

(مقاله پژوهشی)

بیوسنتز نانوذرات نقره توسط عصاره مریم گلی و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی آن ها علیه باکتری های فساد غذایی

بهاره حاجی رستم‌لو^{۱*}، راحله ژبانی^۲، شکوفه عمرانی^۳

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

۲- دانشیار، گروه شیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

۳- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۸/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۰۸

چکیده

هدف از مطالعه حاضر سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه مریم گلی و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی آنها می باشد. برای سنتز نانوذرات نقره، عصاره آبی گیاه تهیه و به محلول نترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار اضافه شد. فعالیت آنتی اکسیدانی نانو ذره نقره تولید شده با استفاده از قابلیت جذب رادیکال های ۱،۱-دیفنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل (DPPH) سنجش و فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نیز، به روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)^۲، علیه سه باکتری E. coli O157:H7 (ATCC 43895), L. monocytogenes (ATCC 7644), S. typhimurium (ATCC 35987) نانوذرات نقره سنتز شده بیشترین جذب را در ۴۳۰ نانومتر نشان دادند و دارای شکل کروی و میانگین اندازه آن ها بین ۵۰-۳۰ نانومتر بودند. در این مطالعه نانو ذره نقره تولید شده به عنوان مهارکننده رادیکال DPPH (IC₅₀ = 170 μM) عمل کردند. مقادیر MIC نانو ذرات نقره در برابر پاتوژن های آزمایشی در محدوده ۶/۲۵-۳/۱۲ میکرو گرم بر میلی لیتر بود. پاتوژن monocytogenes بالاترین میزان MIC را نشان داد. نتایج حاصل نشانگر فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی مناسب نانوذرات بیوسنتز شده بودند.

واژه های کلیدی: نانوذرات نقره، گیاه مریم گلی، بیوسنتز، فعالیت ضد میکروبی، فعالیت آنتی اکسیدانی

*مسئول مکاتبات: rostamlo_b214@yahoo.com

۱- مقدمه

استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین تولید رادیکال های آزاد و واکنش های متابولیکی است که منجر به آسیب لیپیدها، پروتئین ها و نوکلئیک اسیدها می گردد. این آسیب ها ممکن است به دلیل پایین بودن سطح آنتی اکسیدان ها و یا افزایش بیش از اندازه تولید رادیکال های آزاد در بدن صورت پذیرند. در انسان استرس اکسیداتیو با بروز بیماری های مزمن هم چون دیابت و سرطان در ارتباط است. از این رو تولید آنتی اکسیدان های سنتزی و طبیعی جهت جلوگیری از استرس اکسیداتیو و اثرات مخرب آن ضروری است. آنتی اکسیدان ها بطور مؤثر و به طرق مختلف اثر زیان بخش رادیکال های آزاد را در سامانه بیولوژیکی و غذایی کم می کنند و موجب مسمومیت زدایی می شوند (۳۲). در این راستا می توان نانو ذرات تولید شده به روش سبز (استفاده از بسترهای گیاهی برای تهیه ی نانومواد که سازگار با محیط زیست است و هیچ مواد شیمیایی مضر را شامل نمی شود) را مورد استفاده قرار داد که خواص آنتی اکسیدانی نشان می دهند. در حال حاضر استفاده از مواد غیر سمی در سنتز نانو ذرات جهت جلوگیری از خطرات زیستی بویژه در کاربردهای پزشکی و دارویی مورد توجه است و بسیاری از محققین بر روی مواد فعال زیستی بدست آمده از گیاهان یا سایر منابع مثل باکتری ها، قارچ ها و مخمر برای سنتز نانو ذرات متمرکز شده اند و تصور می شود که روش سنتز سبز، به دلیل حذف مواد شیمیایی مضر، زیست سازگاری و عملکرد نانو ذرات فلزی را جهت کاربردهای زیستی افزایش دهد (۳). در طی مراحل تولید زیستی نانو ذرات تولید آن ها به صورت خارج سلولی با استفاده از گیاهان و یا عصاره آن ها سودمندتر است و می توان تولید آن ها را در یک روش کنترل شده بر اساس اندازه، میزان پراکنش و شکل برای مقاصد مختلف تنظیم کرد (۲۵). تاکنون تولید زیستی نانوذرات نقره به وسیله گیاهانی مانند *Artemisia nilagirica* (۳۷)، *Acalypha indica* (۱۸)، *Piper longum* (۱۲)، *Ocimum*

sanctum (۲۷)، *Catharanthus roseus* (۲۸)، *Azadirachta indica* (۳۱) و بسیاری از گیاهان دیگر انجام گرفته است. در گزارشات مختلف نیز آمده است که نانوذرات نقره ای بیوسنتز شده دارای خواص بیولوژیکی مختلف از جمله خواص ضد میکروبی (۳۶، ۲)، آنتی اکسیدان (۱۷، ۲)، بهبودی (۳۸) و اثرات ضد سرطانی (۳۶) هستند. در مطالعاتی که بر روی خواص آنتی اکسیدانی نانو ذرات نقره به دست آمده از گیاهان مختلف از جمله *Rhododendron dauricum*، *Terminalia canthium*، *Syzygium cumini* (L.)، *coromandelicum*، *Fraxinus excelsior*، *Rosmarinus officinalis*، *Dalbergia rostrate* و *Cassia fistula* انجام گرفت، فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره مذکور تأیید شد (۲۳، ۷، ۲۱). مقاومت در پاتوژن های انسانی نیز یک چالش بزرگ در زمینه های دارویی و پزشکی است که این مقاومت های آنتی بیوتیکی و مصرف مداوم و بی رویه ترکیبات دارویی شیمیایی، باعث ایجاد پدیده مهم مقاومت در میکروارگانیسم ها شده است. عیب دیگر استفاده از این داروها، افزایش اثرات جانبی آن ها بوده که منجر به ظهور مجدد پاتوژن های MRD و پارازیت ها می شوند و ایجاد بیماری هایی می کنند که از بیماری های اولیه خطرناک تر هستند. لذا توسعه و ایجاد تغییرات در ترکیبات ضد میکروبی که پتانسیل ضد باکتریایی این ترکیبات را بهبود بخشد، یک بخش مهم و در الویت تحقیقات سال های اخیر است. از دیرباز نقره به علت خواص ضد باکتریایی خود شهرت داشته است. نانو ذرات نقره به علت رهایش یون نقره چنین خاصیتی را علیه باکتری های هوازی و بی هوازی نشان می دهد (۲۹). نانو ذرات نقره، خوشه هایی از اتم های نقره به قطر ۱۰۰-۱ نانومتر هستند که با اتصال به پروتئین های حاوی گوگرد در سطح غشاء باکتری موارد آن ها شده و تغییر مورفولوژی و نفوذپذیری غشا و تأثیر در زنجیره تنفسی و تقسیم سلولی و در نهایت منجر به مرگ سلولی می گردد. در واقع دلیل اصلی برای کاربردهای

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد شیمیایی و میکرو ارگانیسم های مورد استفاده تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده، با خلوص بالا تهیه شدند. نمک نیترات نقره ($AgNO_3$)، هیدروکلریک اسید (HCL)، سدیم هیدروکسید (NaOH) از شرکت مرک آلمان و میکروارگانیسم های استفاده شده شامل باکتری های *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895)، *L. monocytogenes* (ATCC 7644)، *S. typhimurium* (ATCC 35987) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. برای محلول سازی و شستشو از آب دوبار تقطیر استفاده شد.

۲-۲- آماده سازی عصاره

گیاه مریم گلی از شهرستان کاشمر در استان خراسان رضوی جمع آوری شد و بعد از شناسایی، این گیاه در هر بار یوم دانشگاه فردوسی مشهد با نام علمی *Salvia officinalis* مورد تأیید قرار گرفت. مقداری از برگ تازه آن پس از شستشو با آب دوبار تقطیر، به دور از نور خورشید و درجه حرارت اتاق خشک شد. سپس بخش های خشک شده توسط آسیاب برقی پودر گردید. جهت عصاره گیری برای سنتز نانوذرات از روش سوکسله استفاده شد. سپس عصاره حاصل توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شد. برای حذف کامل ذرات معلق موجود در عصاره نمونه توسط سانتریفیوژ (Sorvall Superspeed RC2-B، انگلیس) با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (۲۰).

۲-۳- سنتز نانوذرات

برای سنتز نانوذرات نقره، ۲ میلی لیتر از عصاره به ۴ میلی لیتر از محلول ۱ میلی مولار نیترات نقره اضافه شد. تغییر رنگ محلول از زرد کم رنگ به قهوه ای تیره نشان دهنده تولید و سنتز نانوذرات بود. این فرآیند در $pH = 7$ و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد انجام شد (۱۳).

گسترده نانوذرات نقره خاصیت ضد میکروبی آن می باشد به طوری که با افزودن مقدار اندکی از این نانوذرات در پوشش ها، می توان سطوح ضد میکروبی ایجاد کرد و آلودگی ها را برطرف نمود (۵). در صنایع غذایی نیز جهت حفظ بیشتر ارزش ماده غذایی به همراه بو و مزه ی آن و کاهش سرعت فساد ماده غذایی، از پوشش هایی با پایه ی نانو که معمولاً خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی دارند، استفاده می شود. تاکنون نیز نانوذرات نقره با استفاده از گیاهان دارویی مختلف از جمله *Acacia leucophloea* (۲۴)، *Aegle marmelos* (۲۶) *Solanum trilobatum*, *Syzygium cumini*, *Crataegus* (۸)، *Centella asiatica*, *Citrus sinensis douglasii* (۱۹) سنتز شده است که فعالیت های آنتی اکسیدان و ضد باکتری را در شرایط آزمایشگاهی نشان می دهد. *Khandelwal* و همکارانش نانوذرات نقره را با استفاده از برگ های گیاه *Argimone maxicana* سنتز کردند که ذرات تولید شده دارای اندازه ۲۰ نانومتر بودند و در مقابل بسیاری از باکتری ها و قارچ ها اثر مهاری نشان دادند (۱۵). *Govindaraju* و همکارانش نیز در مطالعه خود به بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از گونه گیاهی *Solanum torvum* پرداختند که نانوذرات دارای قطر ۱۴ نانومتر بودند و اثر مهاری خوبی در مقابل رشد باکتری های *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Aspergillus niger* نشان دادند (۹). لذا در این تحقیق به ارزیابی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره آبی گیاه مریم گلی پرداخته شد؛ که اگر چنانچه فعالیت آن در مقایسه با سایر نانوذرات بیوسنتز با عصاره های گیاهی، در رنج خوبی قرار گرفت؛ بتوان زمینه تحقیقات بعدی را برای محققان جهت استفاده از این نانوذرات در تکنولوژی های نوین مرتبط با صنایع غذایی را فراهم آورد.

۲-۴- روش های شناسایی نانو ذرات نقره

تغییرات رنگ نمونه ها به صورت عینی ملاحظه گردید و طیف جذبی نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (Biotech EPOCH, US) در دامنه ای بین ۷۰۰-۴۰۰ نانومتر اندازه گیری گردید. هم چنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (CM-120, Philips) شکل و ابعاد نانو ذرات سنتز شده شناسایی شد (۱۳).

۲-۵- بررسی قابلیت حذف رادیکال DPPH

این آزمایش با کمی تغییرات در روش Johnsona و همکاران انجام شد (۱۴). ۰/۵ میلی لیتر محلول DPPH ۰/۱ میلی مولار تهیه شده در اتانول ۹۵ درصد با ۱۰۰ میکرولیتر محلول نانو ذره نقره تولید شده از عصاره آبی مریم گلی یا استاندارد مخلوط شد. محلول حاصل شده به مدت ۳۱ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۸ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۸ نانومتر خوانده شد. به منظور مقایسه فعالیت نانو ذره نقره تولید شده از عصاره آبی برگ گیاه مریم گلی از ترکیب استاندارد گلو تاتیون احیاء (GSH) به عنوان یک آنتی اکسیدان استاندارد استفاده شد. برای تعیین مقدار IC_{50} غلظت مورد نیاز برای مهار ۵۰ درصد فعالیت آنتی اکسیدانی تعریف می شود، برای نانو ذره نقره تولید شده از عصاره آبی برگ مریم گلی و ترکیب استاندارد، آزمایش در پنج غلظت مختلف از محلول نانو ذره مورد نظر و استاندارد گلو تاتیون صورت گرفت. هر آزمایش در سه نوبت انجام شد و مقادیر میانگین ملاک محاسبات قرار گرفت. درصد فعالیت رادیکال زدایی از طریق رابطه ذیل محاسبه شد:

جذب بلانک - جذب واکنش

$= 1$ درصد جذب رادیکال

جذب بلانک

در این رابطه، جذب بلانک نشان دهنده جذب محلول شاهد است که حاوی ۰/۵ میلی لیتر محلول DPPH میلی مولار و

۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به جای محلول نانو ذره نقره است و جذب واکنش، نشان دهنده جذب محلول محتوای نمونه نانو ذره نقره است.

۲-۶- روش سنجش خاصیت آنتی باکتریال

جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی گیاه مریم گلی پس از تخلیص و حلال زدایی محلول عصاره، از آن غلظت های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر با حلال ۵ درصد DMSO^۱ تهیه گردید و محلول های حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. باکتری های استاندارد در این مطالعه از پس از تهیه از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی، در فریزر ذخیره گردیدند. یک کلون از هر سوش در محیط کشت های مناسب کشت و مورد آزمایش های شناسایی قرار گرفتند. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibition Concentration) در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش میکرو برات دایلوژن انجام شد. بطور خلاصه ابتدا از محیط کشت مولر هیتون برات، ۱۰۰ میکرولیتر داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد؛ سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر محلول عصاره حاوی نانو ذرات نقره اضافه گردید و از خانه دوم به سوم به همین ترتیب تا خانه نهم رقیق شدند. در آخر به همه چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی رقیق شده معادل لوله نیم مک فارلند اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، میزان کدورت که نشان دهنده رشد باکتری است، بوسیله دستگاه الایزایدر (Start fax 2100، انگلیس) تعیین شد و مطابق تعریف، غلظت آخرین (رقیق ترین) چاهکی که هیچ کدورتی در آن مشاهده نشد، معادل حداقل غلظت مهار کنندگی در نظر گرفته شد. از محلول عصاره تنها نیز به عنوان شاهد استفاده شد. به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی^۲ (MBC)، همه

1- Dimethyl Sulfoxide

2- Minimum Bactericidal Concentration

در این پژوهش بدون تشکیل رسوب بود. اساس سنتز نانو ذرات، احیای یون های نمک آن ها و در واقع خنثی شدن بار الکتریکی است. در این مطالعه این فرآیند طی مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد تکمیل گردید که نشان دهنده سرعت بالای این روش و بی نیازی آن به دماهای بالا جهت تشکیل نانو ذرات نقره است. تغییر رنگ محلول حاوی نانو ذرات کلوئیدی نقره از زرد به قهوه ای ناشی از پدیده ای است که به آن پلاسمون رزونانس سطحی^۱ (SPR) می گویند (۱۳). پس از مشاهده تغییر رنگ، تولید نانو ذرات به وسیله اسپکتروفتومتری UV-Vis نیز مورد تأیید قرار گرفت. در شکل ۲ نتایج طیف سنجی ماوراءبنفش - مرئی حاصل از عصاره ی آبی مریم گلی تیمار شده بعد از سنتز نانو ذرات نقره، آورده شده است. پیک جذب بیشتنه در منحنی بدست آمده برای محلول حاوی نانو ذرات بیوسنتز شده با عصاره آبی مریم گلی، درطول موج ۴۳۰ نانومتر مشاهده شد که بیانگر سنتز نانو ذرات می باشد. از طریق روش اسپکتروفتومتری به دلیل رزونانس پلاسمون سطحی ذرات، می توان تولید نانو ذرات نقره را در محیط عصاره گیاه، پیگیری نمود. پیک جذب نانو ذرات نقره حدوداً در طول موج ۴۳۰ نانومتر می باشد که بسته به شرایط و سائز ذرات، محل پیک جذبی تغییر می کند(۱۳).



شکل ۱- تغییر رنگ محلول نیترات نقره در حضور عصاره آبی

برگ مریم گلی

چاهک های فاقد کدورت جداگانه بر محیط مولر هیتون آگار کشت داده شدند. پس از ۲ ساعت، کمترین غلظتی از عصاره حاوی نانو ذرات نقره که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد. آزمایشات ۳ بار تکرار شده و نتایج به صورت میانگین این سه بار تکرار ارائه گردیده است (۳۵).

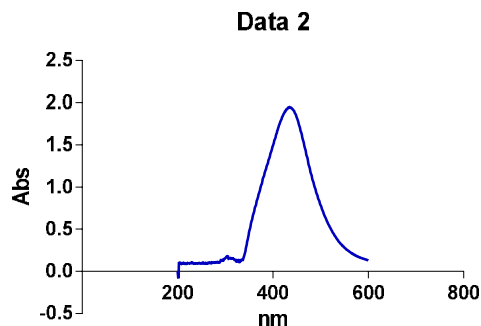
۲-۲- روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها

در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی، نتایج حاصل با نرم افزار SPSS ورژن ۲۰ مورد آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA قرار گرفت. سپس مقایسه میانگین ها با روش حداقل تفاوت معنی دار صورت پذیرفت. (سطح اطمینان ۵٪ برای محاسبات به کار رفته است).

۳- نتایج و بحث

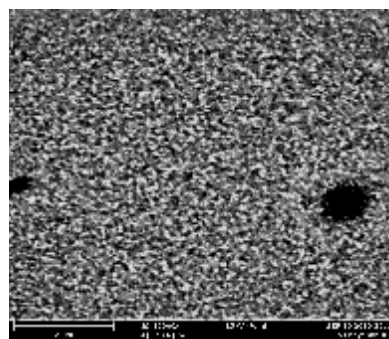
در سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ مریم گلی، گیاه به عنوان احیا کننده و پایدار کننده نقش ایفا می کند. شکل های شماره ۱ و ۲ به ترتیب تغییر رنگ محلول نانو ذرات نقره و طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی را نشان می دهد. ظاهر شدن رنگ قهوه ای تیره پس از واکنش با یون نقره، یک شاخص واضح و روشن از احیای یون های فلزی و تشکیل نانو ذرات نقره در محیط است (۱۳). هنگامی که تغییر رنگ با تشکیل رسوب همراه باشد، یعنی نانو ذره ای تشکیل شده دارای اندازه بزرگ بوده و زمانی که تغییر رنگ داده و رسوب تشکیل نشده باشد یعنی نانو ذره سنتز شده دارای اندازه ذرات بسیار کوچکی می باشد و بهترین حالت است؛ که تغییر رنگ محلول حاوی نانو ذرات نقره

بررسی انجام شده در این تحقیق نشان داد که عصاره برگ مریم گلی پتانسیل بالایی برای تولید نانو ذرات نقره دارد. تولید نانو ذرات به این روش به صورت مرحله ای و مقرون به صرفه بوده و در زمان بسیار کم فرآیند تکمیل می شود. تغییر در رنگ محلول از شفاف به قهوه ای و همچنین افزایش میزان جذب محلول به دلیل احیاء یون نقره و تجمع آن ها به صورت نانو ذرات نقره می باشد (۱). گیاه مریم گلی دارای ترکیبات طبیعی فراوانی چون ترکیبات آنتی اکسیدانی، فنل ها و فلاونوئیدها و... می باشد (۳۴)؛ که تمامی این ترکیبات در احیاء یون های فلزی و تبدیل آن ها به اتم های فلزی در ابعاد نانومتریکی و پایدار کردن نانو ذرات سنتز شده نقش مهمی دارند. در این مطالعه فعالیت جذب رادیکال های DPPH توسط نانو ذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره آبی گیاه مریم گلی بررسی شد. حذف رادیکال های DPPH با افزایش غلظت نانو ذره افزایش یافت (شکل ۴). همانطور که مشاهده می شود در حدود ۵۰ درصد از رادیکال های آزاد در غلظت ۴۶۴ میکرومول نانو ذره مهار می شوند.

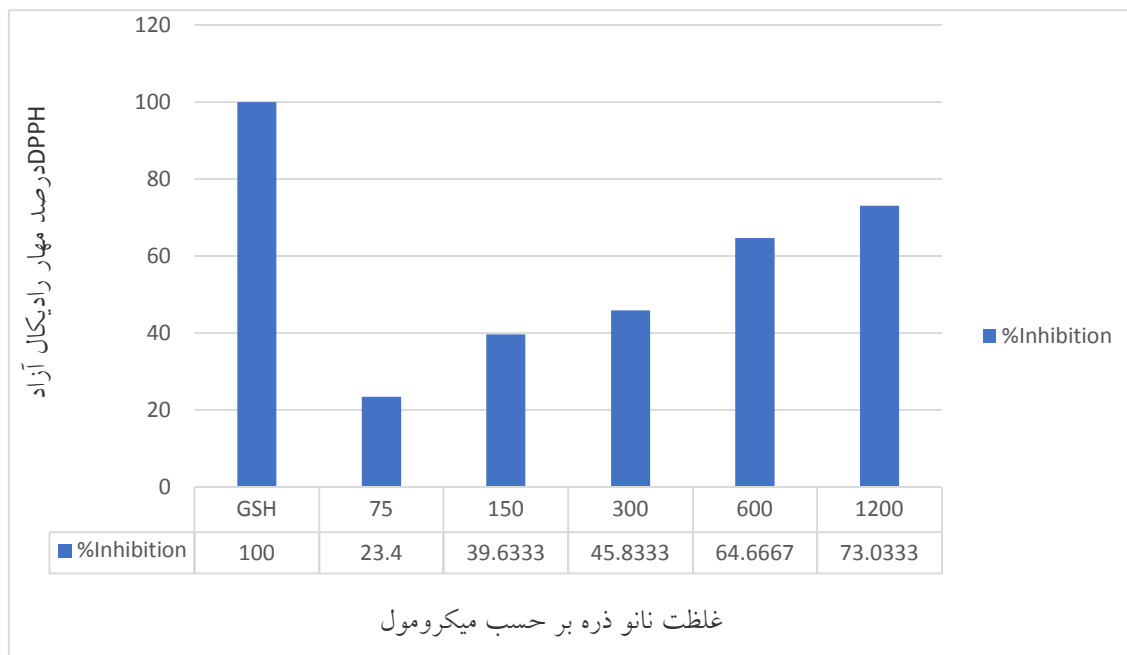


شکل ۲- طیف UV-Vis نانو ذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره آبی برگ مریم گلی

توزیع شکل و اندازه نانو ذرات نقره سنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. شکل شماره ۳ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانو ذرات نقره سنتز شده را نشان می دهد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی که اطلاعاتی را درباره مورفولوژی و اندازه نانو ذرات نقره در اختیار می گذارد (۱۳)، نشان می دهد که نانو ذرات بدست آمده همگی تقریباً کروی بوده و اندازه متوسط آن ها بین ۳۰ تا ۵۰ نانومتر بوده است.



شکل ۳- عکس تهیه شده از نانو ذرات نقره بیوسنتز با عصاره آبی برگ مریم گلی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی



شکل ۴- فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانو ذره سنتز شده با عصاره آبی گیاه مریم گلی با استفاده از روش DPPH.

در این آزمون گلوکوتیون به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفته است. داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است.

کارآمدتری در مقایسه با نانو ذرات با اندازه‌های بزرگ‌تر بودند (۴). در مطالعه‌ای خواص آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره تولید شده از عصاره برگ گیاه *Artemisia annua* و *Sida acuta* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه DPPH که یک رادیکال آزاد است با دریافت یک الکترون یا رادیکال هیدروژن به یک مولکول پایدار تبدیل شد. کاهش جذب در ۵۱۷ نانومتر و تغییر رنگ محلول از بنفش به زرد نشان داد که نانو ذرات نقره تولید شده از گیاهان مذکور دارای توانایی انتقال هیدروژن به اکسیدان و خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. نتایج این بررسی نشان داد که خواص آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها وابسته به غلظت آن‌ها است و با افزایش غلظت فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. نانو ذرات نقره در مقایسه با آنتی‌اکسیدان استاندارد (آسکوربیک اسید) فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار خوبی را نشان دادند (۱۴). در مطالعه دیگری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانو ذرات نقره تولید شده از عصاره برگ گیاه

برخی از گیاهان طی روش سبز دارای توانایی آماده‌سازی نانو ذرات نقره آنتی‌اکسیدان جدید می‌باشند. توانایی بالقوه این گیاهان برای احیاء زیستی Ag^+ به Ag^0 بوسیله روش‌های طیف‌سنجی شناسایی شده است و نانو ذرات تولید شده به این روش، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (۴). با توجه به ضرورت شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و طبیعی جهت جلوگیری از استرس اکسیداتیو و اثرات مخرب آن، یکی از اهداف این مطالعه بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی نانو ذره نقره تولید شده از عصاره آبی برگ گیاه مریم گلی می‌باشد. در مطالعه‌ای که بر روی نانو ذرات تولید شده توسط گیاهان زینتی (*Hyacinthus orientalis L.*, *Dianthus caryophyllus L.*) انجام شد، از روش‌های کمی لومینسانس به منظور بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی نانو ذرات استفاده شد. نانو ذرات نقره نسبت به عصاره گیاه به تنهایی، درجات آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان دادند. نانو ذرات در اندازه کوچکتر دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی

غلظت نانوذرات فعالیت آنتی اکسیدانی نیز افزایش یافت (۶). مطالعات بالا نشان می دهد که نانوذرات ترکیب شده با عصاره های مختلف گیاهی دارای اثرات آنتی اکسیدانی می باشند که حتی در برخی موارد این نانوذرات اثرات آنتی اکسیدانی شبیه و یا نزدیک به آنتی اکسیدان های استاندارد نشان داده اند. مشابه با نتایج مطالعات بالا، مطالعه حاضر نشان می دهد که نانوذره نقره مریم گلی دارای اثرات آنتی اکسیدانی خوبی می باشد. در بین فلزات طبیعی یون های نقره دارای خواص ضد میکروبی شدیدی علیه بسیاری از گونه های باکتریایی است (۳۵). نانو ذرات نقره به دلیل سطح بالای تماس (نسبت سطح به حجم بالا) و همچنین ویژگی های منحصر به فرد فیزیکی شیمیایی، می توانند عوامل ضد میکروب خوبی نسبت به یون های نقره باشند. در واقع علت این که اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات نقره از نقره بسیار بیشتر است، نسبت بالای سطح به حجم در نانو ذرات نقره است که موجب بالا رفتن تأثیر نانو ذرات نقره بر روی باکتری ها می شود (۳۵). در این پژوهش پس از سنتز نانو ذرات نقره، فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات تولیدی در برابر باکتری های *Escherichia coli* و *Listeria monocytogenes* و *Salmonella typhimurium* مورد بررسی قرار گرفت و حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) نانو ذرات نقره بیوستتر شده و به دنبال آن آزمون تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) نیز برای هر یک از نمونه ها انجام شد. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده، مقادیر MIC نانو ذرات نقره در برابر پاتوژن های آزمایشی در محدوده ۶/۲۵-۳/۱۲ میکرو گرم بر میلی لیتر بود. پاتوژن *monocytogenes* *Listeria* بالاترین میزان MIC را نشان داد بنابراین کمترین حساسیت را در بین باکتری های مورد آزمایش، نسبت به نانو ذرات بیوستتر شده نشان داد. دو پاتوژن گرم منفی نیز میزان MIC برابر با ۳/۱۲ میکرو گرم بر میلی لیتر را نشان دادند. با این وجود در مطالعه ما پاتوژن ها میزان MBC یکسان برابر با ۶/۲۵ میکرو گرم بر میلی لیتر را نشان دادند.

Chenopodium murale با استفاده از آزمایش DPPH سنجش گردید. قدرت مهار نانو ذره در غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر $0.12 \pm 13/27$ و با افزایش غلظت تا ۲۰ میلی گرم بر لیتر $0.18 \pm 65/43$ گزارش شد. این امر نشان دهنده اثر آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت نانو ذرات نقره بود (۱). در مطالعه ای فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره تولید شده از توت هندی (*Morinda pubescens*) با استفاده از قابلیت حذف رادیکال های DPPH، سوپراکسید و هیدروکسیل مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش DPPH تغییر رنگ نمونه از بنفش به زرد به صورت وابسته به دوز با IC_{50} معادل 0.25 ± 84 نشان داد که نمونه حاوی نانوذرات دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی است (۱۱). در مطالعه دیگری برای بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی نانو ذرات نقره که با استفاده از میوه *Piper longum* به دست آمده بودند، از قابلیت حذف رادیکال های DPPH، سوپراکسید، نیتریک اکسید و هیدروژن پراکسید استفاده شد. میانگین اثر مهارى نانوذرات نقره بر روی رادیکال های مذکور به ترتیب ۶۷ درصد در غلظت های (۶۰۰-۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$) از نانوذره، ۶۰ درصد (در غلظت های $200-100 \mu\text{g/mL}$)، ۷۰ درصد (در غلظت های $50-50 \mu\text{g/mL}$) و ۹۶ درصد (در غلظت های $10-60 \mu\text{g/mL}$) گزارش شد (۳۰). در مطالعه دیگری خواص آنتی اکسیدانی نانوذرات طلا و نقره تولید شده از عصاره میوه زردآلو (*Prunus armeniaca*) مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت نانوذرات طی آزمایشات حذف رادیکال های DPPH و ABTS^۱ مشاهده شد، IC_{50} نانوذرات طلا و نقره برای تست DPPH به ترتیب $11/27$ و $16/18$ میلی گرم و طی آزمایش ABTS به ترتیب $3/40$ و $7/12$ میلی گرم گزارش شد. بنابراین نانوذرات نقره فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به نانوذرات طلا از خود نشان دادند. در هر دو مورد با افزایش

1 -2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid

جدول ۱- مقادیر MIC و MBC نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره آبی گیاه مریم گلی در برابر چهار نوع پاتوژن مواد غذایی

بakteri	MIC (میکرو گرم بر میلی لیتر)	MBC (میکرو گرم بر میلی لیتر)
Escherichia coli	۳/۱۲	۶/۲۵
Listeria monocytogenes	۶/۲۵	۶/۲۵
Salmonella typhimurium	۳/۱۲	۶/۲۵

داخل سلول باکتری و ایجاد تداخل در مسیرهای مختلف متابولیکی و تولید مثل در نهایت منجر به مرگ باکتری می شود (۲۲).

۴- نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره برگ مریم گلی پتانسیل بالایی برای تولید نانوذرات نقره دارد، تولید نانوذرات به این روش مقرون به صرفه بوده و در زمان بسیار کم فرآیند تکمیل می شود. همچنین نانوذرات بیوسنتز شده پتانسیل بالایی را در احیای یون های فلزی و تبدیل آن ها به اتم های فلزی در ابعاد نانو متریک نشان دادند، طبق نتایج حاصل نانو ذره نقره تولید شده به عنوان مهارکننده رادیکال DPPH ($IC_{50} = 170 \mu M$) عمل کردند. وجود فعالیت ضد میکروبی بالای نانوذرات بیوسنتز شده از عصاره آبی مریم گلی نیز در این تحقیق به اثبات رسید، بطوریکه مقادیر MIC نانوذرات نقره در برابر پاتوژن های آزمایشی در محدوده ۳/۱۲ - ۶/۲۵ میکرو گرم بر میلی لیتر بود. بطور کلی نتایج حاصل نشانگر فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی مناسب نانوذرات بیوسنتز شده بودند.

۵- سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری صمیمانه اساتید ارجمند گروه صنایع غذایی و شیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور صمیمانه سپاسگزاری می گردد. این تحقیق با حمایت مالی حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور انجام گرفته است.

در این مطالعه نانوذرات نقره بیوسنتز شده اثر ضد باکتریایی خوبی را در مقابل همه پاتوژن های آزموده شده نشان دادند. نتایج آزمون های MIC و MBC، مقدار بالاتر MIC را برای باکتری *Listeria monocytogenes* نسبت به سایر پاتوژن های مورد آزمون نشان داد که این نتیجه ممکن است به دلیل تفاوت در دیواره سلولی باکتری ها باشد. Kim و همکارانش گزارش دادند که *S.aureus* نسبت به باکتری گرم منفی *E.coli* در مقابل نانوذرات مقاوم تر بود (16)؛ در حالی که در مطالعه ما میزان MBC برای همه پاتوژن ها یکسان بود. لازم به ذکر است که فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات وابسته به غلظت و اندازه نانوذرات می باشد. در گزارشی دیگر Shrivastava و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Guzman و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره روی باکتری های مختلف مانند *E.Coli*، *P.aeruginosa* و *S.aureus* اعلام داشته اند که هر چند فعالیت نانوذرات وابسته به غلظت است ولی برای باکتری های گرم منفی نسبت به گرم مثبت این اثر چشمگیرتر بوده است (۱۰،۳۳). در واقع تفاوت پاسخ باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به نانوذرات نقره، به تفاوت موجود در ساختار دیواره سلولی آن ها مربوط می باشد، به طوری که باکتری های گرم منفی دیواره سلولی نازک تر و با استحکام کمتر داشته و نیز وجود لایه ای از لیپو پلی ساکارید در سطح بیرونی شان که سرشار از بارهای منفی است، برهمکنش بین نانوذرات نقره را که دارای بار مثبت ضعیف می باشند را با این سلول های باکتریایی تسهیل می کند. اتصال نانوذرات به سطح سلول ابتدا دیواره را سوراخ و سپس با ورود نانو ذره به

- ۶-منابع**
8. Ghaffari-Moghaddam, M., Hadi-Dabanlou, R., Khajeh, M., Rakhshanipour, M. and Shameli, K. 2014. Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31(4):548-557.
 9. Govindaraju, K., Tamilselvan, S. and Kiruthogs, G. 2010. Simgaravelu, Biogenic silver nanoparicles by Solanum torvum and their promising antimicrobial activity. *Journal of Biopesticides*, 3:394-399.
 10. Guzman, M., Dille, J. and Godet, S. 2012. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Nanomedicine*, 8: 37-45.
 11. Inbathamizh, L., Ponnu, T.M. and Mary, E.J. 2013. In vitro evaluation of antioxidant and anticancer potential of Morinda pubescens synthesized silver nanoparticles. *Journal of Pharmacy Research*, 6:32-38.
 12. Jacob, S.J., Finub, J.S. and Narayanan, A. 2012. Synthesis of silver nanoparticles using Piper longum leaf extracts and its cytotoxic activity against Hep-2 cell line. *Colloids and surfaces B, Biointerfases*, 91:212-214.
 13. Jegadeeswaran, P., Shivaraj, R. and Venckatesh, R. 2012. Green synthesis of silver nanoparticles from extracts of Padina tetrastratica leaf. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(3): 991 - 998.
 14. Johnsona, A., Obota, I. and Ukponga, U. 2014. Green synthesis of silver nanoparticles using Artemisia annua and Sida acuta leaves extract and their antimicrobial antioxidant and corrosion inhibition potentials. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5:899-906.
 15. Khandelwal, N., Singh, A., Jain, D., Upadhyay, M.K. and Verma, H.N. 2010. Green synthesis of silver nanoparticles using Argimone maxicana leaf extract and evaluation of their activity, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5: 483-489.
 1. Abdelaziz, M.S., Shaheen, M.S., Elnekeety, A.A. and Abdelwahhab, M.A. 2014. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using Chenopodium murale leaf extract. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18:356-363.
 2. Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L. and Ikram, S. 2016. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7: 17-28.
 3. Bharathi, K., Thirumurugan, V., Kavitha, M., Muruganadam, G., Ravichandran, K. and Seturaman, M. 2014. A comparative study on the green biosynthesis silver nanoparticles using dried leaves of Boerha aviadiffusa L. and Cichorium intybus L. with reference to their antimicrobial potential. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3:1415-1427.
 4. Bunghez, I., Barbinta, A., Patrascu, M., Badea, N., Doncea, S., Popescu, A., et al. 2012. Antioxidant silver nanoparticles green synthesized using ornamental plants. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 14:1016-1022.
 5. Buzea, C., Pacheco, I. and Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4):17-71.
 6. Dauthal, P. and Mukhopadhyay, M. 2013. In-vitro free radical scavenging activity of biosynthesized gold and silver nanoparticles using Prunus armeniaca (apricot) fruit extract. *Journal of Nanoparticle Research*, 15:1-11.
 7. Elrafie, H.M. and Hamed, M.A. 2014. Antioxidant and anti inflammatory activities of silver nanoparticles biosynthesized from aqueous leaves extracts of four Terminalia species. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 5:1-11.

- nanoparticles using Canthium coromandelicum leaves extract. *Research Journal of Microbiology*, 9:142-150.
24. Murugan, K., Senthilkumar, B., Senbagam, D. and Al-Sohaibani, S. 2014. Biosynthesis of silver nanoparticles using Acacia leucophloea extract and their antibacterial activity. *International Journal of Nanomedicine*, 9:2431-2438.
 25. Nazeruddin, G., Prasad, N., Waghmare, S., Garadkar, K. and Mulla, I. 2014. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using Azadirachta indica leaf extract and its antimicrobial activity. *Journal of Alloys and Compounds*, 583:272-277.
 26. Nithya Deva Krupa, A. and Raghavan, V. 2014. Biosynthesis of silver nanoparticles using Aegle marmelos (Bael) fruit extract and its application to prevent adhesion of bacteria: a strategy to control microfouling. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 10:1-8.
 27. Philip, D. and Unni, C. 2011. Extracellular biosynthesis of gold and silver nanoparticles using Krishna tulasi (Ocimum sanctum) leaf. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 43:1318-1322.
 28. Ponarulselvam, S., Panneerselvam, C., Murugan, K., Aarthi, N., Kalimuthu, K. and Thangamani, S. 2012. Synthesis of silver nanoparticles using leaves of Catharanthus roseus Linn. G. Don and their antiplasmodial activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2:574-580.
 29. Rai, M., Yadav, A. and Gade, A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27: 76 -83.
 30. Reddy, N.J., Nagoor Vali, D., Rani, M. and Rani, S.S. 2014. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by Piper longum fruit. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 34:115-122.
 16. Kim, J.S., Kuk, E, Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., et al. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 3(1):95-101.
 17. Kokila, T., Ramesh, P.S. and Geetha, D. 2016. Biosynthesis of AgNPs using Carica papaya peel extract and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 134: 467-473.
 18. Krishnaraj, C., Jagan, E.G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P.T. and Mohan, N. 2010. Synthesis of silver nanoparticles using Acalypha indica leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 76:50-56.
 19. Logeswari, P., Silambarasan, S. and Abraham, J. 2013. Ecofriendly synthesis of silver nanoparticles from commercially available plant powders and their antibacterial properties. *Scientia Iranica*, 20(3):1049-1054.
 20. Mallikarjuna, K., Narasimha, G., Dillip, G.R., Praveen, B., Shreedhar, B., Lakshmi, C.S. and Raju, B.D.P. 2011. Green synthesis of silver nanoparticles using Ocimum Leaf extract and their characterization. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(1):181-186.
 21. Mittal, A.K., Kaler, A. and Banerjee, U.C. 2012. Free radical scavenging and antioxidant activity of silver nanoparticles synthesized from flower extract of Rhododendron dauricum. *Nano Biomedicine and Engineering*, 4:118-124.
 22. Moadi, T., Ghahramanzadeh, R., Yosofi, M. and Mohammadi, F. 2014. Synthesis of silver nanoparticles using four species plant and investigation of their antimicrobial activity. *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 4: 1-9.
 23. Mohan, S.C., Sasikala, K., Anand, T., Vengaiah, P. and Krishnaraj, S. 2014. Green synthesis antimicrobial and antioxidant effects of silver

- of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15:113-120.
36. Venkatesan, J., Kim, S.K. and Shim, M.S. 2016. Antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities of biosynthesized silver nanoparticles using marine algae *Ecklonia cava*. *Nanomaterials*, 6: 235-240.
37. Vijayakumar, M., Priya, K., Nancy, F.T., Noorlidah, A. and Ahmed, A.B.A. 2013. Biosynthesis, characterization and antibacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Artemisia nilagirica*. *Industrial Crops and Products*, 41:235-240.
- Yugal, K., Mohanta, S., Sujogya, K.P., Rasu, J., Nanaocha, S., Akshaya, K.B. and Tapan, K.M. 2017. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of silver nanoparticles synthesized by leaf extract of *Erythrina suberosa* (Roxb.). *Frontiers in Molecular Biosciences*, 32(3):136-141.
31. Shankar, S.S., Rai, A., Ahmad, A. and Sastry, M. 2004. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275:496-502.
32. Shrififar, F., Moshafi, M. and Mansouri, S. 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*, 18:800-805.
33. Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P. and Dash, D. 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18:103-118.
34. Taarit, M.B., Msaada, K., Hosni, K. and Marzouk, B. 2010. Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. *Food Chemistry*, 119(3):951-956.
35. Veerasamy, R., Xin, T.Z., Gunasagaran, S., Xiang, T.F.W., Yang, E.F.C., Jeyakumar, N., et al. 2011. Biosynthesis

(Original Research Paper)

Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Salvia officinalis* Extract and Evaluation of their Antioxidant and Antimicrobial Activity Against Bacteria of Food Corruption

Bahareh Haji Rostamloo^{1*}, Raheleh Zhiyani², Shokoofeh Omrani³

1-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran

2-Associate Professor, Department of Chemistry, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.

3-Young Researchers Club, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.

Received: 05/11/2017

Accepted:29/04/2018

Abstract

The purpose of the present study is to synthesize silver nanoparticles using aqueous extract of *Salvia officinalis* L. and investigate their antioxidant and antimicrobial activity. For the synthesis of silver nanoparticles, the aqueous extract of the plant was prepared and added to a silver nitrate solution at a concentration of 1 mM. The antioxidant activity of the silver nanoparticles was measured using the absorption capability of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH) radicals. The antimicrobial activity of the nanoparticles was also determined by the method of determining the minimum inhibitory concentration (MIC) against three bacteria *E. coli* O157: H7 (ATCC 43895), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. typhimurium* (ATCC 35987). The silver nanoparticles exhibited the highest absorbance at 430 nm, with a spherical shape and an average size of 30-30 nanometers. In this study, the nanoparticles of silver produced as a DPPH radical inhibitor (IC₅₀ = 170 μM). MIC values of silver nanoparticles against test pathogens were in the range of 3.6-12.25 μg / ml. The pathogens of monocytogenes showed the highest levels of MIC. In this study, biosynthetic nanoparticles showed good antioxidant and antimicrobial activity.

Keywords: Silver nanoparticles, *Salvia officinalis*, Biosynthesis, Antimicrobial Activity, Antioxidant Activity

*Corresponding Author: rostamlo_b214@yahoo.com

