

فیتوستنز نانوذرات نقره پایدار با استفاده از عصاره آبی گونه *Salvia rhytidea* Benth. و مقایسه عملکرد ضد میکروبی آن با عصاره طبیعی گیاه

امید عزیزیان شرمه^۱، ابراهیم ملاشاهی^{۲*}، مژگان طاهری زاده^۳

^۱ دانشجوی دکتری، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

^۲ استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

^۳ دانشجوی دکتری، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۱۲

چکیده

مطالعه حاضر اولین گزارش از فیتوستنز نانوذرات نقره از عصاره آبی ریشه گیاه دارویی مریم گلی تفتانی (*Salvia rhytidea* Benth.) و مقایسه عملکرد ضد میکروبی آن با عصاره طبیعی گیاه می باشد. نمونه های گیاهی در مرحله گلدهی در خردادماه سال ۱۳۹۶ از ارتفاعات کوه تفتان (طول ۶۰ درجه و ۴۴ دقیقه شرقی و عرض ۲۸ درجه و ۳۳ دقیقه شمالی و در ارتفاع ۱۳۹۴ متر بالاتر از سطح دریا) جمع آوری شدند. پس از تهیه عصاره به روش خیساندن، نانوذرات نقره به روش زیستی سنتز شدند. سپس پارامترهایی همچون pH و اکسایش، غلظت نیترات نقره و زمان واکنش مورد مطالعه قرار گرفته و بهینه سازی شدند. پس از بررسی خصوصیات نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره و پراش پرتو ایکس، خاصیت ضد میکروبی آن ها علیه باکتری های سالمونلاتیفی موریوم، اشرشیاکلی، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس و قارچ های اسپیرتریلوس فلاووس و پنی سیلیوم/کسیپانسونم به دو روش انتشار از دیسک و حداقل غلظت مهارکننده رشد بررسی شد و با فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی مقایسه شد. نانوذرات به دست آمده دارای ماکسیمم جذب در طول موج ۴۱۵-۴۰۰ نانومتر، اندازه میانگین ۲۰-۲۵ نانومتر، شکل کروی و یکنواخت بودند. بررسی فعالیت ضد میکروبی نشان داد که اثرات ضد میکروبی وابسته به غلظت بوده و در غلظت های یکسان، نانوذرات دارای اثر مهارکنندگی به مراتب بیشتری در مقایسه با عصاره آبی بوده اند، به گونه ای که در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر، بیشترین اثر مهارکنندگی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (۱۹ میلی متر) و قارچ اسپیرتریلوس فلاووس (۱۹ میلی-متر) مشاهده شد. بر اساس نتایج به دست آمده گیاهان دارای پتانسیل بالایی جهت سنتز زیستی نانوذرات بوده که به عنوان میکروب زدا می توانند در صنایع گوناگون مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، فیتوستنز، گیاه مریم گلی تفتانی، نانوذرات نقره

مقدمه

میزان سطح بالا، اندازه کوچک و پراکندگی بالا است که مجموعه این عوامل سبب شده تا اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره در مقایسه با یون نقره افزایش چشمگیری داشته باشد (Kaviya et al., 2011). از آنجایی که اندازه و شکل این نانوذرات بر کارایی اثر ضد میکروبی آن‌ها وابسته می‌باشد، لذا فعالیت نانوذرات نقره تولید شده به روش زیستی بعلت کوچک‌بودن و یکنواخت‌بودن شکل و اندازه آن‌ها، دارای اثر میکروب‌کشی بیشتری خواهند بود. نانوذرات نقره تولید شده با روش زیستی دارای ویژگی‌های مفیدی مانند میزان سطح بالا، اندازه کوچک و پراکندگی بالا است که مجموعه این عوامل سبب شده تا اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره در مقایسه با یون نقره افزایش چشمگیری داشته باشد (Kaviya et al., 2011). با توجه به افزایش اثرات ضد میکروبی نقره در مقیاس نانو، می‌توان از نانوذرات نقره برای مبارزه با عوامل بیماری‌زایی مختلف استفاده نمود بطوریکه امروزه با توسعه علم نانو تکنولوژی و تولید نانوذرات نقره، این نانوذرات کاربردهای فراوانی در علوم مختلف مانند پزشکی، داروسازی، آرایشی و بهداشتی و صنعت مواد غذایی پیدا کرده اند و استفاده از نقره و نانوذرات آن به عنوان ماده باکتری‌کش قدرتمند، رونق یافته است (Chaloupka et al., 2010; Cho et al., 2005; Cao et al., 2002). یکی از صنایعی که تاکنون در استفاده از فناوری نانو پیش قدم بوده است، صنایع غذایی می‌باشد. خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره و استفاده مفید از آن در بیوتکنولوژی و مهار اختصاصی میکروب‌ها در مطالعات مختلفی بررسی و به اثبات رسیده است، بطوریکه نانوذرات نقره می‌توانند با مهار سیستم تنفسی باکتری‌ها بر متابولیسم و نیز فرایندهای تولید مثل میکروارگانیسم‌ها اثرگذار باشند و باعث ایجاد آسیب‌هایی در غشای سلولی باکتری‌ها گردند

با توجه به استفاده‌ی بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش مقاومت در باکتری‌ها، یافتن جایگزین‌های مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها امری ضروری می‌باشد. به همین دلیل مطالعات گسترده‌ای در مورد پتانسیل استفاده از ترکیبات ضد میکروبی با منشأ گیاهی و نیز استفاده از نانوذرات برای کنترل و درمان عوامل بیماری‌زا صورت گرفته است (Kaushik Thakkar et al., 2010; Wang et al., 2017; Singh et al., 2018; Vallet-Regi et al., 2019). فناوری نانو اصطلاحاً به طراحی، بررسی خصوصیات، تولید و استفاده از ساختارها و ابزارها با کنترل شکل و اندازه در مقیاس نانومتری (۱-۱۰۰ نانومتر) اطلاق می‌شود (Govindaraju et al., 2010). به‌طور کلی روش‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی را می‌توان روش‌های متداول تولید نانوذرات نام برد (Mohasseli and Pourseyedi, 2015). تولید نانوذرات با روش‌های فیزیکی و شیمیایی علاوه بر پرهزینه بودن، آلودگی‌های زیست محیطی را به همراه دارد و دارای عوارض جانبی متفاوتی خواهند بود. در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های زیستی مانند استفاده از گیاهان بدلیل ساده بودن، کم هزینه بودن، داشتن راندمان بالا، غیر سمی و سازگار با محیط زیست بودن، فراوان و قابل دسترس بودن، کامل بودن و کم بودن زمان واکنش، تولید نانوذرات با اشکال مختلف و یکنواخت بودن اندازه آن‌ها، توجه ویژه‌ای را نسبت به سایر روش‌ها به خود جلب کرده است (Wang et al., 2009; Ashiri and Safari, 2013). در میان نانومواد و نانوذرات، نانوذرات نقره به دلیل ویژگی وابسته به اندازه‌شان توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده‌اند. یکی از مهمترین ویژگی این نانوذرات، فعالیت ضد میکروبی بالای آن‌ها می‌باشد. نانوذرات نقره تولید شده با روش زیستی دارای ویژگی‌های مفیدی مانند

ماندگاری محصولات و حفظ کیفیت آن‌ها بکار گرفته شده است که از بین این روش‌ها، تغییرات در سیستم بسته بندی مواد غذایی بیشتر از سایرین مورد استفاده قرار می‌گیرد. تاکنون مطالعات مختلفی بر روی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره صورت گرفته است (Stobie et al., 2008; Monteiro et al., 2009). مطالعات نشان دادند که نانوذرات نقره بر ماندگاری بسیاری از میوه‌ها تأثیر چشمگیری داشته است (Chung et al., 2010; Ding et al., 1998). گزارشات حاکی از آن است که استفاده از نانوذرات نقره در بستر نانوزیست کامپوزیت کیتوسان برای استفاده در بسته بندی مواد غذایی، موجب مهار بسیاری از میکروب‌های بیماری‌زا شده است (Ebrahimi asl and Zarei, 2015). نتایج بررسی‌ها نشان داد که کاربرد بسته بندی با پوشش زئولیت نقره (متوسط قطر ۵۰ نانومتر) منجر به ممانعت یا کاهش رشد باکتری *Alicyclobacillus cidoterrestris* شده است (Zandi Navgaran et al., 2014). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که روش آغشته سازی با نانوذرات نقره نسبت به روش پوشش دهی سطوح اثر آنتی میکروبی بیشتری را موجب می‌شود (Furno et al., 2004). جنس *Salvia* متعلق به تیره نعنائیان (*Lamiaceae*)، با بیش از ۳۱۱ گونه در سراسر جهان به ویژه در مناطق گرمسیری و معتدل، رویشی وسیع دارد. بزرگترین منطقه رویش گونه‌های این جنس، آمریکا و جنوب غربی آسیاست (Walker & Sytsma, 2007). گیاه دارویی مریم گلی تفتانی (*Salvia rhytidea* Bent) از جمله گیاهان دارویی بومی استان سیستان و بلوچستان می‌باشد (Jassbi et al., 2017). مریم گلی گیاهی است چند ساله که دارای برگ‌های بلند و نیزه ای شکل است. سطح فوقانی و تحتانی برگ‌ها پوشیده از کرک‌های ظریفی می‌باشد. گل‌ها به رنگ بنفش متمایل به آبی، صورتی یا گاهی سفید و به صورت مجتمع در

(Christian et al., 2008). اثر نانوذرات نقره بر روی باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی، کپک‌ها و قارچ‌ها نیز به اثبات رسیده است. افزایش جمعیت و کمبود مواد غذایی، سبب شده است تا در چند دهه اخیر توجه خاصی به مواد غذایی و راه‌های نگهداری آن‌ها صورت گیرد. افزایش بیماری‌های غذایی سبب مشکلات حاد اجتماعی و اقتصادی بسیاری شده است (Salmanpour et al., 2016). تاکنون روش‌های مختلفی برای افزایش ماندگاری محصولات و حفظ کیفیت آن‌ها بکار گرفته شده است که یکی از این روش‌ها، تغییراتی در سیستم بسته بندی مواد غذایی می‌باشد. مطالعات گسترده ای بر روی اثر ضد میکروبی و مهار کنندگی نانوذرات بویژه نانوذرات نقره بر پاتوژن‌های غذایی صورت گرفته است (Zarei et al., 2014). علیرغم استقبال گسترده از استفاده از نانوذرات نقره، قوانین اتحادیه‌ی اروپا حد مجاز یون-های نقره در مواد غذایی را به 0.05 mg Ag/Kg محدود کرده است (Fernandez et al., 2009). بسیاری از منابع غذایی خصوصاً منابع غذایی دامی، منبع تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها هستند که برخی از آن‌ها بصورت میکروارگانیسم‌های بومی شناخته می‌شوند که غیر بیماری‌زا هستند و مابقی بعنوان میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند و موجب مسمومیت غذای می‌شوند که به‌عنوان مثال می‌توان به لیستریا، استافیلوکوکوس، سالمونلا، اشرشیا کلی، شیگلا و مانند آن اشاره کرد (Shekarforosh et al., 2013). تاکنون روش‌های مختلفی مانند سردسازی محصول بلافاصله پس از صید (برای دام، طیور و آبیان) (Ozogul et al., 2004)، بسته بندی در خلا و اتمسفر اصلاح شده (Ozyurt et al., 2009)، انجماد (Aubourg et al., 2005) استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و مصنوعی (Banerjee, 2006)، روکش‌دار کردن و بسته‌بندی (Fan et al., 2009) در افزایش

قسمت فوقانی ساقه‌ها، روی چرخه‌های مخصوصی مشاهده می‌شوند (Omidbaigi, 2005). از دیرباز گونه‌های مختلف جنس مریم گلی (*Salvia*) دارای استفاده‌های متعدد دارویی بوده که امروزه نیز از فرآورده‌های مختلف از جمله اسانس آنها استفاده‌های زیادی بعنوان طعم‌دهنده، نگهدارنده و آنتی‌اکسیدانت در صنایع غذایی و داروسازی کاربرد دارد (Shafizadeh, 2002). مریم گلی گیاهی است ضد تشنج، تب بر، مسکن اعصاب و در تسکین دردهای گوارشی، مقوی حافظه، کم‌کننده فشار خون، قند خون و نیز در درمان بیماری میگرن و پارکینسون مورد استفاده قرار می‌گیرد (Amiri, 2007). در طب سنتی، برخی از گونه‌های مریم گلی برای درمان سرماخوردگی، آسم، اگزما، سل و بیماری‌های پوستی استفاده شده‌اند (Salimpour, 2011). از همه اندام‌های این گیاه در طب سنتی و مدرن استفاده می‌شود، بطوریکه درمان بیش از ۶۰ بیماری بوسیله این گیاه تایید شده است (Zarei & Morovati Sharifabadi, 2017). از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای بر روی سنتز نانوذرات توسط گیاه مریم گلی تفتانی صورت نگرفته است و با توجه به اهمیت استفاده از نانوذرات نقره در میکروب‌کشی و روش سبز سنتز این نانوذرات، مطالعه حاضر، به بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره بیوسنتز شده با منشأ گیاهی (عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی) بر روی برخی از باکتری‌ها و قارچ‌ها شامل *سالمونلا تیفی موریوم*^۱، *اشرشیاکلی*^۲، *باسیلیوس سرئوس*^۳، *استافیلوکوکوس اورئوس*^۴، *آسپرژیلوس فلاووس*^۵ و *پنی سیلیوم اکسپانسونوم*^۶ می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و میکروارگانیسم‌ها: تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش، با بالاترین خلوص تهیه شدند. نمک نقره نیترات از شرکت سیگما-آلدریچ، سدیم هیدروکسید و هیدروکلریک اسید، از شرکت مرک و باکتری‌های استفاده شده *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلیوس سرئوس*، *اشرشیاکلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* و قارچ‌های استفاده شده *آسپرژیلوس فلاووس* و *پنی سیلیوم اکسپانسونوم* از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم-های صنعتی ایران^۷ تهیه شدند و در حین آزمایش برای ساختن تمامی محلول‌ها و شستشوها از آب دوبار تقطیر استفاده شد.

آماده سازی عصاره: نمونه‌های تازه گیاهی شامل ریشه گیاه مریم گلی تفتانی در مرحله گلدهی در خردادماه سال ۱۳۹۶ از ارتفاعات کوه تفتان، توابع شهرستان خاش در استان سیستان و بلوچستان جمع آوری شد. این منطقه از نظر جغرافیایی در طول ۶۰ درجه و ۴۴ دقیقه شرقی و عرض ۲۸ درجه و ۳۳ دقیقه شمالی و در ارتفاع ۱۳۹۴ متر بالاتر از سطح دریا واقع شده است. پس از تهیه، خشک و پودر کردن نمونه گیاهی، عصاره گیری به روش خیساندن (ماسراسیون) انجام شد. بدین منظور، مقدار ۱ گرم از پودر آن با ۱۰۰ میلی لیتر از آب دوبار تقطیر، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به هم زده و حرارت داده شد (Azizian-Shermeh et al., 2019). مخلوط حاصل پس از سرد شدن در دمای آزمایشگاه، توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف و برای حذف کامل ذرات معلق در آن به مدت ۳۰ دقیقه بوسیله دستگاه سانتریفیوژ با سرعت rpm

1. *Salmonella tifimurium* PTCC 1609
2. *Escherichia coli* PTCC 1763
3. *Bacillus cereus* PTCC 1154
4. *Staphylococcus aureus* PTCC 1431
5. *Aspergillus Flavus* PTCC 5004
6. *Penicillium expansum* PTCC 5251

7. Persian Type Culture Collection- PTCC

گرفت. بدین منظور، محلولی با اعمال تمامی شرایط بهینه شده قبل، از لحظه ساخته شدن نمونه تا ۴۸ ساعت پس از آن آماده و از تمامی آن‌ها طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و زمان بهینه انتخاب شد.

بررسی خصوصیات و ویژگی‌های نانوذرات بیوستنژ شده: به منظور تأیید نتایج بدست آمده از طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی و تعیین توزیع شکل و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده با اعمال فاکتورهای موثر، توسط تکنیک‌های پراش پرتو ایکس (X-ray diffraction) مدل Bruker-D8 advance و میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission Electron Microscopy) مدل Zeiss-EM10C مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی فعالیت ضد میکروبی: نمونه‌های میکروبی با استفاده از محیط کشت لوریا برتانی برای باکتری‌ها و سابورد دکستروز برای قارچ‌ها و بر اساس روش‌های استاندارد احیاء گردیدند و به منظور سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲۴ ساعته هر میکروارگانیسم به صورت مجزا به لوله‌های آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر مولر هینتون برات تلقیح شد و سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک فارلند آماده گردید. بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی ابتدا با روش انتشار از چاهک در آگار (Agar Well Diffusion) انجام شد (Azizian- Shermeh et al., 2016 a). بدین منظور از سوسپانسیون هر میکروب به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و سابورد دکستروز آگار برای قارچ‌ها ریخته و با سواب استریل در سه جهت به صورت انبوه کشت داده شد. سپس در سطح هر یک از پلیت‌های کشت داده شده چاهک‌هایی به قطر تقریباً ۶ میلی‌متر و به فاصله ۲ سانتی‌متری از هم ایجاد گردید و درون هر چاهک

۱۰۰۰۰ (دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. عصاره بدست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای استفاده‌های بعدی نگهداری شد.

سنتز اولیه نانوذرات نقره: ابتدا مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاه به ۴ میلی‌لیتر از محلول نمک نقره نیترات با غلظت ۱ میلی‌مولار اضافه شد و محصول حاصل جهت بررسی سنتز نانوذرات و اندازه آن‌ها توسط اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی در محدوده جذب ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر و میکروسکوپ الکترونی عبوری گرفته و مورد مطالعه قرار گرفت (Azizian-Shermeh et al., 2017 a).

بررسی پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره: بمنظور سنتز نانوذراتی با شکل و اندازه مناسب، پارامترهای موثر بر سنتز همچون pH واکنش، غلظت نمک نقره نیترات و زمان واکنش مورد مطالعه قرار گرفته و بهینه‌سازی شدند (Azizian-Shermeh et al., 2019 b). جهت بررسی و بهینه‌سازی مقدار pH، پنج سری محلول حاوی عصاره و محلول نمک نقره نیترات ساخته و پس از تنظیم pH (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰)، طیف‌های جذبی محلول‌ها توسط اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی در محدوده جذب ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر گرفته و pH بهینه انتخاب شد. برای تنظیم pH محلول از یکی از دو محلول NaOH و یا HCl با غلظت ۰/۱ مولار استفاده گردید. برای بررسی تأثیر غلظت یون نقره (I)، محلول‌هایی حاوی عصاره و غلظت‌های متفاوت محلول نقره نیترات (۱ تا ۵) میلی‌مولار افزوده و پس از تنظیم pH بهینه، از محلول‌های ساخته شده طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و غلظت بهینه انتخاب شد. با تنظیم شرایط بیوستنژ نانوذرات نقره در پارامترهای بهینه شده شامل (pH واکنش و غلظت محلول نقره نیترات)، اثر زمان بر بیوستنژ نانوذرات نقره و میزان پایداری نانوذرات بدست آمده مورد بررسی قرار

چاهکی و تعیین MIC استفاده شد. سری رقت‌های استفاده شده برای تعیین‌هاله عدم رشد در روش انتشار از چاهک ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و محلول ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نقره نیترات و آنتی‌بیوتیک ضد باکتریایی آمپی‌سیلین و جنتامیسین و آنتی‌بیوتیک ضد قارچی کلوتریمازول به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. برای تعیین MIC نیز برای هر باکتری و قارچ یک سری ۱۰ لوله ای با رقت‌های ۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات نقره استفاده گردید و به عنوان کنترل مثبت از لوله حاوی فقط محیط کشت همراه با میکروب تلقیح شده به کار گرفته شد و برای کنترل منفی و به منظور اطمینان از استریل بودن مراحل انجام کار و نیز سوسپانسیون نانوذرات نقره سنتز شده، درون یک لوله تنها محیط کشت و در لوله دیگری محیط کشت حاوی محلول با غلظت نیم میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات نقره اضافه گردید. سایر مراحل انجام کار همانند نحوه آماده سازی محیط‌های کشت، سوبیه‌های میکروبی استفاده شده و روش انجام، مشابه روش‌های استفاده شده در آزمایش مربوط به عصاره آبی گیاه بوده است.

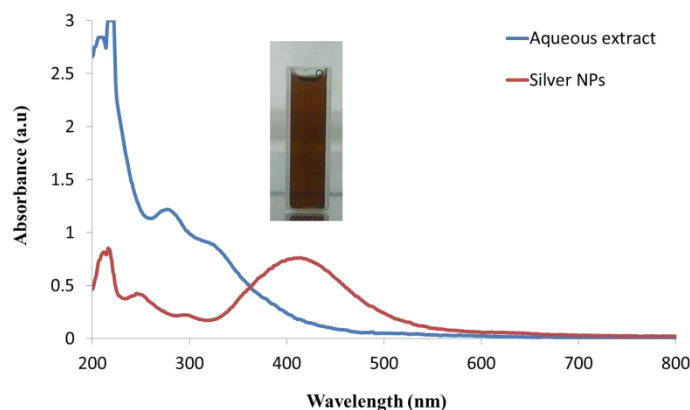
نتایج

در سنتز اولیه نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه مریم‌گلی تفتانی، عصاره بعنوان عوامل کاهنده (احیاکننده) و پایدارکننده نقش بازی می‌کند. شکل ۱ طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی و تغییر رنگ محلول حاوی نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره بدون اعمال شرایط بهینه را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۱، در طول موج ۴۱۵-۴۰۰ نانومتر که مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره می‌باشد، عصاره فاقد پیک بوده که این مشاهده بیانگر آن است که وجود پیک در طول موج مورد نظر، بدلیل

مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های آماده شده عصاره آبی با سمپلر ریخته شد. از آنتی‌بیوتیک‌های ضد باکتریایی آمپی‌سیلین و جنتامیسین و ضد قارچی کلوتریمازول به عنوان شاهد مثبت و از محلول DMSO به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. پس از اتمام کار محیط‌های کشت باکتریایی در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت و کشت‌های قارچی در انکوباتور ۲۸ درجه به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گشت و در نهایت پس از گذشت ۴۸-۲۴ ساعت، کشت‌های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل‌هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفته و قطر‌هاله‌های تشکیل شده بر حسب میلی‌متر اندازه گیری و گزارش شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره مورد نظر، از روش رقت لوله‌ای استفاده گردید (Azizian-Shermeh et al., 2016 a). بدین منظور از عصاره آبی آماده شده در لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیتون برات سری رقت‌های ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد. سپس به هر یک از لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده تلقیح گردید. یک لوله آزمایش حاوی محیط کشت و میکروب تلقیح شده ولی فاقد عصاره به عنوان شاهد مثبت و لوله آزمایش حاوی محیط کشت با رقت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره ولی فاقد باکتری به عنوان شاهد منفی نیز آماده گردید و در نهایت تمامی لوله‌های آزمایش به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه برای باکتری‌ها و دمای ۲۸ درجه برای قارچ‌ها و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انتقال داده شدند. بعد از انکوباسیون، هر لوله از نظر کدورت حاصل از رشد میکروارگانیسم بررسی و کمترین رقتی که در آن به علت اثر مهارکنندگی عصاره کدورتی ایجاد نشده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

برای بررسی اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی نانوذرات نقره سنتز شده نیز از روش‌های انتشار

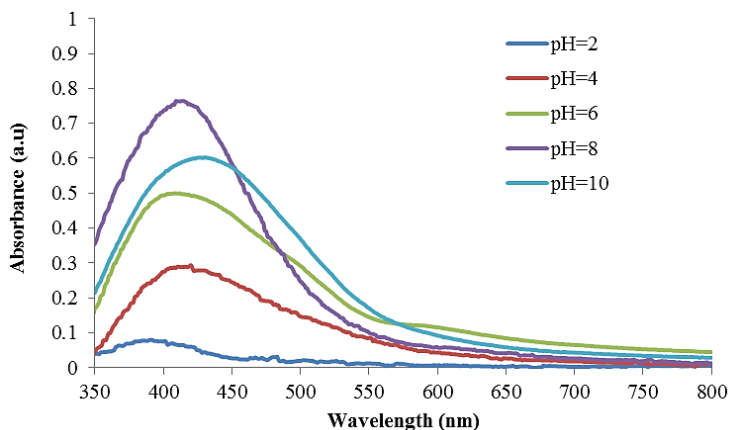
سنتز موفق و وجود نانوذرات نقره در محلول می باشد و عصاره هیچ گونه تداخل و مزاحمتی در طیف حاصل از نانوذرات نقره ایجاد نکرده است.



شکل ۱: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره و عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی بدون اعمال شرایط بهینه

نسبت به سایر pHها کمتر بوده است. به طوری که می توان گفت، سنتز کمی در این pH انجام گرفته است. لیکن با افزایش تدریجی میزان pH محلول تا ۸، جذب محلول بصورت چشمگیری افزایش یافته است که دلیلی بر افزایش در مقدار سنتز نانوذرات نقره است. در pH=۸، طیفی متقارن با بیشترین مقدار جذب نسبت به مابقی pHها، مشاهده شده است اما در pH بالاتر (pH=۱۰) افت شدید و محسوسی در مقدار جذب ملاحظه شده است. در نتیجه مقدار pH=۸ بعنوان pH بهینه و مناسب انتخاب شد.

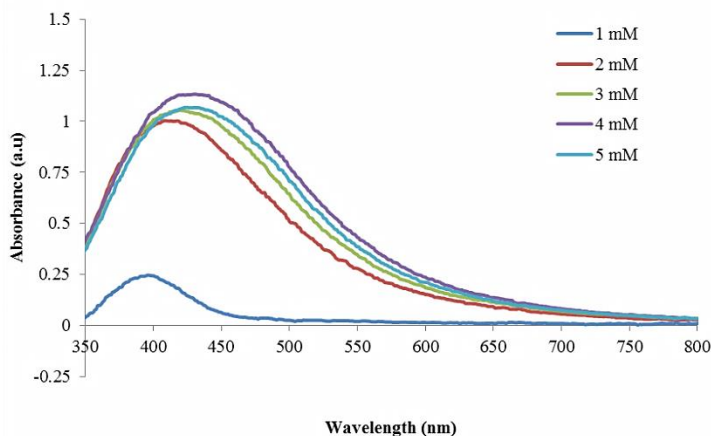
در بررسی تأثیر pH، پس از اضافه کردن عصاره به نمک نقره نیترات، مشاهده شد که رنگ محلول به رنگ قهوه‌ای متمایل شده است (شکل ۱). که این رنگ دلیلی بر سنتز موفق این نانوذرات می باشد. مقدار pH محلول بدست آمده توسط دستگاه pH متر، عدد ۵/۶۳ قرائت شد. به جهت بررسی اثر فاکتور pH بر روند سنتز نانوذرات، pHهای بالاتر و کمتر از مقدار اولیه مورد مطالعه قرار گرفت و از تمامی نمونه‌ها طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته شد (شکل ۲). نتایج نشان داد که در pH=۲ تغییر محسوسی در جذب ملاحظه شده اما مقدار جذب



شکل ۲: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره بیوسنتز شده در pHهای متفاوت

یون نقره (AgNO_3) ادامه دارد اما در غلظت ۵ میلی-مولار، نه تنها افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقدار جذب مربوط به نانوذرات دیده نشد بلکه حتی افت شدیدی در میزان جذب مشاهده شده است. در نتیجه مقدار غلظت ۴ میلی-مولار از نمک نقره نترات بعنوان غلظت بهینه و مناسب انتخاب شد.

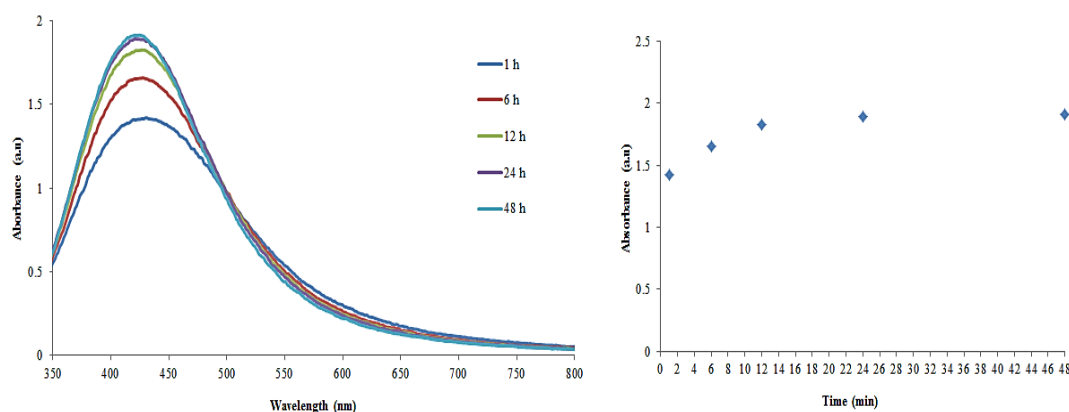
تأثیر مقدار غلظت یون فلزی بر روند سنتز نانوذرات توسط شکل ۳ بخوبی نشان داده شده است. با توجه به شکل ۳، ملاحظه شد که با افزایش تدریجی در میزان غلظت یون نقره، جذب مربوط به محلول حاوی نانوذرات نقره افزایش چشمگیری داشته است. این افزایش تا غلظت ۴ میلی-مولار از



شکل ۳: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره بیوسنتز شده در غلظت‌های متفاوت نمک نقره نترات

خط راست بوده است، اما از زمان ۱۲ ساعت به بعد، تغییر محسوسی در مقدار این جذب مشاهده نشده است که این مشاهده، پایدار بودن نانوذرات حاصل را به اثبات می‌رساند. در نتیجه، زمان ۱۲ ساعت بعنوان زمان بهینه و مناسب انتخاب شد (شکل ۴).

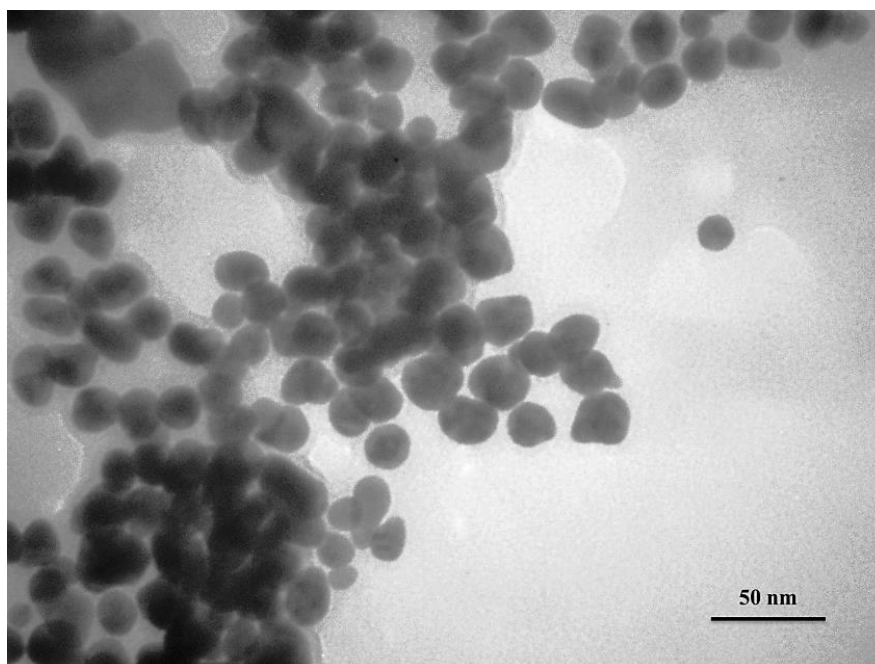
نتایج بررسی تأثیر زمان مجاورت محلول نقره نترات با عصاره آبی گیاه بر روند واکنش نشان می‌دهند که با افزایش زمان برهمکنش میان واکنشگرها از لحظه اول، مقدار جذب افزایش می‌یابد و این افزایش در جذب تا ۱۲ ساعت ابتدایی، کاملاً صعودی و بصورت



شکل ۴: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره بیوسنتز شده و حداکثر جذب آن‌ها در زمان‌های مختلف

تمامی شرایط بهینه شده را نشان می‌دهد. تصویر نشان می‌دهد که نانوذرات بدست آمده همگی تقریباً کروی بوده و اندازه متوسط آنها بین ۲۰-۲۵ نانومتر بوده است.

بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): توزیع شکل و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده توسط تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۵ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات نقره سنتز شده با اعمال



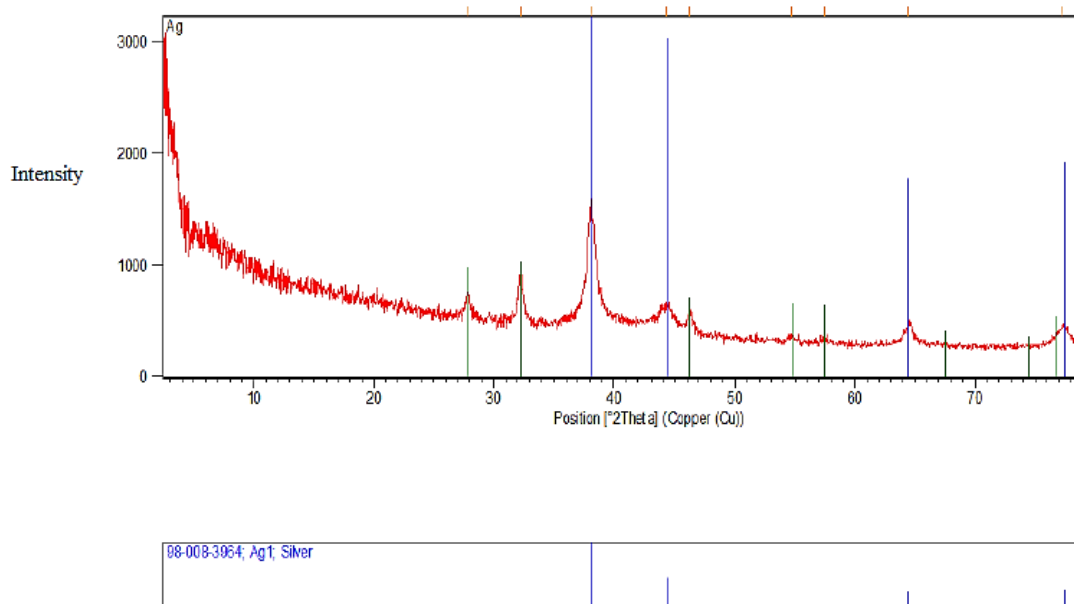
شکل ۵: تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات نقره بیوستنژ شده توسط عصاره گیاه مریم گلی تفتانی

نواحی $2\theta = 38/13, 46/23, 64/21, 76/47$ نانوذرات نقره پیکهای واضحی وجود دارد که دلیلی بر سنتز موفق نانوذرات می‌باشد. آنالیز ساختاری نشان می‌دهد که نانوذرات نقره دارای ساختار بلوری با شاخص‌های میلر (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) در شبکه مکعبی می‌باشد. وجود قله‌های تیز در الگوها نشان‌دهنده درجه بالایی از بلورینگی برای نانوذرات می‌باشد. میانگین اندازه‌ی دانه‌های بلوری سنتز شده با محاسبه فرمول دبای-شرر $24/82 - 19/65$ نانومتر برآورد شدند که با نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری و نتایج به‌دست‌آمده از بررسی طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی کاملاً مطابقت دارد.

بررسی طیف پراش پرتو ایکس (XRD): برای بررسی بیشتر و مطالعه‌ی ساختار بلوری نانوذرات نقره سنتز شده، از آنالیز پراش پرتو ایکس استفاده شد (شکل ۶). میانگین اندازه دانه‌های بلوری با محاسبه‌ی پهنای پیکهای تشکیل شده در نمونه‌ها با استفاده از فرمول دبای-شرر (فرمول ۱)، برآورد شد:

$$D = 0.9\lambda / \beta \cos \theta \quad \text{فرمول ۱:}$$

که β ، پهنای پیکها در نصف ارتفاع ماکزیمم، λ طول موج اشعه X برابر با $1/54$ نانومتر، θ زاویه بین پرتو بازتابش و تابش و D اندازه دانه‌های بلوری می‌باشد. همانطوریکه در شکل ملاحظه می‌شود، در



شکل ۶: تصویر پراش پرتو ایکس نانوذرات نقره بیوستتزر شده توسط عصاره گیاه مریم گلی تفتانی پس از اعمال تمامی شرایط بهینه شده

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی و نانوذرات نقره بیوستتزر شده از آن: نتایج بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی نشان داد، عصاره اثر مهار کنندگی قابل قبولی بر روی همه باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده دارد که با افزایش غلظت عصاره، این اثر مهار کنندگی بیشتر و قطر هاله عدم رشد نیز بیشتر می‌شود. نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی با روش انتشار چاهکی در جدول ۱ نشان داده شد. نتایج نشان می‌دهند که عصاره آبی بیشترین و کمترین اثر بازدارندگی را علیه باکتری سالمونلا تیفی موریوم و قارچ آسپرژیلوس فلاووس و باکتری اشرشیاکلی و قارچ پنی سیلیوم اکسپانسونم به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۱۵ و ۱۶ میلی‌متر و ۱۱ و ۱۳ میلی‌متر دارد. جدول ۲ نتایج مربوط به حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی علیه میکروب‌های منتخب به روش رقت لوله‌ای را نشان می‌دهد. بیشترین حساسیت را در بین باکتری‌های مورد آزمایش، باکتری سالمونلا تیفی

موریوم (MIC ۱۲/۵) و در بین قارچ‌ها، آسپرژیلوس فلاووس (MIC ۲۵) و کمترین حساسیت به عصاره را باکتری اشرشیاکلی و قارچ پنی سیلیوم اکسپانسونم به ترتیب (MIC ۵۰) و (MIC ۵۰) دارند. نتایج تست‌های ضد میکروبی مربوط به نانوذرات نقره بیوستتزر شده با روش‌های انتشار چاهکی و تعیین MIC به ترتیب در جدول‌های ۳ و ۴ ارائه شده است. جدول ۳ نشان می‌دهد که، نانوذرات نقره سنتز شده اثر میکروب کشی قابل توجه‌ای بر روی نمونه‌های مورد آزمایش نشان دادند، به طوری که حتی در غلظت‌های خیلی کم نیز از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها جلوگیری کردند و این در حالی است که عصاره آبی گیاه در غلظت‌های استفاده شده مربوط به نانوذرات، فاقد هر گونه اثر ضد میکروبی بوده و همچنین اثر ضد میکروبی یون نقره نیز در مقایسه با نانوذرات نقره بسیار کمتر بوده است. نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات نقره بیشترین و کمترین تأثیر را روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (قطر هاله ۲۶ میلی‌متر) و باکتری سالمونلا تیفی موریوم (قطر هاله ۱۹ میلی‌متر)

جدول ۵، مقایسه فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی را با نانوذرات نقره بیوستنژ شده از آن و محلول نیترات نقره در غلظت مشترک ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با روش انتشار از چاهک و جدول ۶، مقایسه فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی را با نانوذرات نقره بیوستنژ شده از آن را در غلظت‌های مشترک در روش حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) را نشان می‌دهد. نتایج حاکی از آن است، نانوذرات نقره بیوستنژ شده نسبت به عصاره آبی و محلول نیترات نقره به مراتب دارای فعالیت ضد میکروبی و اثر میکروب کشی بیشتری می‌باشد.

و قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (قطره‌اله ۲۲ میلی‌متر) و قارچ پنی سیلیوم اکسپانسونم (قطره‌اله ۱۹ میلی‌متر) داشته است. جدول ۴ نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) نانوذرات بیوستنژ شده علیه میکروب‌های منتخب به روش رقت لوله‌ای را نشان می‌دهد. بیشترین حساسیت را در بین باکتری‌های مورد آزمایش، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (MIC ۳/۱۲۵) و در بین قارچ‌ها، *آسپرژیلوس فلاووس* (MIC ۲۵) و کمترین حساسیت به عصاره را باکتری *اشرشیا کلی* و قارچ پنی سیلیوم اکسپانسونم به ترتیب (MIC ۲۵) و (MIC ۱۲/۵) دارند.

جدول ۱: قطر‌اله عدم رشد میکروبی در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی با روش انتشار از چاهک (بر حسب میلی‌متر)

میکروارگانیزم‌ها	غلظت‌های مختلف عصاره آبی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)								
	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	آمی سیلین	جتتامیسین	کلوتریمازول	DMSO
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۵	۷	۹	۱۰	۱۳	۲۵	۲۵	-	۰
<i>باسیلوس سرئوس</i>	۶	۸	۱۰	۱۲	۱۴	۲۶	۲۵	-	۰
<i>اشرشیا کلی</i>	۸	۱۰	۱۱	۱۳	۱۱	۲۶	۲۳	-	۰
<i>سالمونلا تیفی موریوم</i>	۹	۱۰	۱۳	۱۴	۱۵	۲۶	۲۳	-	۰
<i>آسپرژیلوس فلاووس</i>	۵	۱۰	۱۲	۱۵	۱۶	-	-	۲۶	
<i>پنی سیلیوم اکسپانسونم</i>	۵	۸	۸	۱۱	۱۳	-	-	۲۷	

جدول ۲: حداقل غلظت مهارکنندگی رشد میکروب (MIC) در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی (بر حسب میکروگرم/میلی‌لیتر)

میکروارگانیزم‌ها	غلظت‌های مختلف عصاره آبی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)							
	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	+	+	+	+	**	-	-	-
<i>باسیلوس سرئوس</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>اشرشیا کلی</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>سالمونلا تیفی موریوم</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>آسپرژیلوس فلاووس</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>پنی سیلیوم اکسپانسونم</i>	+	+	+	+	+	-	-	-

* توانایی رشد میکروارگانیزم در حضور غلظت مشخص عصاره آبی
 ** عدم توانایی رشد میکروارگانیزم در حضور غلظت مشخص عصاره آبی

جدول ۳: قطر هاله عدم رشد میکروبی در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره با روش انتشار از چاهک (بر حسب میلی‌متر)

غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (میکروگرم بر میلی‌لیتر)						میکروارگانیزم‌ها			
۱۰۰	۶۰	۴۰	۲۰	۱۰	محلول نمک نقره (۵۰ μg/ml)				
کلوتریمازول (۵۰ μg/ml)	جنتامیسین (۵۰ μg/ml)	آمپی‌سیلین (۵۰ μg/ml)	محلول نمک نقره (۵۰ μg/ml)	۱۰۰	۶۰	۴۰	۲۰	۱۰	استافیلوکوکوس اورئوس
-	۲۹	۲۸	۷	۲۶	۲۰	۱۷	۱۵	۱۳	استافیلوکوکوس اورئوس
-	۲۷	۲۹	۱۱	۲۳	۱۸	۱۴	۱۳	۱۱	باسیلوس سرئوس
-	۲۶	۲۸	۱۳	۲۰	۱۸	۱۵	۱۱	۵	اشرشیا کلی
-	۲۷	۲۹	۱۲	۱۹	۱۷	۱۶	۱۴	۱۲	سالمونلا تیفی موریوم
۲۸	-	-	۱۲	۲۲	۲۰	۱۷	۱۴	۱۲	آسپرژیلوس فلاووس
۲۷	-	-	۱۰	۱۹	۱۷	۱۳	۱۰	۵	پنی سیلیوم اکسپانسونم

جدول ۴: حداقل غلظت مهار کننده رشد میکروب (MIC) در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (بر حسب میکروگرم/میلی‌لیتر)

غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (میکروگرم بر میلی‌لیتر)										میکروارگانیزم‌ها
۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲	۱/۵۶	۰/۷۸	
-	-	-	-	-	-	-	-**	+	+	استافیلوکوکوس اورئوس
-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	باسیلوس سرئوس
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	اشرشیا کلی
-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	سالمونلا تیفی موریوم
-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	آسپرژیلوس فلاووس
-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	پنی سیلیوم اکسپانسونم

* توانایی رشد میکروارگانیزم در حضور غلظت مشخص نانوذرات نقره

** عدم توانایی رشد میکروارگانیزم در حضور غلظت مشخص نانوذرات نقره

جدول ۵: مقایسه قطر هاله عدم رشد میکروبی عصاره آبی گیاه مریم کلی تفتانی و نانوذرات نقره بیوسنتز شده از آن در غلظت

مشترک ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با روش انتشار از چاهک (بر حسب میلی‌متر)

نمونه‌ها						
کلوتریمازول (۵۰ μg/ml)	جنتامیسین (۵۰ μg/ml)	آمپی‌سیلین (۵۰ μg/ml)	محلول نمک نقره (۵۰ μg/ml)	نانوذرات نقره (۵۰ μg/ml)	عصاره آبی (۵۰ μg/ml)	میکروارگانیزم‌ها
-	۲۹	۲۸	۷	۱۹	۷	استافیلوکوکوس اورئوس
-	۲۷	۲۹	۱۱	۱۶	۸	باسیلوس سرئوس
-	۲۶	۲۸	۱۳	۱۷	۱۰	اشرشیا کلی
-	۲۷	۲۹	۱۲	۱۶	۱۰	سالمونلا تیفی موریوم
۲۸	-	-	۱۲	۱۹	۱۰	آسپرژیلوس فلاووس
۲۷	-	-	۱۰	۱۵	۸	پنی سیلیوم اکسپانسونم

جدول ۶: مقایسه حداقل غلظت مهار کنندگی رشد میکروب (MIC) در غلظت‌های مشترک عصاره آبی گیاه مریم گلی نفتانی و نانوذرات نقره بیوستتز شده از آن (بر حسب میکروگرم/میلی لیتر)

غلظت‌های مشترک عصاره آبی و نانوذرات نقره بیوستتز شده از آن (میکروگرم بر میلی لیتر)								میکروارگانیزم‌ها	
۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۳/۱۲	۱/۵۶		
-	-	-	**	+	+	+	+	عصاره آبی	استافیلوکوکوس اورئوس
-	-	-	-	-	-	-	+	نانوذرات نقره	
-	-	-	-	+	+	+	+	عصاره آبی	باسیلوس سرئوس
-	-	-	-	-	-	+	+	نانوذرات نقره	
-	-	-	+	+	+	+	+	عصاره آبی	اشرشیا کلی
-	-	-	-	-	-	+	+	نانوذرات نقره	
-	-	-	-	-	+	+	+	عصاره آبی	سالمونلا تیفی موربیوم
-	-	-	-	-	+	+	+	نانوذرات نقره	
-	-	-	-	+	-	+	+	عصاره آبی	آسپرژیلوس فلاوروس
-	-	-	-	-	+	+	+	نانوذرات نقره	
-	-	-	+	+	+	+	+	عصاره آبی	پنی سیلیوم اکسیانسوم
-	-	-	-	-	+	+	+	نانوذرات نقره	

* توانایی رشد میکروارگانیزم در حضور غلظت مشخص عصاره آبی و نانوذرات نقره

** عدم توانایی رشد میکروارگانیزم در حضور غلظت مشخص عصاره آبی و نانوذرات نقره

بحث

راندمان بالاتر و تقریباً فاقد معایب است. مطالعه حاضر بر روی ریشه‌های گیاه مریم گلی نفتانی (*Salvia rhytidea*) صورت گرفته است. مطالعات نشان می‌دهد، ریشه این گیاه دارای فعالیت‌های زیستی همچون: فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد فارچی، سمیت می باشد (Jassbi et al., 2015). در مطالعه ای دیگر، از ریشه این گیاه ترکیبات: Sahandinone, 12-deoxyalvippisone, miltirone, 7- α -acetoxyroyleanone-7,14-labda-7,13-dien-13-ol جدا شد. اثرات بیولوژیکی این ترکیبات بعنوان ترکیبات آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، سمیت و ضد مالاریا اثبات شده است. ترکیبات اول و سوم

در این مطالعه نانوذرات نقره با روش زیستی و دوستدار محیط زیست و بدون استفاده از هرگونه مواد شیمیایی خطرناک تولید شده است. استفاده از ظرفیت بالای گیاهان ما را در دست یافتن به نانوذراتی با پایداری خیلی بیشتر از روشهای شیمیایی می‌رساند. سنتز زیستی نانوذرات تولید شده توسط گیاهان دارویی می‌تواند در موارد متنوعی از جمله انتقال داروها در بدن استفاده شود. از مزایای این روش، به ساده و کم هزینه بودن، امکان تولید نانوذرات با اشکال مختلف و اندازه یکسان می‌توان اشاره کرد. روش مذکور نسبت به دو روش دیگر سنتز نانوذرات (فیزیکی و شیمیایی)، دارای

تدریجی میزان pH محلول تا ۸، جذب محلول حاصل افزایش می‌یابد که مربوط به افزایش در میزان سنتز نانوذرات است. در $pH=8$ ، پیک شارپی ملاحظه می‌شود. اینگونه به نظر می‌رسد که در pH بالای ۸ ($pH=10$) یون‌های نقره هیدرولیز شده به گونه ای که موجب بوجود آمدن گونه‌های پایدار هیدروکسیدهای یون نقره می‌شود و در انتها از ورود این یون به واکنش احیای بیولوژیکی و زیستی ممانعت می‌شود (Gardea-Torresdey, 1999, Shenva et al., 2011).

در نتیجه مقدار $pH=10$ بعنوان اسیدیته بهینه انتخاب شد. در سنتز نانوذرات بوسیله عصاره گیاهان، عصاره نقش کاهندگی و احیا کردن یون‌های فلزی و همچنین پایدار کردن این نانوذرات را ایفا می‌کند (Shankar et al., 2002). به محض اضافه کردن واکنشگرها و رسانیدن اسیدیته محلول به ۸، مشاهده شد که رنگ محلول به قهوه‌ای تیره تغییر کرده است که نشان دهنده سنتز موفق نانوذرات نقره می‌باشد. شکل ۱ نشان می‌دهد که نانوذرات سنتز شده در 410 نانومتر دارای ماکسیمم جذب هستند که این طول موج مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره است. لیکن در این طول موج، عصاره هیچ جذبی ندارد و این مشاهده دلیلی بر وجود نانوذرات نقره در محیط و عدم دخالت عصاره در طیف حاصل از نانوذرات نقره سنتز شده دارد. گزارشات نشان می‌دهند که افزایش جذب در اثر افزایش غلظت یون فلزی بدین دلیل است که یون‌ها بیشتر در معرض عمل کاهش قرار خواهند گرفت و نانوذرات بیشتری تولید خواهد شد (Azizian-Shermeh et al., 2017).

c. پژوهش‌های متعددی تأثیر غلظت یون فلزی بر سنتز نانوذرات را اثبات کرده اند. مطالعات نشان می‌دهد با افزایش غلظت یون فلز، جذب مشاهده شده نیز افزایش می‌یابد که این پدیده بدین علت است که با افزایش مقدار یون فلز، یون‌های بیشتری احیاء شده

دو ماده سرطان زا بسیار قوی با عملکرد بالا هستند (Jassbi et al., 2017) و از مهمترین علت انتخاب ریشه این گیاه جهت مطالعه و سنتز نانوذرات نقره، وجود ترکیبات و فعالیت‌های بیولوژیکی مذکور بوده است. بگونه ای که مطالعات نشان می‌دهد گیاهان دارای فعالیت‌های بیولوژیکی بالا خصوصا آنتی اکسیدانی بالا، توانایی احیای یون‌های فلزی و تبدیل آن‌ها به اتم‌های فلزی در ابعاد نانومتری را دارند و بهترین گزینه جهت احیای زیستی هستند (Azizian-Shermeh et al., 2017 a ; Azizian-Shermeh et al., 2017 c). یکی از محدودیت‌ها در اکثر روش‌های سنتز نانوذرات، پراکنش زیاد نانوذرات در دامنه وسیع از اندازه‌ها در ابعاد نانومتری است. این محدودیت بزرگ را می‌توان با روش‌های مختلف از قبیل بهینه pH، تغییرات غلظت‌های مختلف محلول نمکی و مدت زمان رفع کرد و دامنه تغییرات اندازه نانوذرات را کاهش داد و به یک شرایط بهینه و مناسب دست پیدا کرد (Etemadi et al., 2017). طیف جذبی نوری نانوذرات فلزی به چندین فاکتور مانند: اندازه ذرات، شکل، برهمکنش ذرات با یکدیگر و ضریب شکست محیط حساس است. pH یکی از مهمترین پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات طلا می‌باشد. پیش از این گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر pH و اکسایش بر تنوع اندازه و شکل نانوذرات ارائه شده است (Azizian-Shermeh et al., 2016 b). همچنین گزارش‌ها حاکی از آن است که pH بر روی شکل نانوذرات تأثیر چشمگیری ندارد و تنها اندازه آن‌ها به میزان زیاد تحت تأثیر قرار می‌دهد (Azizian-Shermeh et al., 2017 b). با توجه به یافته‌های مربوط به بهینه pH، مشاهده شد که در $pH=$ تغییر قابل ملاحظه‌ای در جذب ملاحظه نشده به گونه‌ای که می‌توان ادعا نمود که سنتز قابل ملاحظه ای صورت نگرفته است. اما با افزایش

ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۱۵ و ۱۶ میلی‌متر و ۱۱ و ۱۳ میلی‌متر دارد. در روش MIC، عصاره آبی بیشترین حساسیت را در بین باکتری‌های مورد آزمایش، باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* (MIC ۱۲/۵) و در بین قارچ‌ها، *آسپرژیلوس فلاووس* (MIC ۲۵) و کمترین حساسیت به عصاره را باکتری *اشرشیاکلی* و قارچ *پنی سیلیوم اکسپانوسوم* به ترتیب (MIC ۵۰) و (MIC ۵۰) دارند. همچنین نانوذرات نقره سنتز شده در این روش دارای بیشترین اثر مهارکنندگی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۶ میلی‌متر) و قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (۲۲ میلی‌متر) و کمترین اثر مهارکنندگی علیه باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* (۱۹ میلی‌متر) و قارچ *پنی سیلیوم اکسپانوسوم* (۱۹ میلی‌متر) داشته است. در بررسی اثر مهارکنندگی نانوذرات در روش MIC، نانوذرات بیشترین حساسیت را در بین باکتری‌های مورد آزمایش، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (MIC ۳/۱۲۵) و در بین قارچ‌ها، *آسپرژیلوس فلاووس* (MIC ۲۵) و کمترین حساسیت به عصاره را باکتری *اشرشیاکلی* و قارچ *پنی سیلیوم اکسپانوسوم* به ترتیب (MIC ۲۵) و (MIC ۱۲/۵) دارند. در مقایسه قطر هاله عدم رشد میکروبی عصاره آبی و نانوذرات نقره بیوستنژ شده از آن در غلظت مشترک ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با روش انتشار از چاهک، نانوذرات نقره دارای بیشترین اثر مهارکنندگی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۹ میلی‌متر) و قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (۱۹ میلی‌متر) بوده است. در صورتی که این اثر مهارکنندگی برای عصاره آبی در همین غلظت مشترک و برابر با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۷ میلی‌متر) و قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (۱۰ میلی‌متر) بوده است. مطالعات نشان می‌دهد که اسانس و عصاره‌های مختلف گیاه مریم گلی تفتانی دارای فعالیت ضد میکروبی و میکروب کشی نسبتاً قابل

و نتیجتاً نانوذرات بیشتری تولید خواهد شد (Dwivedi and Gopal, 2010). اما کاهش بیش از حد یا افزایش نامحسوس در مقدار جذب مربوط به نانوذرات در اثر افزایش بیش از اندازه غلظت یون نقره، می‌تواند بدلیل چسبندگی نانوذرات و سنتز نانوذراتی با اندازه بزرگتر باشد (Mock et al., 2002). با توجه به دلایل ذکر شده غلظت ۴ میلی‌مولاری از یون نقره بعنوان غلظت مناسب انتخاب شد. زمان نیز همانند فاکتورهای مورد بحث، تأثیر بسزایی در سنتز و پایدار بودن نانوذرات دارد (Philip, 2010)، بطوریکه در واکنش‌های اینچینی، اگر سنتز کامل انجام نشده باشد، با گذشت زمان تولید نانوذرات بیشتر خواهد بود. همچنین عامل زمان، مهمترین فاکتور برای اثبات پایداری نانوذرات سنتز شده می‌باشد (Azizian, Shermeh et al., 2017 a)، بگونه‌ای که اگر با گذشت زمان، افزایش قابل توجه‌ای در میزان جذب نانوذرات نقره ملاحظه نشود، می‌توان اینگونه استنباط کرد که نانوذرات حاصل با گذر زمان کاملاً پایدار هستند. با توجه به دلایل عنوان شده، واکنش احیای یون‌های نقره توسط عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی در ۱۲ ساعت کامل شده است. مقاومت روز افزون باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متداول موجود در بازار و شیوع بیماری‌های عفونی که جهت درمان نیاز به آن داروها دارند و نیز توانایی بالقوه برخی از گیاهان جهت تولید مواد ضد میکروبی باعث گرایش محققان به جایگزینی گیاهان دارویی با آنتی‌بیوتیک‌ها شده است. در مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده و عصاره آبی گیاه مورد نظر توسط دو روش انتشار دیسک در آگار و MIC بررسی شد. نتایج نشان می‌دهند که عصاره آبی بیشترین و کمترین اثر بازدارندگی را علیه باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و باکتری *اشرشیاکلی* و قارچ *پنی سیلیوم اکسپانوسوم* به

متانولی با غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر در برابر کلیه میکروارگانیسم‌ها مؤثر بوده است (Oliveira et al., 2019). در تحقیقی مشابه که بر روی فعالیت ضد قارچی بخشهای مختلف گیاه مریم گلی تفتانی به عنوان یک گیاه دارویی با ارزش در برابر گونه‌های مختلف کانیدیدا در استان کرمان انجام شد، نتایج حاکی از آن بود که، عصاره متانولی دارای بیشتر حساسیت علیه گونه‌های مختلف قارچ کانیدیدا بوده است (Zahabi et al., 2020).

تاکنون مطالعات متعددی جهت تعیین مکانیسم اثر نانوذرات بر روی باکتری انجام گرفته است. پژوهش‌های بسیاری، مبتنی بر واکنش‌های احتمالی بین نانوذرات با ماکرومولکول‌های موجودات زنده نشان می‌دهد که اختلاف بین بار منفی میکروارگانیسم و بار مثبت نانوذرات فلزی، بصورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذرات عمل کرده و باعث اتصال نانوذرات به سطح سلول شده و در نتیجه می‌تواند باعث مرگ سلول شود (Azizian-Shermeh et al., 2018 b). همچنین تشکیل کلونی، رشد سلول باکتری و تشکیل ماتریکس‌های فیلم زیستی فشرده میکروبی باعث ایجاد عفونت می‌شوند و نانوذرات از تشکیل این عامل‌های دفاعی میکروب‌ها در برابر سامانه ایمنی سلول میزبان جلوگیری می‌کنند (Basiri et al., 2009; Philip, 2011). مطالعات مختلفی در مورد اثرات ضد میکروبی نانوذرات فلزی خصوصاً نانوذرات نقره صورت گرفته است. تعدادی از پژوهشگران فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره را روی *E. coli* وابسته به غلظت نانوذرات اعلام کردند (Praveen et al., 2007). در مطالعه دیگری محققان در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که اثرات نانوذرات نقره بر روی *E. coli* بیشتر از *S. aureus* می‌باشد (Vijayaraghavana et al., 2011). در گزارشی دیگر با بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره روی باکتری‌های مختلف مانند *E. coli*، *P. aeruginosa*

قبولی دارد (Azizian-Shermeh et al., 2018 a). همچنین، گزارشات حاکی از آن است که گیاه مریم گلی تفتانی با دارا بودن ترکیبات موثره، قدرت آنتی اکسیدانی بالایی داشته و این خود توان این گیاه را در احیای یون‌های فلزی و تبدیل آن‌ها به اتم‌های فلزی در ابعاد نانومتریکی ثابت می‌کند (Azizian-Shermeh et al., 2018 a). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف مریم گلی (*Salvia*) با داشتن مقادیر بالای ترکیبات فنولی همواره به عنوان یکی از مهمترین منابع آنتی اکسیدانی طبیعی مورد توجه و مطالعه بوده اند (Farhat et al., 2013). بررسی‌ها حاکی از آن هستند که، با افزایش میزان غلظت عصاره، اثر مهارکنندگی و عدم رشد علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی بیشتر شده است که کاملاً با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت دارد (Mazaraie et al., 2018). اثر وسیع آنتی باکتریال و ضد قارچ مریم گلی بر طیف وسیعی از باکتری‌ها مانند سودوموناس و آسپیریلوس و کانیدیدا گزارش شده است (Amiri et al., 2012). در مطالعه سمیت سلولی و فعالیت ضد میکروبی گلهای *Salvia officinalis* L. نتایج نشان دادند که، عصاره متانول حاوی گلیکوزیدهای قلبی، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها و آلکالوئیدها بوده است. فعالیت‌های ضد باکتریایی این عصاره در برابر استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس استاروترموفیلوس، میکروکوکوس لوتئوس، اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس عصاره متانولی ۷۰٪ فعالیت ضد میکروبی قوی تری نسبت به آبی دارد (Elmageed & Hussein, 2008). در پژوهشی دیگر که بر روی فعالیت ضد میکروبی غلظت غیر سمیت سلولی عصاره مریم گلی (*Salvia officinalis*) در برابر گونه‌های باکتریایی و قارچی از حفره دهان انجام شد، نتایج نشان داد که عصاره

طبق یافته‌های برخی از پژوهشگران، نانوذرات نقره با اندازه ۲۰-۱ نانومتر در صورتی که به یکدیگر نچسبیده باشند، دارای بیشترین اثر ضد میکروبی است (Fernandez et al., 2010). تاکنون مطالعات متعددی جهت تعیین مکانیسم اثر نانوذرات بر روی میکروارگانیسم‌ها انجام گرفته است. مطالعات نشان می‌دهد که نانوذرات نقره بیشترین تأثیر را روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (قطر هاله ۲۴ میلی متر و MIC ۳/۱۲ μg/ml) و *قارچ آسپرژیلوس فلاووس* (قطر هاله ۲۱ میلی متر و MIC ۶/۲۵ μg/ml) داشته و کمترین تأثیر را روی باکتری *اشرشیا کلی* (قطر هاله ۱۸ میلی متر و MIC ۲۵ μg/ml) داشته است. به عبارت دیگر، *اشرشیا کلی* در مقایسه به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاومت بیشتری نسبت به حضور نانوذرات نقره نشان داده است. دلیل مقاومت بیشتر *اشرشیا کلی* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* تفاوت بین ساختار غشا باکتری‌های مورد نظر می‌باشد و تفاوت در ضخامت پپتیدوگلیکان آن‌ها است (Kim et al., 2007; Feng et al., 2000). پژوهش‌های بسیاری، مبتنی بر واکنش‌های احتمالی بین نانوذرات با ماکرومولکول‌های موجودات زنده نشان می‌دهد که اختلاف بین بار منفی میکروارگانیسم و بار مثبت نانوذرات فلزی، بصورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذرات عمل کرده و باعث اتصال نانوذرات به سطح سلول شده و در نتیجه می‌تواند باعث مرگ سلول شود (Chaloupka et al., 2010). در پی آزاد سازی تدریجی یون‌های نقره، این یون‌ها می‌توانند به گروه‌های دهنده الکترون مانند گوگرد، اکسیژن و نیتروژن در مولکول‌های زیستی موجود در میکروارگانیسم‌ها متصل شوند (Asadi et al., 2014). مطالعات مختلفی در مورد اثرات ضد میکروبی نانوذرات فلزی خصوصاً نانوذرات نقره صورت گرفته است. چو و همکاران در سال ۲۰۰۵ اعلام کردند که غلظت ۱۰ و ۵ ppm به ترتیب برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* کمترین

و *S. aureus* مشخص شد که هر چند فعالیت نانوذرات وابسته به غلظت است ولی برای باکتری‌های گرم منفی به نسبت گرم مثبت این اثر چشمگیرتر بوده است (Yongsong et al., 2009; Ankamwar, 2010; Rimal et al., 2013). در واقع تفاوت پاسخ باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به نانوذرات نقره، به تفاوت موجود در ساختار دیواره سلولی آنها مربوط می‌باشد، بطوریکه باکتری‌های گرم منفی دیواره سلولی نازکتر 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 که دارای بار مثبت ضعیف می‌باشند را با این سلول‌های باکتریایی تسهیل می‌کند. اتصال نانوذرات به سطح سلول ابتدا دیواره را سوراخ و سپس با ورود نانوذره به داخل سلول باکتری و ایجاد تداخل در مسیرهای مختلف متابولیکی و تولیدمثل در نهایت منجر به مرگ باکتری می‌شود (Azizian-Shermeh et al., 2019). همچنین غلظت‌های متفاوت عصاره نیز در میزان اثر مهارکنندگی موثر است که در مطالعات متعددی به آن اشاره شده است که با افزایش میزان غلظت عصاره، اثرات ضد میکروبی گیاه و هاله عدم رشد نیز افزایش می‌یابد که این مورد کاملاً هم سو با نتایج حاصل از مطالعه حاضر بوده است بگونه ای که اثر مهار کنندگی عصاره و نانوذرات نقره سنتز شده کاملاً وابسته به غلظت بوده است (Ebrahimi et al., 2012). با افزایش بیماری‌های غذایی، همراه با مشکلات اجتماعی و اقتصادی حاصل و پیشرفت مقاومت آن‌ها به آنتی بیوتیک‌های مختلف، محققین و داروسازان و صنایع وابسته به مواد غذایی را به سمت استفاده از نانوتکنولوژی سوق داده است. تحقیقات نشان داده است که اندازه نانوذرات در اثر ضد میکروبی آن‌ها بسیار تأثیرگذار است و هرچه این اندازه کوچکتر باشد، اثر ضد میکروبی بیشتری از خود نشان می‌دهد به علاوه نوع باکتری نیز در حساسیت به نانوذرات موثر است (Clara et al., 2011). بگونه‌ای که

غلظت بازدارندگی است اما غلظت ۵۰ ppm برای استافیلوکوکوس اورئوس و ۱۰۰ ppm برای اشرشیا کلی، کشته است (Cho et al., 2005). در مطالعه انجام شده بر روی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره بر روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا، یافته ها نشان داد که این فعالیت وابسته به غلظت نانوذرات بوده است (Zarei et al., 2018). در مطالعه دیگر، نشان داده شد که اثرات نانوذرات نقره بر روی اشرشیا کلی بیشتر از استافیلوکوکوس اورئوس می باشد (Monteiro et al., 2009). در مطالعاتی دیگر با بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره روی باکتری های مختلف مانند *E.coli*، *P.aeruginosa* و *S.aureus* مشاهده شد که هرچند فعالیت نانوذرات وابسته به غلظت است ولی برای باکتری های گرم منفی به نسبت گرم مثبت این اثر چشمگیرتر بوده است (Dwivedi and Gopal, 2010). قابل ذکر است که غلظت نانوذره، اندازه و شکل نانوذره، سوش میکروبی و روش تولید نانوذره بر اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره موثر است (Azizian-Shermeh et al., 2018 b). البته گزارشاتی نیز مبنی بر استفاده از سایر نانوذرات جهت ارتقا کیفیت و سلامتی مواد غذایی و از بین بردن پاتوژن های بیماری زا با منشا غذایی گزارش شده است (Azizian-Shermeh et al., 2019). علاوه بر مواد غذایی، استفاده از نانوذرات نقره جهت کاهش بار میکروبی آب آشامیدنی نیز بررسی شده است (Heidarpour et al., 2010).

نتیجه گیری نهایی

نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات دیگر نشان می دهد که خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره برای گونه های متفاوت باکتریایی و قارچ های مورد مطالعه متفاوت و منحصر به فرد است. همچنین، نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه مریم گلی تفتانی، به

مراتب اثر مهارکنندگی و میکروب کشی بیشتری نسبت به عصاره آبی آن دارد. مقاومت نسبی برخی از گونه ها می تواند به خاطر ساختار غشای مقاوم در برابر خاصیت ضد میکروبی نقره باشد. به همین خاطر باید غلظت نانوذرات نقره به کار برده شده در پوشش های نانویی (تا حداکثر مجاز اعلام شده توسط اتحادیه اروپا) با توجه به میزان مقاومت گونه های بیماری زا در برابر نقره تعیین گردد تا بار میکروبی مواد غذایی پس از گذشت بازه زمانی مورد نظر از حد مجاز تجاوز نکند. نانوذرات دارای نسبت سطح به حجم بسیار زیادی هستند و در مورد نقره به طور خاص، این افزایش سطح باعث شده که یک گرم نانوذرات نقره برای کشتن باکتری های صد مترمربع از یک سطح کافی باشد. ویژگی نانوذرات نقره از لحاظ شکل و اندازه باعث شده که این نانوذرات بتوانند با تخریب غشاء فعالیت ضد میکروبی بالایی از خود نشان دهند و مجموعه این خصوصیات باعث کاربرد فراوان نانوذرات نقره در پزشکی و بهداشت مانند ضد عفونی کردن آب های آشامیدنی، استفاده در فیلترهای کربنی و از بین بردن میکروب های هوا شده است. همچنین این نانوذرات امروزه به عنوان پوشش های ضد میکروب در تجهیزات پزشکی و نیز تولید ژل های ضد میکروب در درمان سوختگی ها و در صنایع مختلف همچون صنعت مهم غذایی در فیلترهای ضد عفونی کننده مواد غذایی، پوشش ها و بسته بندی مواد غذایی و پاکسازی خطوط تولید مواد غذایی استفاده می شوند.

تشکر و قدردانی

پژوهشگران بر خود لازم می دانند، مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به حمایت های دانشگاه سیستان و بلوچستان در جهت اجرا و اتمام این پژوهش اعلام نمایند.

References

1. Amiri, H. 2007. Quantitative and qualitative changes of essential oil of *Salvia bracteata* Bank et Sol. in different growth stages. DARU-Journal of Faculty of Pharmacy, 15: 79-82.
2. Amiri, H. 2012. Investigation of chemical compounds and antioxidant activity of essential oil and methanolic extracts of *Salvia multicaulis*, Journal of Medicinal Plant, 8: 111-117. (In Persian)
3. Asadi, M., Khosravi-Darani, K., Mortazavi, A., Hajseyed Javadi, N., Azadnia, E. and Kiani Harchegani, A. 2014. Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by chemical reduction on *Staphylococcus aureus* and *Escheirchia coli*. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 8 (4):83-92 (In Persian)
4. Ashiri, S., Safari, J. 2013. Synthesis of gold and silver nanoparticles in plant substrates and their application. Nanotechnology, 1(186): 12-15. (In Persian)
5. Ankamwar., B. 2010. Biosynthesis of Gold Nanoparticles (Green-Gold) Using Leaf Extract of *Terminalia catappa*. E- Journal of Chemistry, 7(4):1334-1339.
6. Aubourg, S.P., Piñeiro, C., Gallardo, J. M. and Barros-Velazquez, J. 2005. Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (*Psetta maxima*). Food Chemistry, 90(3): 445-52.
7. Azizian Shermeh, O., Valizadeh, J., Noroozifar, M. and Qasemi, A. 2016 a. Investigation the antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesis by aqueous extract of *Sambucus ebulus* L. Journal of Ilam University of Medical Sciences, 25(4): 92-108. (In Persian)
8. Azizian shermeh, O., Valizadeh, J., Noroozifar, M., Ghasemi, A. and Valizadeh, M. 2016 b. Optimization, characterization and anti-microbial activity of gold nanoparticles biosynthesized using aqueous extract of *Sambucus ebulus* L. Eco-phytochemical Journal of Medicinal plants, 1:1-18. (In Persian)
9. Azizian Shermeh, O., Einali, A. and Ghasemi, A. 2017 a. Rapid biologically one-step synthesis of stable bioactive silver nanoparticles using Osage orange (*Maclura pomifera*) leaf extract and their antimicrobial activities. Advanced Powder Techmology, 28: 3164-3171
10. Azizian Shermeh, O., Valizadeh, M., Valizadeh, J., Taherizadeh, M. and Beigomi, M. 2017 b. Phytochemical investigation and phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Capparis spinosa* L. Journal of Modares Biological Sciences (JMBS), 8 (1): 80-90 (In Persian)
11. Azizian Shermeh, O., Taherizadeh, M., Valizadeh, M., Valizadeh, J., Qasemi, A. and Naroei, B. 2017 c. Optimization, characterization, and investigation of antibacterial activity of gold Nanoparticles biosynthesized by aqueous extract of *Seidlitzia rosmarinus*. Qom Univercity of Medical Sciences Journal, 11 (5): 38-52 (In Persian)
12. Azizian Shermeh, O., Taherizadeh, M., Valizadeh, M. and Qasemi, A. 2018 a. Robial and antioxidant activities and Determining Phenolic and flavonoid contents of the extracts of five species from different families of the medicinal plants grown in Sistan and Baluchestan Province. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 7(4): 465-479
13. Azizian Shermeh, O., Valizadeh, M., Taherizadeh, M. and Beigomi, M. 2018 b. Phytochemical investigation and phytosynthesis of eco-friendly stable bioactive gold and silver nanoparticles using petal extract of saffron (*Crocus sativus* L.) and study of their antimicrobial activities. Applied Nanoscience. <https://doi.org/10.1007/s13204-019-01059-5>
14. Azizian Shermeh, O., Taherizadeh, M., Valizadeh, M., Ghasemi, A., Beigomi, M. and Kamali Deljoo, A. 2019. The study of antimicrobial effect of silver nanoparticles biosynthesized by the leaf aqueous extract of *kelussia odoratissima* mozaff. against some pathogenic microbes with food sources. Journal of Food Technology and Nutrition, 16 (1): 31-48 (In Persian)
15. Basiri, Sh. 2011. Investigation of the effect of temperature and air velocity in

- the dryer on the amount and quality of essential oil of *Thymus*. Innovation in Food Science and Technology (Journal of Food Science and Technology), 3(4): 75-85. (In Persian)
16. Cao, Y.W.C., Jin, R.C. and Mirkin, C.A. 2002. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, 297: 1536-1540.
 17. Chaloupka, K., Malam, Y. and Seifalian, A.M. 2010. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 28: 580-588.
 18. Chaloupka, K., Malam, Y. and Seifalian, A.M. 2010. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, 28 (11): 580-588.
 19. Clara, S., Donatella, D. and Sossio, C. 2011. Food packaging based on polymer nanomaterials. *Progress in Polymer Science*, 36(12): 1766-82. 9.
 20. Cho, K.H., Park, J.E., Osaka, T. and Park, S. 2005. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochim Acta*, 51: 956-960.
 21. Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M. and Hofmann, T. 2008. Nanoparticles: Structure, Properties, Preparation and Behaviour in Environmental Media. *Ecotoxicology*, 17(5): 326-343.
 22. Chung, N., Chu, P. 2010. Effect of nanopacking on preservation quality of fresh strawberry (*Fragaria ananassa* L.) during storage. *Food Chemistry*, 110: 16248-1625.
 23. Ding, C.K., Chachin, K., Ueda, Y. and Imahori, Y. 1998. Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46(10): 4144 - 49.
 24. Dwivedi, A.D. and Gopal, K. 2010. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids and Surfaces A*, 369(3): 27-33.
 25. Ebrahimi, A., Khayami, M. and Nejati, V. 2012. Comparison of antimicrobial effect of different parts of *Quercus persica* against *Escherichia coli* O157:H7. *The Horizon of Medical Sciences*. 17 (4): 11-17 (In Persian)
 26. Ebrahimi Asl, S. and Zarei, A. 2015. Synthesis and characterization of ag/chitosan nanobiocomposite by chemical method and investigation of its application for food packaging. *Journal of Food Microbiology*, 2(2): 21-31 (In Persian)
 27. Elmageed, M.A. and Hussein, B. 2008. Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Salvia officinalis* L. flowers, *Sudan Journal of Medical Sciences*, 3(2): 127-132
 28. Etemadi, M., Mohebbi-Kalhari, D., Azizian Shermeh, O. and Qasemi, A. 2017. Phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Camellia sinensis* L. and study of their antibacterial activities, *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 7(1): 39-52
 29. Farhat, M.B., Landoulsi, A., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J.A. and Jordn, M.J. 2013. Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Industrial Crops and Products*, 49: 904-14.
 30. Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y. and Chi, Y. 2009. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry*, 115(1): 66-70.
 31. Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.O., Cui, F. Z., Kim, T.N. and Kim, J.O. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4): 662-8.
 32. Fernández, A., Soriano, E., López-Carballo, G., Picouet, P., Lloret, E., Gavara, R. and Hernandez-Munoz, P. 2009. Preservation of aseptic conditions in absorbent pads by using silver nanotechnology. *Food Research International*, 42(8): 1105-12.
 33. Fernández, A., Picouet, P. and Loret, E. 2010. Cellulose-silver nanoparticle hybrid materials to control spoilage-

- related microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2): 222-8.
34. Furno, F., Morley, K.S., Wong, B., Sharp B.L., Arnold, P.L., Howdle, S.M., Bayston, R., Brown, P.D., Winship, P.D. and Reid, H.J. 2004. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(6): 1019-24.
35. Govindaraju, K., Tamilselvan, S., Kiruthiga, V. and Singaravelu, G. 2010. Biogenic silver nanoparticles by *Solanum torvum* and their promising antimicrobial activity. *Journal of Biopesticides*, 3(1): 394-399.
36. Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K. J., Gamez, G., Dokken, K., Tehuacanero, S. and Jose-Yacaman, M. 1999. Gold nanoparticles obtained by bio-precipitation from gold (iii) solutions. *Journal of Nanoparticle Research*, 1(3): 397-404.
37. Heidarpour, F., Wan, A.b., Karim Ghani, W. A., Fakhru'Razi, A., Sobri, S., Heydarpour, V., Zargar, M. and Mozafari, M. R. 2010. Complete removal of pathogenic bacteria from drinking water using nano silver-coated cylindrical polypropylene filters. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 13(3): 499-507.
38. Jassbi, A., Zare, S., Firuzi, O. and Xiao, J. 2015. Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. *Phytochemistry Reviews*. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007 /s11101-015-9427-z>.
39. Jassbi, A.R., Eghtesadi, F., Hazeri, N., Ma'somi, H., Valizadeh, J., Chandran J. N., Schneider, B. and Baldwin, I.T. 2017. The roots of *Salvia rhytidea*: a rich source of biologically active diterpenoids. *Natural Product Research*, 31(4): 477-481.
40. Kaushik Thakkar, N., Snehit Mhatre, S. and Rasesh Parikh, Y. 2010. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *nanomedicine*, 6: 257-262.
41. Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., Muthumary, J. and Srinivasan, K. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Citrus sinensis* peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 79: 594-98.
42. Kim, J. S, Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J-H., Park, S. J., Le, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y. H., Hwanq, C.Y., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeonq, D.H. and Cho, M.H. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 3(1): 95-101.
43. Mazaraie, A., Mousavi-Nik, S.M. and Fahmideh, L. 2018. Assessments of phenolic, flavonoid and antioxidant activity of aqueous, alcoholic, methanol and acetone extracts of thirteen medicinal plants. *Nova Biologica Reperta*, 4 (4): 299-309. (In Persian)
44. Mock, J.J., Barbic, M., Smith, D.R., Schultz, D.A. and Schultz, S. 2002. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics*, 116(15): 6755-59.
45. Mohasseli, T. and Pourseyyedi, Sh. 2015. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using seed aqueous extract of Sesame. *Biotechnology Tarbiat Modares University*, 1(6): 10-20. (In Persian)
46. Monteiro, D.R., Gorup, L.F., Takamiya, A.S., Ruvollo-Fiho, A.C., Carmago, E.R. and Barbosa, D.B. 2009. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(2): 103-10.
47. Oliveria, J.R.D., Figueiredo Vilela, P.D.G., Aguiar Almeida, R.B.D., Oliveira, F.E.D., Talgo Carvalho, C.A., Afonso Camargo, S.E., Cardoso Jorge, A.O. and Oliveira, L.D.D. 2019. Antimicrobial activity of noncytotoxic concentrations of *Salvia officinalis* extract against bacterial and fungal species from the oral cavity. *General dentistry*, 434: 22-26.
48. Omidbaigi, R. 2005. Approaches to the production and processing of medicinal plants, Behnashr Publications, Mashhad, 1: 347-8.

49. Özogul, F., Polat, A. and Özogul, Y. 2004. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). Food Chemistry, 85(1): 49-57.
50. Özyurt, G., Kuley, E., Özkütük, S. and Özogul, F. 2009. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. Food Chemistry, 114(2): 505-510.
51. Philip, D. 2009. Biosynthesis of Au, Ag and Au-Ag nanoparticles using edible mushroom extract. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2009; 73: 374-381.
52. Philip, D. 2010. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosasinensis*. Physica E, 42(5); 1417-24.
53. Praveen Kumar, K., Paul, W., Chandra, P. and Sharma, P. 2007. Green synthesis of gold nanoparticles with *Zingiber officinale* extract: Characterization and blood compatibility. Process Biochemistry, 46: 2007-2013.
54. Rimal Isaac, SR., Sakthivel, G. and Murthy, Ch. 2013. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *averrhoa bilimbi* fruit extract. Journal of Nanotechnology, 128(5): 89-101.
55. Salimpour, F., Mazooji, A. and Akhoondi Darzikolaei, S. 2011. Chemotaxonomy of six *Salvia* species using essential oil composition markers. Journal of Medicinal Plants Research, 5(9): 1795-1805.
56. Salmanpour Ahmadi, H. A., Manouchehri, H. and Safari, R. 2016. Evaluation chitosan nanoparticles and nano-encapsulated thyme effect on microbial spoilage of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet inoculated with *Listeria monocytogenes*. Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Resources), 68 (4): 577-587 (In Persian)
57. Shafizadeh, F. 2002. Medicinal plants of lorestan province, Hayian Publisher, Tehran.
58. Shankar, SS., Rai, A., Ahmad, A. and Sastry, M. 2002. 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.
59. Shekarforoush, S.S., Razavi Rohani, S.M., karim, G., Kiaie S.M.M., Rokni, N. and Abbasvali, M. 2013. Study on the overview on food borne bacteria in food with animal origin in Iran; Part three; Seafood. Journal of Food Hygiene, 2(4): 15-32 (In Persian)
60. Shenya, D.S., Mathewa, J. and Philip, D. 2011. Phytosynthesis of Au, Ag and Au-Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of *Anacardium occidentale*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 79: 254-262.
61. Singh, P., Garg, A., Pandit, S., Mokkaapati, V.R.S.S and Mijakovic, D. 2018. Antimicrobial effects of biogenic Nanoparticles. nanomaterials, 8, 1009; DOI: 10.3390/nano8121009.
62. Stobie, N., Duffy, B., McCormack, D. E., Colreavy, J., Hidalgo, M., McHale, P. and Hinder, S.J. 2008. Prevention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using a low - temperature processed silver - doped phenyltriethoxysilane sol - gel coating. Biomaterials, 29(8): 963-9.
63. Salari, S., Bakhshi, T., Sharififar, F., Naseri, A. and Ghasemi Nejad Almani, P. 2016. Evaluation of antifungal activity of standardized extract of *Salvia rhytidea* Benth. (Lamiaceae) against various *Candida* isolates. . Journal de Mycologie Médicale, 26(4): 323-330. Doi: 10.1016/j.mycmed.
64. Vallet-Regí, M., González, B. and Izquierdo-Barba, I. 2019. Nanomaterials as Promising alternative in the infection treatment. Internatioanl Journal of Molecular Sciences. 20, 3806; doi: 10.3390/ijms20153806
65. Vijayaraghavana, K., Mahadevana, A., Sathishkumara, M., Pavagadhia, S. and Balasubramaniana, R. 2011. Biosynthesis of Au (0) from Au (III) via biosorption and bioreduction using brown marine alga *Turbinaria conoides*. Chemical Engineering Journal, 167: 223-227.

66. Walker, J.B., Sytsma, K.J. 2007. Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the lever. *Annals of Botany*, 100(2):375-391.
67. Wang, L., Hu, Ch. and Shao, L. 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future, *International Journal of Nanomedicine*, 12: 1227-1249.
68. Wang, Y., He, X., Wang, K., Zhang, X. and Tan, W. 2009. Barbated skull cup herb extract-mediated biosynthesis of gold nanoparticles and its primary application in electrochemistry. *Colloids and surfaces B, Bio interfaces*, 73: 75-79.
69. Yong Song, J., Hyeon-Kyeong, J. and Beom Soo, K. 2009. Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts. *Process Biochemistry*, 44: 1133-1138.
70. Zahabi, Z.F., Sharififar, F., Almani, P.G.N. and Salari, S. 2020. Antifungal activity of different fractions of *Salvia rhytidea* Benth. as a valuable medicinal plant against various species of *Candida* in Kerman Province, southeast Iran, *Gene Reports*, <https://doi.org/10.1016/j.genrep.100624>.
71. ZandiNavgaran, Kh., Naseri, L. and Esmaili, M. 2014. Effect of packaging material containing nano-silver and silicate clay particles on postharvest quality attributes of sweet cherry cv. Syaah Mashhad, *Journal of Food Research*, 24(1): 89-102 (In Persian)
72. Zarei, M., Jamnejad, A. and Khajehali, E. 2014. Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(1): 1-11.
73. Zarei, Z., Razmjoue, D. and Karimi, J. 2018. Investigating the bioavailability and antibacterial effect of silver nanoparticles produced by (*Ferulago angulate* Boiss.) extract. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences*, 16 (1): 24-3462. (In Persian)
74. Zarei, G. and Morovvati Sharifabad, A. 2017. Essential oil composition of *Salvia eremophila* Boiss. In different stages of plant growth in Yazd province. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 4(4): 74-84 (In Persian)

Phytosynthesis of stable silver nanoparticles using aqueous extract of *Salvia rhytidea* Benth. and comparison of its antimicrobial Activities with natural plant extract

Azizian-Shermeh, O.¹, Mollashahi, E.^{2*}, Taherizadeh, M.³

¹Ph.D. candidate, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

²Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

³Ph.D. candidate, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Kerman Branch, Kerman, Iran

Received: 26-1-2020 ; Accepted: 2-8-2020

Abstract

The present study is the first report on the phytosynthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of *Salvia rhytidea* Benth and comparison of its antimicrobial Activities with natural plant extract. Plant samples were collected at the flowering stage in June 2017 from the heights of Taftan Mountain (length 60 degrees and 44 minutes east longitude and width 28 degrees and 33 minutes north and at an altitude of 1394 m above sea level). After preparation of extract by maceration method, the silver nanoparticles were biosynthesized. Then, parameters such as reaction pH, concentration of AgNO₃ and reaction time were studied and optimized. After characterization of nanoparticles by transmission electron microscopy (TEM) and X-ray diffraction (XRD) techniques, their antimicrobial activity against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus Flavus* and *Penicillium expansum* were investigated and compared with aquatic extract by Disk diffusion method and MIC test. The results showed that silver nanoparticles had maximum absorption at 400- 415 nm, an average size of 20-25 nm and a spherical and uniform shape. Antimicrobial activity of showed that the antimicrobial effects were concentration-dependent and in equal concentrations, the nanoparticles had a higher inhibitory effect than aquetic extract, in which at 50µg/mL the highest inhibitory effect was observed against *Staphylococcus aureus* (19 mm) and *Aspergillus flavus* (19 mm). Based on the results, plants have a high potential for biosynthesis of nanoparticles that can be used as antiseptic in various industries.

Keywords: Antimicrobial activity, Phytosynthesis, *Salvia rhytidea* Benth., Silver nanoparticles

*Corresponding author; mollashahi39@chem.usb.ac.ir