

Investigating the antioxidant properties and antimicrobial activity of green synthesis of silver nanoparticle by using the aqueous extract of *Hypericum perforatum*

Fahimeh Najafi¹, Zahra Shafiei²

¹Department of chemistry, School of Science and Agriculture, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

²Assistant Professor of Microbial Biotechnology, Department of Biology, Ro.C., Islamic Azad University, Roudehen, Iran

Abstract

Background: Today, antibiotic resistance against bacteria causing infection is very common and biological production of nanoparticles is a suitable alternative. In the present study, the synthesis of silver nanoparticle of *Hypericum perforatum* plant and its antioxidant and antibacterial properties were investigated in comparison with antibiotic gentamicin.

Materials and methods: After collecting plant and preparing the aqueous extract, 1 mM silver nitrate was added for nanoparticle synthesis. The effect of pH parameters and silver nitrate concentration for the optimization of green nanoparticle was evaluated by spectrophotometry and SEM. Antioxidant properties were investigated by DPPH and ABTS free radical methods. Finally, the antibacterial properties of the above nanoparticle were determined by diffusion method in agar and minimum growth inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC).

Results: Silver nanoparticles from *Hypericum perforatum* extract showed highest absorption at 430 nm. Silver salt concentration and alkaline pH had an effect on its quantity. It is worth mentioning that resulting nanoparticle has antioxidant properties so that depending on concentration it has an inhibitory effect on free radicals with ABTS and DPPH methods; in these two methods by increasing concentration from 40 mg/ml to 250 mg/ml, amount of free radical inhibition increases and value of IC₅₀ at concentration of 40 mg/ml with ABTS and DPPH methods is 34.7±0.27 and 47.4±0.59, respectively. The examination of results of antibacterial properties, shown that synthesized silver nanoparticles had the most antibacterial activity against standard strains of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*, respectively.

Conclusion: *Hypericum perforatum* extract is able to regenerate Ag⁺ ion and silver nanoparticles. Super nanoparticle has acceptable antioxidant and antimicrobial power.

Keywords: *Hypericum perforatum*, Silver Nanoparticles, Antimicrobial, Antioxidant, Green Synthesis.

Cited as: Najafi F, Shafiei Z. Investigating the antioxidant properties and antimicrobial activity of green synthesis of silver nanoparticle by using the aqueous extract of *Hypericum perforatum*. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2025; 35(1): 24-34.

Correspondence to: Zahra shafiei

Tel: +98 9121536775

E-mail: zahrashafiei@iau.ac.ir; shafieezahra641@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-8017-1368

Received: 15 Apr 2024; **Accepted:** 15 Jun 2024

بررسی خواص آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی نانوذره نقره سبز سنتز شده از عصاره آبی گیاه راعی

فهمیمه نجفی^۱، زهرا شفیعی^۲

^۱ گروه شیمی، دانشکده علوم پایه و کشاورزی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
^۲ استادیار بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه مقاومت آنتی بیوتیکی در برابر باکتری های مولد عفونت بسیار شایع و تولید زیستی نانوذرات جایگزین مناسبی است. مطالعه حاضر، سنتز نانوذره نقره گیاه راعی و خواص آنتی اکسیدانی و ضدباکتریایی آن در مقایسه با آنتی بیوتیک جنتامایسین بررسی شد. **روش بررسی:** بعد از جمع آوری گیاه و تهیه عصاره آبی، نیترات نقره ۱ mM جهت سنتز نانوذره اضافه شد. تأثیر پارامترهای pH و غلظت نیترات نقره برای بهینه سازی نانوذره سبز به روش اسپکتروفتومتری و SEM/ارزیابی شد. خواص آنتی اکسیدانی با روش های رادیکال آزاد DPPH و ABTS بررسی شد. در نهایت، خواص ضد باکتری نانوذره فوق به روش انتشار در آگار و حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کش (MBC) تعیین شد.

یافته ها: نانوذرات نقره با عصاره گیاه راعی بیشترین جذب را در ۴۳۰ nm نشان داد. غلظت نمک نقره و pH قلیایی بر کمیت آن تأثیر داشت. خواص آنتی اکسیدانی نانوذره حاصل با روش های ABTS و DPPH وابسته به غلظت بود. نتایج نشان داد با افزایش غلظت از ۴۰ mg/mL به ۲۵۰ mg/mL میزان مهار رادیکال آزاد افزایش یافته و مقدار IC_{50} با روش های فوق در غلظت ۴۰ mg/mL، به ترتیب $7/27 \pm 34/0$ و $4/59 \pm 47/0$ mg/mL بود. نتایج نشان داد نانوذرات نقره سنتز شده بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را به ترتیب علیه سویه های استاندارد لیستریا منوسایتوزنز، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا انتریکا دارد.

نتیجه گیری: عصاره راعی قادر به احیای یون Ag^+ و نانوذرات نقره است. نانوذره فوق قدرت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی قابل قبولی دارد. **واژگان کلیدی:** گیاه راعی، نانو ذره نقره، ضد میکروبی، آنتی اکسیدان، سنتز سبز.

مقدمه

از آنجایی که عفونت های بیمارستانی و مقاومت آنتی بیوتیکی یکی از مهم ترین مشکلات در حوزه پزشکی در سراسر دنیا به شمار می آید، برای حل این مشکل از روش های مختلفی استفاده می شود. سنتز سبز نانو ذرات فلزی به ویژه نقره کاربرد زیادی در علوم مختلفی مانند داروسازی، پزشکی، مهندسی پزشکی و سلامت دارد.

باکتری های مختلفی موجب بروز عفونت های بیمارستانی می شوند، از جمله می توان به استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی، سالمونلا و انتروباکتر جداسده از نمونه ها اشاره کرد. این باکتری ها با سازوکارهای مختلفی از جمله ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک، تشکیل بیوفیلم و غیره می توانند موجب عفونت های بیمارستانی شوند. از آنجاکه این باکتری ها بالقوه به آنتی بیوتیک ها مقاوم هستند و به راحتی در محیط اطراف باقی می مانند، بنابراین در بروز بیماری و مرگ و میر در افراد مستعد نقش دارند. تاکنون تلاش های بی شماری برای مقابله با این عفونت ها انجام گرفته است (۱،۳)؛ از آن جمله می توان به استفاده از

آدرس نویسنده مسئول: رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، دانشکده علوم پایه و کشاورزی، گروه زیست شناسی، زهرا شفیعی (email: shafieezahra641@gmail.com; zahrashafiei@iau.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0001-8017-1368

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱/۲۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۳/۲۶

گیاهان دارویی و شیمی سبز و نیز سنتز سبز نانو ذرات اشاره کرد. شیمی سبز یک روش پژوهش نوین است که شامل طراحی، توسعه و تولید کارآمد محصولات است که باعث به حداقل رساندن مواد مضر و آسیب‌رسان به سلامت انسان می‌شوند. هدف پروژه‌های فناوری سبز جدید، به حداقل رساندن خطرات احتمالی کاربرد نانو برای انسان و محیط زیست است (۳). نانو ذرات حاصل از روش‌های شیمیایی که امروزه کاربرد زیادی دارند- به دلیل کاربرد مواد شیمیایی خطرناک و سمی بودن آنها و آسیب‌هایی که برای محیط زیست ایجاد می‌کنند- نگرانی‌های زیادی را ایجاد کرده‌اند. نانو فناوری زیستی یکی از امیدوارکننده‌ترین حوزه‌های علم و فناوری نانو در عصر جدید است (۴). نانو ذرات به دلیل ویژگی‌های خاص از جمله اندازه و شکل تأثیر عمده‌ای بر تمام جنبه‌های زندگی انسان دارند و در میان آنها نانو ذرات 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 مهم‌ترین این نانو ذرات می‌توان به ذرات نقره اشاره کرد. نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولیدمثل میکروارگانیسم‌ها اثر می‌گذارد (۲،۴). در بررسی‌های مختلف نانو ذرات نقره به‌طور مؤثر باعث مهار سیستم تنفسی و تکثیر باکتری‌ها می‌شوند که در نهایت منجر به از بین رفتن میکروارگانیسم می‌شوند. با توجه به توانایی بالای این عنصر در میکروب‌زدایی، روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای سنتز نانو ذرات نقره ارائه شده‌اند (۷-۹). در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان به‌عنوان منابع پایدار و در دسترس برای تهیه نانو ذرات زیست سازگار، موردتوجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است و از مزایای این روش می‌توان به سازگار بودن آن با محیط زیست، غیرسمی و مقرون به صرفه بودن و تولید نانو ذرات با خلوص بالا اشاره کرد (۱۰). سوخت‌وسازهای ثانویه گوناگون، آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و اسانس‌ها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، فنول‌ها، تانن‌ها، اسیدها، ویتامین‌ها، ترکیبات رنگی، سولفور، رزین‌ها و ترپن‌ها در تهیه نانو ذرات فلزی به‌وسیله گیاهان نقش اساسی دارند (۱۱). در سال‌های اخیر، استفاده از عصاره گیاهان برای تهیه نانو ذرات فلزی به‌عنوان جایگزین آسان و مناسب روش‌های شیمیایی و فیزیکی مطرح شده‌اند (۱۲)؛ از آن جمله می‌توان به سنتز زیستی نانو ذرات نقره به‌وسیله گیاهانی از جمله عصاره آبی و الکلی آلوئه ورا، عصاره آبی

بخش هوایی گیاه شقایق شاخ‌دار (Glaucium corniculum)، عصاره آبی برگ گیاه شیکاکی و بسیاری از گیاهان دیگر اشاره کرد (۱۳، ۱۴).

گیاه راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* گیاهی علفی، گل‌دار و پایا از تیره گل‌راعیان است که معمولاً به‌صورت خودرو در کشتزارهای گندم و ذرت یافت می‌شود. این گیاه در ایران، با نام‌های علف چای، گل راعی یا هزار چشم، هوفاریقون خوانده می‌شود. راعی از لحاظ ریخت‌شناسی، گیاهی علفی است که معمولاً به طول ۸۰ تا ۱۰۰ سانتیمتر می‌رسد. این گیاه دارای برگ‌های تخم‌مرغی شکل و گل‌های زردرنگ با پنج گلبرگ و پرچم‌های بیرون زده و شاخه‌های جفت و متقابل است. برگ‌های آن روبه‌روی هم بوده و بی‌پایه (چسبیده) است و تا ۲ cm بلندی دارد.

در بررسی فیتوشیمیایی گیاه راعی مشخص شد که مواد مؤثر موجود در این گیاه، شامل هایپرفورین و هایپرسیکین است. این گیاه جزء گیاهان دارویی محسوب می‌شود و اثرات درمانی زیادی دارد که از مهم‌ترین آنها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: مهار آنزیم، کاهش سلول‌های پیر و مرده، افزایش تعداد سلول‌های فیبروبلاست و گرانول‌های کلاژن موجود در آن‌ها، بازیابی ساختار آسیب‌دیدهٔ اپیدرم شده با تحریک تمایز کراتینوسیت‌ها و ساختن کراتین، اثرات ضد افسردگی، خاصیت ضدالتهابی و آنتی باکتریال (۲۱).

با توجه به ویژگی‌های این گیاه، در این پژوهش بر آن شدیم تا برای اولین بار سنتز سبز نانو ذرات نقره را با استفاده از عصاره آبی گیاه راعی و خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی آن موردبررسی قرار دهیم.

مواد و روشها

جمع‌آوری گیاه راعی و تهیه عصاره آن

در این مطالعه گیاه راعی در اواخر بهار از شهرستان گنبدکاووس جمع‌آوری و سپس با همکاری هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات شناسایی و تأیید شد و مشخص شد این گیاه از خانواده Hypericaceae است.

پس از تمیز کردن و شستشوی گیاه، در سایه خشک و سپس آسیاب شد. برای عصاره‌گیری از پودر گیاه راعی به روش خیساندن استفاده شد؛ به این صورت که ۵۰ g از پودر گیاه خشک‌شده به ۵۰۰ mL آب دیونیزه اضافه شد و سپس درون

برای سنجش اندازه و شکل نانو ذرات نقره از دستگاه میکروسکوپ الکترونی (Zeiss - EMIO) استفاده شد. برای این منظور رسوب به دست آمده از نانوذره سه بار با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتیفریوژ شد و رسوب حاصل با میکروسکوپ الکترونی روبشی عکسبرداری شد؛ برای این کار نانو ذرات بر روی توری مسی پوشیده شده با کربن ثابت شدند و بعد از خشک کردن با لامپ مادون قرمز، عکسبرداری با دقت $32/2 \text{ \AA}$ انجام شد. در نهایت بهترین نانوذره از لحاظ اندازه و شکل انتخاب شد.

طیف سنجی با دستگاه اسپکتروفتومتر

برای سنجش کیفی پایدارکننده‌های اطراف نانو ذرات نقره سنتز شده از گیاه راعی، طیف جذبی محلول‌ها با اسپکتروفتومتر فرابنفش - مرئی در محدوده ۲۰۰-۸۰۰ nm ثبت و بهترین نانو ذره انتخاب شد.

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی نانوذره نقره سنتز شده از گیاه راعی

بهترین روش برای سنجش توان آنتی‌اکسیدانی، اندازه‌گیری مهار رادیکال‌های آزاد است. در این مطالعه از دو روش مهار رادیکال آزاد ABTS و DPPH استفاده شد؛ در این دو روش رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS احیا می‌شوند و رنگ آن‌ها تغییر می‌کنند، به‌طوری‌که، تغییر رنگ در روش DPPH از ارغوانی به زرد و در روش ABTS از سبز به زرد است (۲۲، ۲۳) در نتیجه ترکیباتی که می‌توانند قابلیت احیای رادیکال آزاد را داشته باشند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در نظر گرفته می‌شوند.

اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال آزاد DPPH

روش DPPH یکی از روش‌های رایج برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی است، زیرا حساسیت بالایی دارد؛ در این روش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانو ذرات نقره با استفاده از مهار رادیکال آزاد DPPH (۲ و ۲- دی فنیل - ۱ پیکریل هیدرازیل ۲-۲) (شرکت سیگما - آلد ریچ، آمریکا) ارزیابی می‌شود که هیدروژن توسط رادیکال آزاد DPPH جذب می‌شود و باعث تغییر رنگ از ارغوانی به زرد می‌شود؛ در نتیجه کاهش میزان جذب در طول موج ۵۱۷ nm را باعث می‌شود (۱). برای این کار، ابتدا ۱۱ mg پودر DPPH در ۲۰ mL اتانول حل شد و به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. سپس غلظت‌های مناسبی از نانو ذره عصاره گیاه راعی (۲۵۰-۴۰ $\mu\text{g/mL}$) تهیه و حجم‌های مساوی از رادیکال آزاد DPPH به آن

حمام بخار به مدت ۱۰۰ دقیقه قرار داده شد تا عصاره اولیه جدا شود. در نهایت عصاره آبی با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک و فیلتر سرنگی فیلتر شد و در لوله فالتون در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۲).

سنتز نانو ذرات نقره و بررسی ویژگی‌های آن

بدین منظور ۱۰ mL از عصاره آبی گیاه راعی به ۹۰ mL نیترات نقره (شرکت مرک، آلمان) ۱ mM اضافه شد و به‌منظور احیای یون‌های نقره، محلول تهیه شده در دمای اتاق و در شرایط تاریکی به مدت یک شبانه‌روز نگهداری شد (۱۷). تغییر رنگ عصاره از زرد کمرنگ به قهوه‌ای تیره تا سیاه نشان‌دهنده تولید نانو ذرات نقره است (۱۸)؛ سپس عصاره حاوی نانو ذرات با سانتیفریوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور در ثانیه به مدت ۲۰ دقیقه خالص‌سازی شد. رسوب به‌دست‌آمده برای تهیه پودر نانو ذرات در آون ۷۰ سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت خشک شد. نانو ذرات نقره به‌دست‌آمده برای مطالعه بیشتر در داخل میکروتیوب در دمای ۴ سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۹).

بررسی دو پارامتر مؤثر بر سنتز نانو ذرات نقره

تأثیر pH

برای بهینه‌سازی مقدار pH پنج سری محلول حاوی ۲ mL عصاره و ۴ mL محلول نمک نیترات نقره با غلظت ۱ mM تهیه شد و پس از تنظیم pH (۳، ۹-۶)، حجم نهایی محلول در بالن حجمی به ۵۰ mL رسانده شد. طیف اسپکتروفتومتری محلول‌های حاوی نانوذره سبز سنتز شده ارزیابی و pH بهینه تعیین شد. برای تنظیم pH محلول از یکی از دو محلول NaOH یا HCl با غلظت ۰/۱ M استفاده شد (۱۵، ۱۶).

تأثیر غلظت نمک نیترات نقره

برای بررسی تأثیر غلظت یون نقره (۱) ۴ mL از غلظت‌های متفاوت محلول نیترات نقره (۵-۴/۰ mM) به عصاره گیاه راعی افزوده شد و پس از تنظیم pH بهینه، حجم نهایی محلول واکنش به ۵۰ mL رسانده شد. طیف فرابنفش محلول‌های ساخته شده با دستگاه اسپکتروفتومتری سنجیده شد و غلظت بهینه انتخاب شد (۱۶، ۲۰).

بررسی کیفی نانوذره سنتز شده

در این پژوهش، بعد از سنتز و بهینه‌سازی دو پارامتر مؤثر، ویژگی نانوذرات با دو روش زیر به‌طور دقیق مورد بررسی قرار گرفت.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopic):

اضافه شد؛ شاخص IC_{50} نشان دهنده میزان مهار رادیکال آزاد است (۱۸،۲۴).

ارزیابی میزان مهار رادیکال آزاد ABTS

سرعت واکنش پذیری ABTS با ترکیبات آنتی اکسیدانی بیشتر از رادیکال های آزاد است زیرا رادیکال آزاد ABTS فعال تر از DPPH است و به همین علت این روش به طور گسترده استفاده می شود. در روش ABTS، رادیکال آزاد با استفاده از پتاسیم پرسولفات تولید می شود و میزان مهار رادیکال ها به وسیله ترکیبات آنتی اکسیدانی بررسی می شود. بیشترین رادیکال تولید شده در طول موج ۷۳۴ nm است و در صورت مهار شدن رادیکال میزان جذب در این طول موج کاهش می یابد.

برای این کار، ابتدا محلول های پایه شامل ABTS (۷ mM) و پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ mM) تهیه شد و در ادامه محلول اصلی ABTS به وسیله مخلوط کردن دو محلول پایه به مقدار مساوی تهیه شده و برای تکمیل واکنش این مخلوط در دمای اتاق و محیط تاریک به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شد. محلول تهیه شده برای رسیدن جذب نوری به 0.02 ± 0.07 در طول موج ۷۳۴ nm با اتانول رقیق شد. به ۲ mL محلول تازه تهیه شده ABTS، ۰/۲ mL از غلظت های مختلف نانوذره عصاره و BHT اضافه شد و بعد از نگهداری به مدت ۶ دقیقه در تاریکی، جذب نوری نمونه ها در ۷۳۴ nm اندازه گیری شد؛ سپس درصد بازدارندگی نمونه ها محاسبه شد (۲۳،۱۵).

بررسی اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات سنتز شده به روش انتشار دیسک

سویه های باکتریایی استاندارد/استافیلوکوکوس/اورئوس (PTCC ۱۳۹۹)، *اشریشیا کلی* (PTCC ۱۱۱۲)، *لیستریا منوسایتوزنز* (PTCC ۱۲۹۸)، *سالمونلا انتریکا* (PTCC ۱۷۰۹) بر روی مولر هینتون آگار در دمای ۳۷ سانتی گراد رشد داده شدند. دیسک های ۶ mm بلانک (شرکت پادتن طب، ایران) استریل به غلظت های مختلف نانو ذرات نقره در آب دیونیزه ($12,60,300,1500 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) آغشته و در فور خشک شدند. سپس دیسک ها بر روی محیط کشت قرار داده شدند و بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ سانتی گراد، قطر هاله های عدم رشد اندازه گیری و بر حسب میلی متر گزارش شد. دیسک آنتی بیوتیک جنتامایسین $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ (شرکت پادش طب، ایران) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد (۱۴،۱۹).

بررسی حداقل غلظت مهار کننده رشد MIC (Minimum inhibitory concentration)

برای تعیین MIC از روش رقت در لوله استفاده شد. برای این کار، در هر یک از ۱۰ لوله استریل، ۱ mL محیط کشت مولر هینتون برات ریخته شد. سپس در لوله اول ۱ mL نانوذره ریخته شد و رقت سریال تهیه شد. سپس طبق استاندارد مک فارلند، $100 \mu\text{L}$ سوسپانسیون باکتری های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی*، *لیستریا منوسایتوزنز*، *سالمونلا انتریکا* به صورت جداگانه به هر لوله تلقیح شد (بعد از تهیه تک کلنی، مقداری از کلنی در سرم فیزیولوژی حل شد تا غلظت $10 \text{ CFU}/\text{mL}$ به دست آمد). شایان ذکر است سه لوله به عنوان شاهد تلقی شدند: لوله شماره ۸ حاوی محیط کشت اولیه و نانوذره نقره سنتز شده (بدون باکتری)؛ لوله شماره ۹ حاوی باکتری و محیط کشت (بدون نانوذره)؛ لوله شماره ۱۰ فقط حاوی محیط کشت (بدون باکتری و نانوذره نقره). سپس لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ سانتی گراد انکوبه شدند، آنگاه کدورت لوله ها به صورت چشمی خوانده شد و رشد یا عدم رشد باکتری در لوله ها بررسی شد (۱۱،۲۱).

تعیین حداقل غلظت کشندگی نانوذره (MBC)

برای تعیین MBC از لوله های فاقد کدورت که رشد باکتری در آنها مهار شده بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ سانتی گراد انکوبه شد. کمترین غلظت نانوذره نقره که هیچ باکتری در آن زنده نمانده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱،۵).

تحلیل آماری

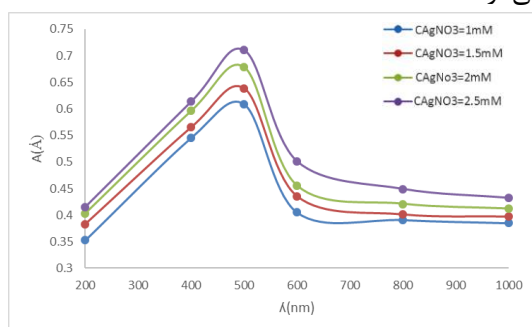
تمام آزمایش ها سه بار تکرار شد و مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد. تحلیل داده ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA - oneway) و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون t در سطح احتمال ($P < 0.05$) انجام شد و از نرم افزار SPSS و Excel برای رسم نمودار استفاده شد. شایان ذکر است پژوهش حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن مورد بررسی قرار گرفت و با شناسه اخلاق IR.IAU.R.REC.1403.006 تصویب شد.

یافته ها

بهینه سازی دو پارامتر مؤثر بر سنتز نانو ذرات

عصاره آبی گیاه راعی از عوامل احیا کننده و پایدار کننده نانو ذرات نقره است. در شکل ۱ اولین نشانه سنتز نانو ذره نقره، تغییر رنگ محلول از زرد به قهوه ای یا خرمایی است.

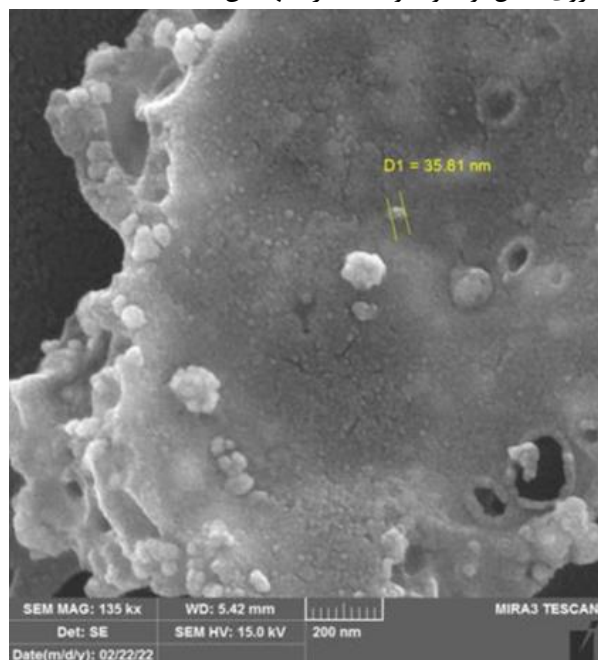
داشت و تا غلظت $2/5 \text{ mM}$ این افزایش ادامه داشت. این نتایج نشان می‌دهند غلظت 2 mM ، غلظت بهینه نمک برای سنتز نانو ذرات است.



نمودار ۲. طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانو ذرات سنتز شده در غلظت‌های متفاوت نیترات نقره

بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM

توزیع شکل و اندازه نانو ذرات نقره سنتز شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. همان‌طور که از شکل شماره ۲ برمی‌آید، نانو ذرات نقره سنتز شده با ارزیابی دو پارامتر بهینه، کروی شکل بوده و متوسط اندازه آنها بین $30 - 35 \text{ nm}$ است.



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با نانو ذرات نقره سنتز شده و دو فاکتور مؤثر بهینه

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره سنتز شده

با عصاره آبی گیاه راعی

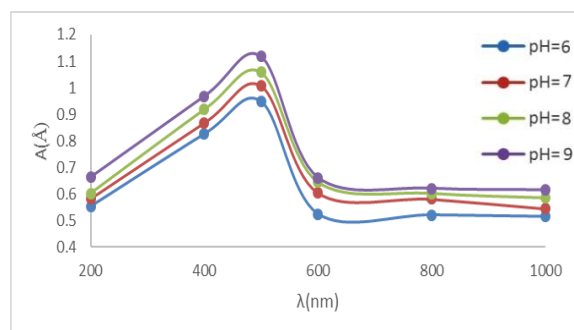
نتایج آزمون‌های ضد میکروبی نانو ذرات نقره سنتز شده با روش‌های دیسک دیفیوژن و تعیین MIC و MBC به ترتیب



شکل ۱. تغییر رنگ عصاره در مجاورت نیترات نقره (الف) عصاره آبی گیاه راعی (ب) محلول 1 mM نیترات نقره (ج) عصاره تیمار شده با نیترات نقره

تأثیر pH

در بررسی تأثیر pH بعد از مشاهده رنگ قهوه‌ای و اثبات سنتز نانو ذره، مقدار pH محصول حاصل توسط دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد ($\text{pH}=5/87$). به منظور مطالعه تأثیر فاکتور مهم pH بر سنتز نانو ذرات، pH های بالاتر و پایین‌تر از مقدار اولیه بررسی شد (نمودار ۱).



نمودار ۱. طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانو ذرات سنتز شده در pH های مختلف

همان‌طور که در نمودار ۱ مشخص است، با افزایش تدریجی میزان pH محلول، جذب محلول به صورت چشمگیری افزایش یافت، در نتیجه $\text{pH}=9$ به عنوان pH بهینه انتخاب شد.

تأثیر غلظت نمک نیترات نقره

طیف‌های ثبت شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی برای نانو ذرات نقره سنتز شده با غلظت‌های $1/5$ ، 2 ، $2/5$ ، 1 نیترات نقره آزمون شد. با توجه به نمودار ۲ با افزایش تدریجی میزان غلظت یون نقره، جذب در طول موج 200 nm افزایش چشمگیری

جدول ۱. قطر هاله عدم رشد میکروبی در غلظت‌های مختلف نانوذره نقره سنتز شده با روش دیسک دیفیوژن (بر حسب mm)

غلظت نانوذره (میکروگرم بر mL)	اندازه قطر هاله عدم رشد (mm)			
	لیستریا منوسایتوژنز	اشریشیا کلی	استافیلوکوکوس اورئوس	سالمونلا انتریکا
۱۲	۳/۰±۰۹/۲۲	۲/۴۸±۰/۲۶	۲/۰۲±۰/۸۷	۱/۶۹±۰/۴۳
۶۰	۳/۸۱±۰/۷۳	۲/۰±۸۹/۶۴	۲/۸۵±۰/۷۵	۲/۳۸±۰/۳۷
۳۰۰	۸/۰±۱۵/۵۷	۳/۷۱±۰/۳۸	۲/۴۱±۰/۷۲	۲/۸۳±۰/۶۵
۱۵۰۰	۱۸/۰±۶۷/۶۹	۷/۱۹±۰/۶۷	۷/۱۶±۰/۶۹	۷/۶۶±۰/۶۹
جنتامایسین (۲۵ µg/mL)	۳۴/۰±۸/۳۴	۱۶/۵۳±۰/۶۳	۱۴/۸۳±۰/۹۵	۱۱/۴۴±۰/۹۴

جدول ۲. تعیین نتایج MIC و MBC نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره آبی گیاه راعی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه

نوع باکتری	کمترین غلظت مهارکنندگی نانوذره نقره (µg/L) MIC	کمترین غلظت مهارکنندگی جنتامایسین (µg/L)	میزان MBC نانوذره نقره (µg/L)	میزان MBC جنتامایسین (µg/L)
لیستریا منوسایتوژنز	۱۶/۷	۸/۷۹	۱۶/۳	۱۲/۴
اشریشیا کلی	۱۲۱	۱۲۱	۱۱۸	۱۶۹
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۹۵	۹۲	۱۷۱	۱۲۰
سالمونلا انتریکا	۱۵۷	۴۲۵	۱۴۷	۴۲۷

جدول ۳. تجزیه واریانس به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی

منبع تغییرات	درجه آزادی	قطر هاله عدم رشد
باکتری	۳	۲۳۳/۹۵
غلظت نانو ذره	۴	۶۱۹/۴۵**
باکتری * غلظت نانو ذره	۱۲	۵۴/۰۸**
اشتباه آزمایشی	۴۰	۰/۰۰۸
CV% ضریب تغییرات		۱/۱۵

جدول ۴. فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS تحت تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی راعی در مقایسه با کنترل مثبت در غلظت‌های مختلف

غلظت (mg/mL)	درصد مهارکنندگی نانوذره نقره عصاره گیاهی راعی گرگان DPPH	درصد مهارکنندگی نانوذره نقره عصاره گیاهی راعی گرگان ABTS	درصد مهارکنندگی BHT
۴۰	۳۴/۷±۰/۲۷	۴۷/۴±۰/۵۱	۶۸/۷±۰/۲۵
۸۰	۵۱/۶±۰/۳۹	۵۵/۸±۰/۴۶	۱۰۹/۱۱±۰/۳۸
۱۶۰	۸۱/۱±۰/۴۵	۱۲۹/۳±۰/۱۵	۱۵۰/۴±۰/۶۶
۲۵۰	۱۶۹/۲۱±۰/۵۲	۲۱۶/۶±۰/۶۳	۲۳۹/۱±۰/۳۳

در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که نانو ذرات سنتز شده اثرات میکروب‌کشی بر روی چهار سویه استاندارد مورد آزمایش دارد. بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری لیستریا منوسایتوژنز (۱۸/۰±۶۷/۶۹ mm) و در غلظت ۱۵۰۰ µg/mL نانو ذرات نقره سنتز شده است. همچنین سه سویه دیگر با اختلاف کمی در همین غلظت

بیشترین قطر هاله عدم رشد را نشان دادند (۷/۳۰ mm). میانگین قطر هاله عدم رشد نانو ذرات نقره سنتز شده در تمام غلظت‌ها در باکتری‌های لیستریا منوسایتوژنز، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا انتریکا در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین کمتر بود. با توجه به جدول ۳ اثر غلظت نانو ذرات نقره و اثر متقابل آنها بر قطر هاله عدم رشد، در سطح ۱٪ معنی‌دار است.

جدول ۲ نتایج تعیین MIC و MBC نانو ذرات نقره را با روش رقت لوله نشان می‌دهد. حداقل غلظت بازدارندگی نانو ذره نقره مورد پژوهش بر باکتری‌های لیستریا منوسایتوزنز، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا انتریکا به ترتیب $1.6/7 \mu\text{g/mL}$ ، 1.21 ، 1.95 ، 1.57 و حداقل غلظت باکتری‌کشی MBC این نانو ذرات سنتز شده بر باکتری‌های لیستریا منوسایتوزنز، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا انتریکا به ترتیب $1.6/3 \mu\text{g/mL}$ ، 1.18 ، 1.71 ، 1.45 است.

آنالیز نتایج آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصل از خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانو ذرات سنتز شده با دو روش DPPH و ABTS در جدول ۴ نشان داده شده است.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، میزان مهار رادیکال آزاد ABTS با افزایش غلظت نانو ذرات نقره نسبت به BHT افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که در غلظت 40 mg/mL میزان مهار 70% و در غلظت 250 mg/mL میزان مهار به 90% می‌رسد.

همچنین نتایج حاصل از میزان مهار رادیکال آزاد DPPH نشان می‌دهد اگر غلظت نانو ذرات نقره افزایش یابد میزان مهار نیز افزایش می‌یابد. میزان مهار رادیکال آزاد نسبت به BHT در غلظت 40 mg/mL حدود 50% و در غلظت 250 mg/mL به 70% افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد افزایش اثر مهاری نانو ذرات نقره و رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت است.

مقایسه اثر مهاری نانو ذرات نقره بر رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH نشان داد این نانو ذرات قادر هستند رادیکال‌های آزاد ایجاد شده را تا حدودی مهار کنند و با افزایش غلظت، میزان مهار رادیکال‌های ABTS بیشتر از DPPH است.

بحث

ظهور رنگ قهوه‌ای در بیوسنتز نانو ذرات متعاقب واکنش با یون‌های نقره یک امر بدیهی است که نشانگر کاهش یون‌های فلزی و تشکیل نانو ذرات نقره است. این تغییر رنگ اولیه و تولید نانو ذره به‌صورت یک سوسپانسیون کلوئیدی ابزار مناسبی برای تشکیل نانو ذره نقره در مخلوط ترکیبات شیمیایی گیاهی به‌عنوان یک عامل کاهش‌دهنده و تثبیت‌کننده برای احیای یون‌های نقره است؛ که در نهایت سبب تولید نانو ذراتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۲۵).

از آنجایی که نانو ذرات فلزی ویژگی‌ها جالب‌توجه الکتریکی، شیمیایی و مغناطیسی از خود نشان داده‌اند و از لحاظ ساختمانی، پلی بین حالت جسم ماده و حالت اتمی یا مولکولی هستند مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲۶).

گیاه راعی یکی از گیاهان خودرو و بومی در شمال ایران است که به‌وفور در استان‌های گلستان و مازندران یافت می‌شود. همان‌طور که در بالا اشاره شد، بیوسنتز نانو ذرات فلزی بر پایه احیای زیستی عصاره گیاه به‌عنوان احیاکننده و پایدارکننده استفاده می‌شود؛ بنابراین بررسی پتانسیل عصاره آبی گیاه راعی می‌تواند راهکاری برای استفاده مؤثر از آن و روشی ارزان و زیست سازگار برای تولید نانو ذرات باشد.

در این تحقیق نشان داده شد که عصاره آبی گیاه راعی پتانسیل بالایی برای تولید نانو ذرات نقره دارد.

از آنجایی که تولید نانو ذرات به‌صورت یک مرحله‌ای و مقرون به‌صرفه و در زمان بسیار کم انجام می‌پذیرد، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران این حوزه قرار گرفته است. شایان ذکر است تغییر در رنگ محلول از شفاف به قهوه‌ای و همچنین افزایش میزان جذب محلول به دلیل احیای یون نقره و تجمع نانو ذرات است.

در این مطالعه، مهم‌ترین و مؤثرترین عوامل در سنتز نانو ذره نقره، از جمله دما و pH بررسی شد. در مطالعات قبلی، گزارش‌ها نشان‌دهنده این است که pH بر روی شکل نانو ذرات تأثیر چندانی نداشته و بیشترین تأثیر را روی اندازه نانو ذرات سنتز شده دارد (۲۷). نتایج تحقیقات گذشته در مورد عامل pH نشان می‌دهند که pH‌های خیلی بالا، یون‌های نقره را هیدرولیز می‌کند به‌طوری‌که موجب به وجود آمدن یون‌های پایدار هیدروکسید نقره می‌شود و در نتیجه از ورود این یون‌ها به واکنش زیستی ممانعت می‌شود.

پژوهش‌های متعددی تأثیر غلظت یون‌های فلزی بر سنتز نانو ذرات را اثبات کرده است. در این مطالعات نشان داده شده است که با افزایش غلظت یون‌های فلز، میزان جذب افزایش می‌یابد زیرا یون‌های بیشتری احیا می‌شوند و در نتیجه نانو ذرات بیشتری تولید می‌شوند. از طرفی، افزایش بیش‌ازحد غلظت یون نقره باعث چسبندگی نانو ذرات و افزایش اندازه این ذرات می‌شود که در نتیجه باعث کاهش بیش‌ازحد یا افزایش نامحسوس در مقدار جذب می‌شود (۲۸، ۲۹). در مطالعه حاضر، بهترین نانوذره سنتز شده از لحاظ شکل و اندازه در pH بهینه ۹ و غلظت $2/5 \text{ mM}$ ایجاد شد که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت داشت. عزیزیان و همکاران به بررسی پارامترهای مؤثر pH و غلظت نیترات نقره جهت بهینه نمودن

گوزمان و همکاران نشان دادند اثرات نانو ذرات نقره بر روی /شریشیا کلی بیشتر از /استافیلوکوکوس/اورئوس است که علت این یافته، تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است (۳۶) همچنین، دالاس و همکاران گزارش دادند نوع باکتری، زمان تماس و غلظت نانو ذرات نقره از جمله عوامل مؤثر برای بروز خاصیت ضد میکروبی است (۳۷).

از آنجایی که شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و سنتزی با توجه به مزیت و کاربردشان بسیار حائز اهمیت است از دیگر اهداف این پژوهش بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانو ذرات سبز سنتز شده بود و نتایج جالب توجهی نیز به دست آمد. نانو ذرات نقره سنتز شده از گیاه راعی، اثر مهاری مناسبی را بر رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS نشان دادند که وابسته به غلظت بوده، به‌طوری که در غلظت ۲۵۰ mg/mL میزان مهار رادیکال‌های آزاد به بیش از ۸۰ درصد افزایش یافت.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد خواص آنتی‌اکسیدانی نانو ذرات سنتز شده وابسته به غلظت آنهاست و با افزایش غلظت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. قدرت مهار نانو ذرات در غلظت ۴۰ mg/mL در DPPH و ABTS به ترتیب ۳۴٪/۷۵±۰/۲۷ و ۴۷٪/۴±۰/۵۱ بود و در غلظت ۲۵۰ mg/mL به ترتیب ۵۲٪/۲۱±۰/۵۲ و ۶۳٪/۶±۰/۱۶ بود که نشان داد اثر آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت نانو ذرات نقره است؛ این نتایج، با یافته‌های مطالعات a سودا و عبدالعزیز مطابقت دارد (۳۸،۳۹).

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد عصاره آبی گیاه راعی در احیای یون‌های فلزی پتانسیل بالایی دارد و قابلیت تبدیل به اتم‌های فلزی در ابعاد نانومتری را دارد. شایان ذکر است به علت فعالیت ضد میکروبی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی مناسب نانو ذرات سنتز شده، استفاده از آنها در زمینه‌های مختلف برای پیشگیری و انتقال عوامل بیماری‌زا پیشنهاد می‌شود.

سنتز نانو ذرات از گیاه کور پرداختند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که pH قلیایی ۹ بهینه است و اندازه و پایداری نانو ذرات سنتز شده به این پارامتر وابسته است؛ به‌علاوه، نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت‌های ۵-۳۰ mM نیترات نقره، موجب افزایش چشم‌گیر در میزان جذب می‌شود که نتایج این پژوهش با مطالعه حاضر همسو است (۳۰).

در سال‌های اخیر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها باعث شده است تا پژوهشگران به دنبال یک جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند. در گذشته از نیترات نقره ۵٪ برای درمان سوختگی‌ها استفاده می‌شد. با پیشرفت علم نانوفناوری در سال ۲۰۰۴، نانو ذرات نقره برای از بین بردن باکتری‌ها (شریشیا کلی) استفاده شد. از آنجایی که، نسبت سطح به حجم این نانو ذرات بسیار زیاد است، گفته می‌شود یک گرم نانو ذرات نقره برای کشتن باکتری‌های صد مترمربع از یک سطح کافی است (۳۱،۳۲).

با توجه به مجموع ویژگی‌های ذکر شده در بالا، نانو ذرات نقره در پزشکی و بهداشت کاربرد فراوانی دارند. در مطالعه حاضر، فعالیت ضد میکروبی نانو ذره نقره سنتز شده از عصاره گیاه راعی بر روی ۴ باکتری استاندارد بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره وابسته به غلظت است؛ همچنین، باکتری لیستریا منوسایتوزنز بیشترین حساسیت را به نانو ذره نقره دارد که با نتایج پژوهش‌های برایان و آروکیاراج مطابقت داشت؛ آنها نشان دادند باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی در برابر نانو ذرات سنتز شده حساس‌تر هستند (۳۳،۳۴).

در مطالعات مختلف اثرات نانو ذرات سنتز شده از عصاره گیاهان مختلف بر روی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفته است که یافته‌های آنها نشان می‌دهد نانو ذرات اثرات ضد میکروبی قابل قبولی دارند و اثر این ترکیبات بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی متفاوت است. در سال ۲۰۱۵، ردینول و همکاران نشان دادند بیشترین فعالیت ضد میکروبی مربوط به نانوذرات عصاره اقطی بر روی دو باکتری سودوموناس و /نتروباکتر است (۳۵). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۲،

REFERENCES

- Swetha V, Lavanya S, Sabeena G, Pushpalaksmi E, Jenson S J, Annadurai G. Synthesis and characterization of silver nanoparticles from Ashyranthus aspera extract for antimicrobial activity studies. J Appl Sci Environ Manag 2022; 24:1161-1167.
- Waghmar SS, Deshmukh AM, Sadowski Z. Biosynthesis, optimization, purification and characterization of gold nanoparticles. Afr J Microbiol Res 2014;2:138-46.
- Zhou Y X, Xin HI, Rahman K, Wang SJ, Peng C, Zhang H. Portulaca oleracea L. a review of phytochemistry and pharmacological effects. Biomed Res Int 2015;2015:925631.

4. Khaksar M, Vasileiadis S, Sekine R, Brunetti G, Scheckel KG, Vasilev K, et al. Chemical characterisation, antibacterial activity, and (nano)silver transformation of commercial personal care products exposed to household greywater. *Environ Sci Nano* 2019;6:3027-3028.
5. Hashemi B, Taghiloo S, Allahmoradi E, Karami M, Rahdar HA. Assessment of antibacterial effect of hydro alcoholic extract of *Portulaca oleracea* on the human pathogen bacteria. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 2018; 25: 303-8. [In Persian]
6. Lateef A, Ojo SA, Elegbede JA. The emerging roles of arthropods and their metabolites in the green synthesis of metallic nanoparticles. *Nanotechnol Rev* 2016; 601–622.
7. Dousti B, Nabipour F, Hajiamraci A. Green Synthesis of Silver Nanoparticle Using Aqueous Extract of *Fumaria Parviflora* and Study of its Antibacterial and Antioxidant Properties. *Razi Journal of Medical Sciences* 2019; 26: 105-17. [In Persian]
8. Rasouli H, Popović-Djordjević J, Sayyed RZ, Zarayneh S, Jafari M, Fazeli-Nasab B. Nanoparticles: a new threat to crop plants and soil rhizobia? In: Hayat SS, Pichtel J, Faizan M, Fariduddin Q, Eds. *ustainable Agriculture Reviews 41: Nanotechnology for Plant Growth and Development*. Berlin: Springer International Publishing; 2020. P. 201–214.
9. Kakaei K, Ghadimi G. Synthesis of silver nanoparticles based on reduced graphene oxide anelectrocatalyst for cuthod side of fuel cells. *Applied Chemistry Today* 2019; 14: 51-62. [In Persian]
10. Amooaghaie R, Saerl M R, Azizi M. Synthesis, characterization and biocompatibility of silver nanoparticles synthesized from *_Nigella sativa_* leaf extract in comparison with chemical silver nanoparticles. *cotoxicol Environ Saf* 2015;120:400-8.
11. Ghaderi RS, Kazemi M, Soleimanpour S. Nanoparticles are More Successful Competitor than Antibiotics in Treating Bacterial Infections. A Review of the Literature. *Iran J Med Microbiol* 2021;15:18-45. [In Persian]
12. Ghandehari S, Homayounitabrizi M, Ardalan P. Antioxidant And Cytotoxic Properties of Green Synthesized Silver Nanoparticles from *Rubia tinctorum*. *J Ilam Uni Med Sci* 2018; 26:57-67. [In Persian]
13. Shali R, Neamati A, Ardalan P. Investigating the Cytotoxic Effect and Antioxidant Properties of Green Synthesized Silver Nanoparticles from the Root of *Persicaria Bistorta* on Human Liver Cancer Cell Line (Hep G2) *J Ilam Uni Med Sci* 2018; 26: 133-142.
14. Ahmad N, Sharma S. Green synthesis of silver nanoparticles using extracts of *Ananas comosus*. *Green and Sustainable Chemistry* 2012;2:141-47.
15. Anuj SA, Gajera HP, Hirpara DG, Golakiya BA. Bacterial membrane destabilization with cationic particles of nano-silver to combat efflux-mediated antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Life Sci* 2019;230:178-87.
16. Shankar SS, Rai A, Ankamwar B, Singh A, Ahmad A, Sastry M. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. *Nat Mater* 2004;3:482-8.
17. Allafchian AR, Jalali SAH, Aghaei F, Farhang HR. Green synthesis of silver nanoparticles using *Glaucium corniculatum* (L.) Curtis extract and evaluation of its antibacterial activity. *IET Nanobiotechnol* 2018;12:574-78.
18. 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.
19. Miri A, Mahdinejad N, Ebrahimi O, Khatami M, Sarani M. Zinc oxide nanoparticles: Biosynthesis, characterization, antifungal and cytotoxic activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019;104:109981.
20. Kumar Sur U, Ankamwar B, Karmakar S, Halder A, Das P. Green synthesis of Silver nanoparticles using the plant extract of *Shikakai* and *Reetha*. *Materials Today: Proceedings* 2018;5: 2321-29.
21. Karamian R J, Kamalnejade. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous seed extract of *Cuminum cyminum* L. and evaluation of their biological activities. *J Ilam Uni Med Sci* 2019; 26:128-141. [In Persian]
22. 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.
23. Kaur A, Preet S, Kumar V, Kumar R, Kumar R. Synergetic effect of vancomycin loaded silver nanoparticles for enhanced antibacterial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019;176:62-69.
24. Moshahary S, Mishra P. Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using culinary banana peel extract for the detection of melamine in milk. *J Food Sci Technol* 2021;58:797-804.
25. Pirtarighat S, Ghannadnia M, Baghshahi S. Green synthesis of silver nanoparticles using the plant extract of *Salvia spinosa* grown in vitro and their antibacterial activity assessment. *J Nanostruct Chem* 2019.

26. Azizinshermeh O, Valizadeh J, Noroozifar M, Ghasemi A, Valizadeh M. Optimization, characterization and antimicrobial activity of gold nanoparticles biosynthesized using aqueous extract of *Sambucus ebulus*. L. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants* 2016;4:1-18. [In Persian]
27. Waghmar SS, Deshmukh AM, Sadowski Z. Biosynthesis, optimization, purification and characterization of gold nanoparticles. *African J Microbiol Res* 2014; 8: 138-46.
28. Dwivedi AG, Gopoi K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extracts. *Coll Suf Phys Eng Asp* 2010; 360:27-33.
29. Miri A, Sarani M, Bazaz MR, Darroudi M. Plantmediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Prosopis farcta* extract and its antibacterial properties. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2015; 287-291.
30. Azizian Shermeh O, Valizadeh M, Valizadeh J, Taherizadeh M, Beigomi M. Phytochemical investigation and phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Capparis spinosa* L. *Modares J Biotech* 2017; 8: 80-90. [In Persian]
31. Dwivedi AG, Gopoi K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extracts. *Coll Suf Phys Eng Asp* 2010; 360:27-33.
32. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005; 16:23-46.
33. Brian MO, hemachitra P, Deepa R, Selvi VS. Synthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity from *Moringa Oleifera*, *murraya Koningii* and *Ocimum sanctum* against *E.Coli* and *S.aureus*. *Der Pharmacia Lettre* 2016; 8: 150-60.
34. 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: 372-379.
35. Rodinol S, Butu A, Petrache P, Butu M, Dinupirvu C, Cornea CA. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of *Sambucus ebulus* extract. *Farmacia* 2015; 5:751-4.
36. Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gramnegative bacteria. *Nanomedicine* 2012; 8: 37-45.
37. Dallas P, Sharma VK, Zboril R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: classification, synthetic paths, applications, and perspectives. *Adv Colloid Interface Sci* 2011;166:119-35.
38. Abdelaziz MS, Elnekeety AA, Abdelwahhab MA. Antioxidant and antibacterial activity of Silver nanoparticles biosynthesizes using *chenopodium murale* leaf extract. *J Saudi Chem Soc* 2014;18:356-63.
39. Sudha A, Jeyakanthan J, Srinivasan P. Green synthesis of silver nanoparticles using *Lippia nodiflora* aerial and evaluation of their antioxidant, *Resource-Efficient Technologies* 2017;3: 506-515.