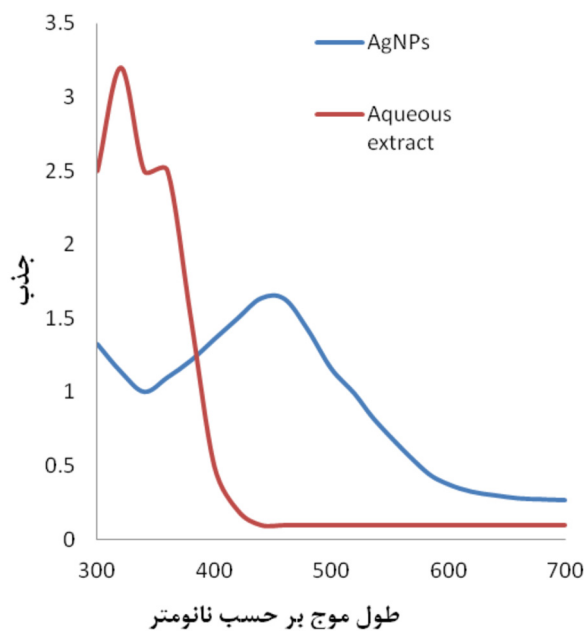
نتایج بیوسنتز نانو ذرات نقره و طیف سنجی مرئی-فرابنفش: در اثر احیای یون‌های نقره، و تولید نانو ذرات، تغییر رنگ نمونه از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای یا خرمایی اولین نشانه سنتز نانو ذرات نقره می‌باشد (شکل ۱).

شکل ۲، نشان دهنده نتایج طیف سنجی مرئی-فرابنفش می‌باشد و همانطور در شکل دیده می‌شود، محلول حاوی نانوذرات نقره در محدوده‌ی 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 2θ ۳۸/۰۷۰، ۴۴/۲۶۰، ۶۴/۴۳۰ و ۷۷/۳۵۰ 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 شرر به دست می‌آید.

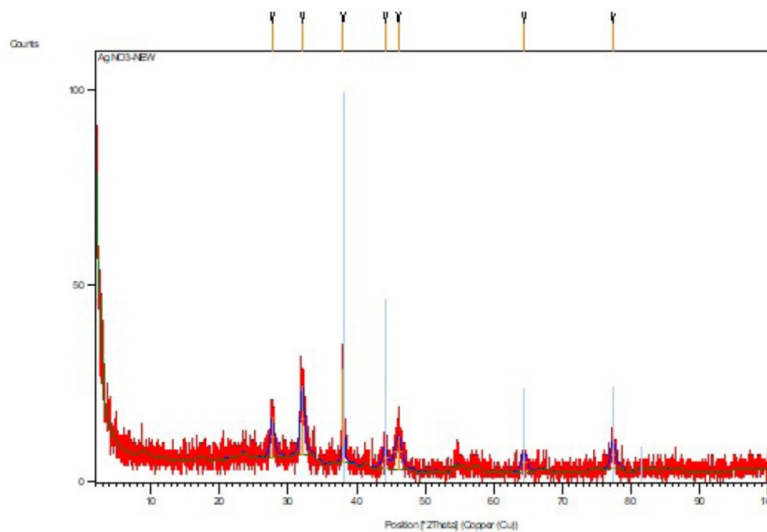
$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)}$$

که در رابطه فوق $K = 0.9$ فاکتور شکلی بوده، λ طول موج پرتو ایکس و معادل 1.5406 آنگستروم می‌باشد و β پهنای کامل در نصف ماکزیمم پیک پراش، θ 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 اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش عصاره آبی گیاه شاه‌تره و نانوذره نقره سنتز شده

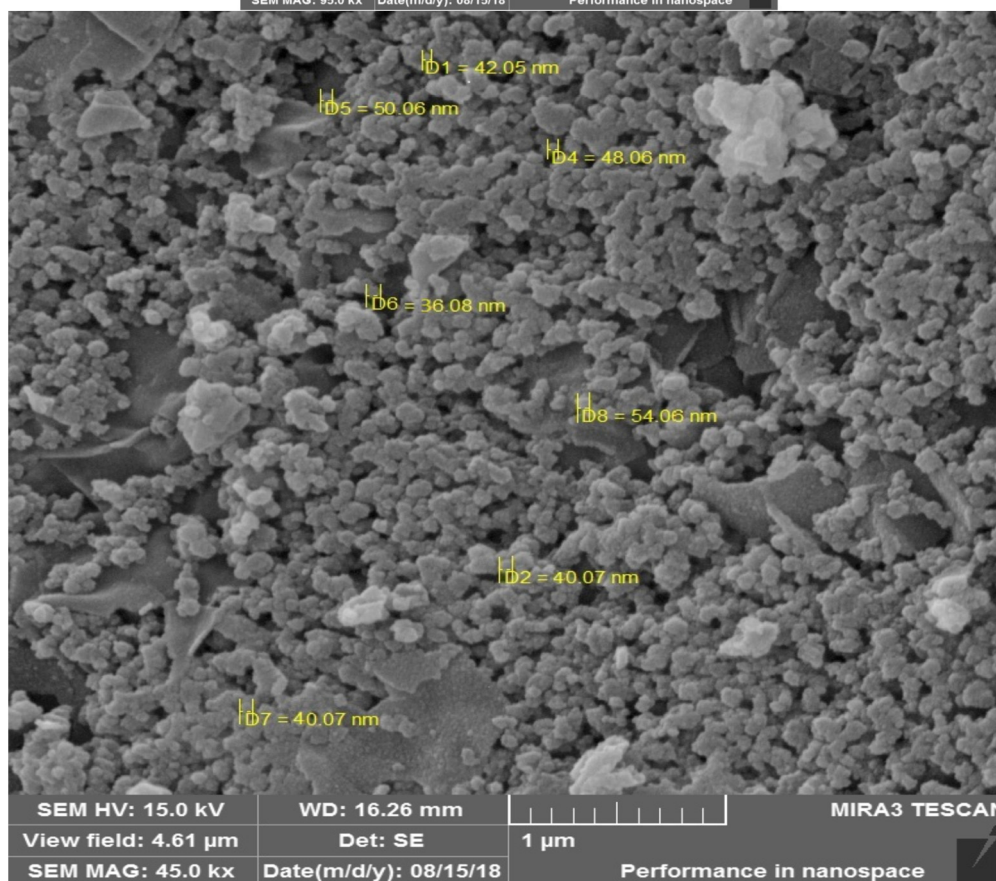
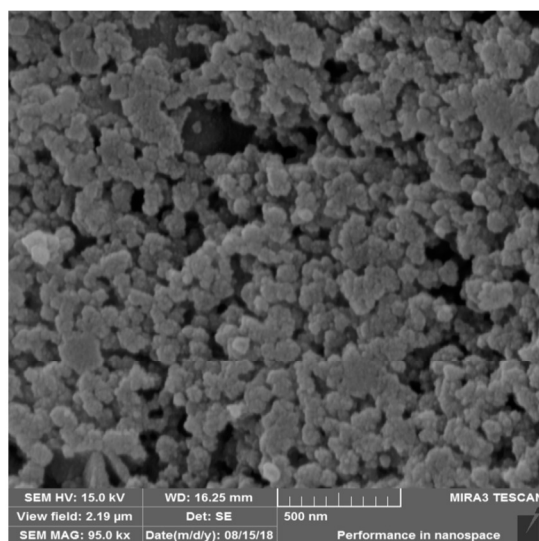


شکل ۳- الگوی پراش اشعه X نانوذره نقره سنتز شده با عصاره آبی گیاه شاه‌تره

کشی MBC نانو ذرات نقره بیوسنتز شده بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشیشیاکلی به ترتیب ۱/۵۶ و ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید. جدول ۲ نتایج تعیین MIC و MBC نانوذرات نقره سنتز شده با روش رقت لوله را نشان می‌دهد. حداقل غلظت بازدارندگی MIC نانوذره مورد نظر بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشیشیاکلی به ترتیب ۱/۵۶ و ۳/۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت باکتری کشی MBC این نانوذرات بیوسنتز شده بر

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

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



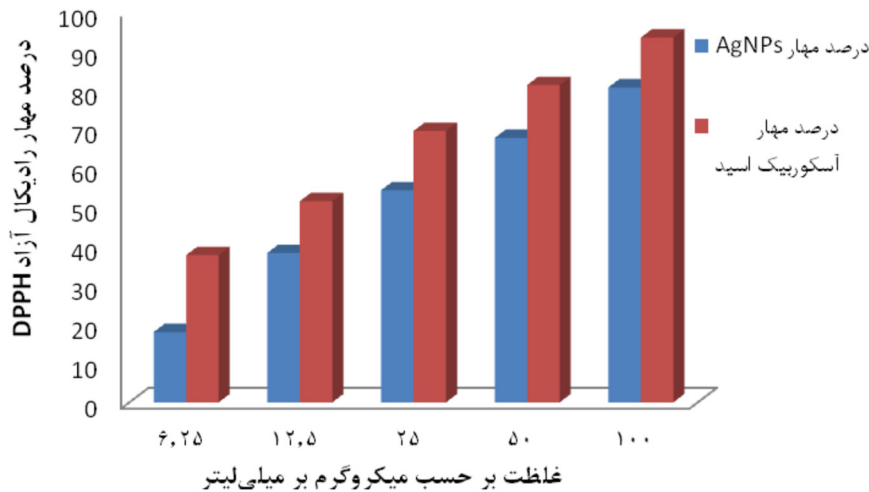
شکل ۴- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات سنتز شده

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

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

بحث و نتیجه گیری

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



شکل ۵- فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد ۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل تحت تأثیر نانوذره سنتز شده از عصاره آبی شاه‌تره در مقایسه با کنترل مثبت استاندارد آسکوربیک اسید در غلظت‌های مختلف

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

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 باکتری‌ها

روش رقت لوله		روش میکروداپلوشن		سویه‌های باکتری
MBC µg/ml	MIC µg/ml	MBC µg/ml	MIC µg/ml	
۱/۵۶	۱/۵۶	۱/۵۶	۰/۷۸	استافیلوکوک اورئوس
۳/۱۲	۳/۱۲	۶/۲۵	۳/۱۲	اشریشیاکلی

حداقل غلظت‌های کشندگی (MBC)، حداقل غلظت‌های بازدارندگی (MIC)

شوند (۳۰). گیاهان به دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه از جمله فنول و فلاونوئید، دارای فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بوده و برای جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو سلول‌ها عمل می‌کنند. برخی از گیاهان دارای توانایی بالقوه برای احیاء زیستی یون‌های Ag^+ به Ag^0 را دارا بوده و سبب تولید نانوذراتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (۳۱).

به همین دلیل در سال‌های اخیر بیوسنتز نانو ذرات به وسیله گیاهان و میکروارگانیسم، 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 آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده مورد

شدن تصاعدی مولکول‌های نظیر لیپوپلی‌ساکارید و پورین از سیتوپلاسم می‌شود. نانو نقره پس از نفوذ به داخل سلول باکتری آنزیم‌های آن را غیر فعال کرده و با تولید هیدروژن پراکسید باعث مرگ باکتری می‌شود (۲۸).

روش‌های مختلفی برای سنتز نانو ذرات وجود دارد اما روش‌های فیزیکی و روش‌های شیمیایی به دلیل ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی می‌توانند با روش‌های سبز که در آن مواد با اثرات زیان‌بار محیطی کمتری تولید یا مصرف می‌شوند، جایگزین گردند (۲۹). هم‌چنین مطالعات نشان داد که یون‌های نقره تولید گونه‌های فعال اکسیژن از جمله رادیکال آنیون سوپراکسید را به شدت افزایش می‌دهند و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول‌ها و در سطوح مولکول‌ها، اندام‌ها و کل سلول

بررسی قرار گرفت. در این پژوهش تغییر رنگ مشاهده شده از زرد کم‌رنگ به قهوه‌ای تیره در اثر برهمکنش 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 جذب در طول موج ۳۱۶ نانومتر است. در حالی که پیک تشکیل شده در طول موج ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر، نشان دهنده تشکیل نانو ذرات نقره و مربوط به رزونانس پلاسما 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 ۴۳۰ با نتایج حاصل از پژوهش سایر محققین هم‌خوانی داشت (۳۲).

الگوی XRD نانوذرات سنتز شده چهار پیک مجزا در زوایای ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ را نشان می‌دهد که با نتایج حاصل از پژوهش سایر محققین هم‌خوانی دارد (۵، ۱۴، ۲۸).

با توجه به ضرورت شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و طبیعی به منظور جلوگیری از استرس اکسیداتیو 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 $2O_2$ -دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل می‌باشد به این صورت که با دریافت یک الکترون یا رادیکال آزاد هیدروژن به یک مولکول پایدار تبدیل شد. کاهش جذب در ۵۱۷ 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 ۲۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با آنتی‌اکسیدان استاندارد آسکوربیک اسید با IC_{50} برابر با ۱۲ 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

نقره تولید شده از عصاره برگ گیاه سلمک با استفاده از آزمایش DPPH سنجش گردید. قدرت مهار نانو ذره در غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر $0.12 \pm 0.27/13$ و با افزایش غلظت تا ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر $0.18 \pm 0.43/65$ 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 $0.25/6$ میکروگرم بر میلی‌لیتر $0.16/17 \pm 0.89$ و با افزایش غلظت تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر $0.17 \pm 0.51/80$ گزارش شد که در سطح $p < 0.05$ دارای اختلاف معنی‌ار 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 ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر علیه استافیلوکوک اورئوس و اشریشیاکلی میانگین قطر هاله عدم رشد به ترتیب برابر با $0.13/28 \pm 0$ و $0.15/75 \pm 0$ را نشان دادند.

در مطالعه‌ای که توسط Rafi shaik و همکاران صورت گرفت نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه *Origanum vulgare* بر علیه استافیلوکوک اورئوس و اشریشیاکلی به ترتیب قطر هاله عدم رشد ۱۸ میلی‌متر و ۱۶ میلی‌متر را نشان دادند (۱۸). هم‌چنین نیکبخت 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 میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۳ میلی‌متر و ۶ میلی‌متر را به ترتیب بر علیه استافیلوکوک اورئوس و اشریشیاکلی نشان دادند.

در مطالعه‌ای که توسط Brian و همکاران انجام شد، نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه *Moringa adefera* میانگین قطر هاله عدم رشد $0.14/15 \pm 0.15/7$ را به ترتیب بر علیه استافیلوکوک اورئوس و اشریشیاکلی نشان داد. هم‌چنین نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه *Murray akingii* بر علیه استافیلوکوک اورئوس و اشریشیاکلی میانگین قطر هاله

ذرات نقره از عصاره گیاه شاه‌تره به جهت استفاده از منابع زیست محیطی بی‌خطر 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 مقایسه بزرگ تجاری بکار رود.

تقدیر و تشکر

از همکاران گروه زیست‌شناسی و معاونت محترم پژوهش و فن‌آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد 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. Vithiya 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, Onwujiwe DC, Ekennia A, Jordaan

عدم رشد به ترتیب برابر با 0.14 ± 13 و $0.35 \pm 7/25$ را نشان دادند. همچنین نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که استافیلوکوک اورئوس نسبت به اش‌ریشیاکلی حساسیت بیشتری نسبت به نانوذرات نقره سنتز 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 اش‌ریشیاکلی از حساسیت بیشتری برخوردار بود که با نتایج پژوهش Arokiyaraj و همکاران (۲۰۱۵) نیز مطابقت دارد (۳۸). در مطالعه‌ای که توسط Tripathi و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد نتایج نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس گرم مثبت، نسبت به اش‌ریشیاکلی گرم منفی در مقابل نانو ذره، حساس‌تر بوده و در غلظت‌های کمتری از نانو ذرات نابود شدند یکی از علل حساسیت پایین‌تر اش‌ریشیاکلی می‌تواند به این دلیل باشد که غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی چون اش‌ریشیاکلی بطور غالب از لیپو پلی‌ساکارید (LPS Lipopolysaccharide) مستحکم تشکیل شده‌اند که سد مقاومی در برابر نانو ذره محسوب می‌شود. در این مطالعه مشخص شد که میزان غلظت ممانعت‌کننده 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 اش‌ریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس و مخمر مطالعه کردند با توجه به این نکته که اش‌ریشیاکلی 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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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 ciliate*. 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.Technol; 2007. 41(14):5137-42.
11. Marshall AT, Haverkamp RG, Davies CE, Parsons JG, Gardea-Torresdey JL, van Agterveld D. Accumulation of gold nanoparticles in Brassica 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 Bahamarang]. RJMS 2017. 24(157); 15-24. (Persian)
18. Rafi Shaik M, Khan M, Kuniyil M, Al-Warthan A, Alkhatlan 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 Darooee *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, Venckatesh 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-Kalhari D, Azizian Shermeh 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.