دو فصلنامه
بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی
سال چهارم، شماره ۳ و ۴، پاییز و زمستان ۱۳۹۴

سنتز نانوذرات نقره (Silver nanoparticles) به روش سبز و ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی آن

رابعه موقرنیا [۱]، فهیمه باغبانی آرانی*[۲]، سید عطا اله سادات شاندیز [۳]

[۱] کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران
[۲] استادیار، گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران
[۳] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: امروزه برای کشف راه حل‌های جدید در درمان باکتری های مقاوم به دارو و همچنین جایگزینی برای آنتی بیوتیک‌ها، محققان زیادی در حال مطالعه هستند. این مطالعه به منظور بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز انجام شد.

مواد و روش ها: در این پژوهش به منظور بررسی فعالیت های ضد باکتری نانونقره سنتز شده به روش سبز از روش رقت سازی سریالی آزمون میکرودایلوشن براث برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) استفاده شد. باکتری های مورد مطالعه *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC27853، *باسیلوس سوبتلیس* ATCC6633، *استرپتوکوکوس پیوژنز* ATCC8668 و *اشریشیا کلی* ATCC25922 بودند.

یافته‌ها: تغییر رنگ واکنش سنتز، تکنیک هایی همچون آنالیز فرابنفش (UV -Vis)، میکروسکوپی الکترونی نگاره (SEM) و میکروسکوپی الکترونی گذاره (TEM) مشخصه نانو ذرات نقره سنتز شده را تایید نمود. *باسیلوس سوبتلیس* و *استرپتوکوکوس پایوژنز* در غلظت های ۳/۱۲ و ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب مهار شدند. همچنین غلظت کشندگی برای این باکتری ها ۶۴ و ۳/۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذره نقره برای *اشریشیاکلی* و *سودوموناس* ۱۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر بود و حداقل غلظت کشندگی نانوذره برای این باکتری ها به ترتیب ۵۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که نانوذرات سنتز شده به روش سبز دارای فعالیت ضد باکتریایی می باشد و می تواند برای درمان عفونت های ناشی از این میکروارگانیسم ها مورد مطالعه ی بیشتری قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضد باکتریایی، نانوذرات نقره، سنتز سبز، حداقل غلظت مهار کنندگی

مقدمه

محققان زیادی امروزه به دنبال یافتن راه حل‌های جدید برای درمان باکتری‌های مقاوم به دارو و همچنین جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها جهت پیشگیری از عفونت‌های میکروبی هستند. یکی از این راه حل هایی که اخیراً در جامعه علمی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از نانوذرات فلزی

* مسئول مکاتبات: fbaghbani@iauvaramin.ac.ir

می‌باشد (۱). تاکنون از طلا، نقره و مس در ساخت نانو ذرات با فعالیت ضد میکروبی استفاده شده است (۲-۵).

نانوذرات نقره (AgNPs) با اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر به عنوان محصولی مهم در نانوتکنولوژی و همچنین به عنوان کاندیدای موثری برای رساندن بسیاری از مولکول های دارویی یا بیومولکول های بزرگ می‌باشند (۶, ۷). نانوذرات نقره با دارا بودن ویژگیهای مشخص بیولوژیک کاربردهای متنوعی در درمان های ضدباکتریایی (۸)، ضدقارچی (۹)، ضدویروسی (۱۰) و ضدالتهابی (۱۱) دارند. همچنین ویژگیهای عمده‌ی دیگر نانو ذرات نقره شامل پایداری زیاد، آبدوست بودن، مقاومت حرارتی، عدم ایجاد و افزایش مقاومت در میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (۱۲).

نقره قادر به از بین بردن ۶۵۰ نوع بیماری ناشی از میکروارگانیسم هاست و در حالی که که هنوز مکانیسم عمل ضدباکتریایی آن به طور کامل مشخص نشده است. یافتن این خاصیت نانو ذرات نقره منجر به اهمیت موثر آن در زیست‌شناسی و نانوبیوتکنولوژی شده است (۱۳).

روش های بیولوژیکی سنتز نانوذرات با استفاده از میکروارگانیسم ها، آنزیم ها، پروتئین ها، گیاهان و یا عصاره های گیاهی بدون شک به عنوان روش های دوستدار محیط زیست از گزینه های مناسب برای سنتز نسبت به روش های فیزیکی و شیمیایی پیشنهاد شده اند (۱۴). همچنین روش‌های سنتز شیمیایی و فیزیکی نانوذرات بسیار گران می باشد (۱۵). در حالی که، سنتز بیولوژیکی نانوذرات فلزی به خصوص طلا و نقره با استفاده از گیاهان روشی بسیار مناسب و از لحاظ اقتصادی بسیار مقرون به صرفه است، بنابراین این رویکرد به عنوان یک روش اقتصادی و ارزشمند می تواند در جهت تولید ناذرات فلزی در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار گیرد. اخیراً سنتز سبز نانوذرات نقره توسط برگ سیکاس (*Cycas revoluta*)(۱۵)، برگ زیتون(۱۶)، عصاره ی برگ های چریش (*Acalypha indica*)(۱۷)، عصاره-ی برگ اکالیپتوس(۱۸)، عصاره انگور فرنگی هندی (*Embelia ribes*) (۱۹)، ماگنولیا (*Magnolia kobus*) (۲۰) و عصاره ی برگ‌های چای سیاه (۲۱) مورد بررسی قرار گرفته است. احیای یون های Ag^{+} به وسیله ی ترکیبات بیومولکولی از نظر زیست محیطی بی خطر اعلام شده است (۲۲). گیاه درمنه (*Artemisia*) از خانواده آستراسه آ[1] می‌باشد که فعالیت ضد میکروبی عصاره های مختلف آن در چندین گزارش اخیراً ذکر شده است (۲۴, ۲۵). درمنه غنی از موادی است که دارای اثرات گوناگونی از جمله اثر ضد التهاب، ضد تومور، ضد زخم معده، آنتی اکسیدان، ضد مالاریا، کاهش دهنده سوء هاضمه، ضد پرولیفراسیون سلولی و انقباض کیسه صفرا می باشد. ترکیباتی مختلفی از جمله ,فلاونوئیدها، کومارین‌ها، فنول، پورین، استروئیدها، تری ترپنوئیدها، الیفاتیک‌ها، سسکوئی‌ترپن نوئیدها و آرتمیسینین تاکنون از گیاه درمنه استخراج شده است (۲۶). از آنجایی که این جنس بیشتر حاوی ترکیبات ترپنوئیدی و فلاونوئیدی می باشد به نظر می رسد که توانایی احیای نمک نقره را دارا می باشد بنابراین بکارگیری عصاره ی گیاه درمنه جهت سنتز نانوذرات فلزی از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۷, ۲۸).

[1] *Asteraceae*

هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز از عصاره گیاه درمنه (ارتمیزیا تورنفورتیانا) علیه برخی از سویه های بیماری زای مهم می باشد.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه و تهیه عصاره: این مطالعه ی تجربی در دانشگاه آزاد اسلامی ورامین در سال ۱۳۹۵ انجام شد. جهت آماده سازی عصاره گیاهی ارتمیزیا تورنفورتیانا، مقدار ۲۰ گرم از پودر خشک شده اندام های هوایی آن را در ۵۰۰ سی سی آب مقطر ریخته شد و سپس به مدت ۲ ساعت جوشانده شد. محلول بدست آمده پس از سانتریفیوژ، از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد. و درنهایت عصاره بدست آمده برای استفاده بعدی در یخچال قرار داده شد (۲۹).

سنتز و مشخصه‌یابی نانوذرات نقره: به منظور سنتز سبز نانو ذرات نقره از روش رسوبگذاری با احیای یونهای نقره توسط عصاره گیاه استفاده شد. برای سنتز نانو ذرات نقره، ۲ میلی لیتر از حجم عصاره گیاهی به نیترات نقره با غلظت ۰/۰۱ میلی مولار تحت شرایط همزدن و دمای اتاق اضافه شد. پس از گذشت پنج دقیقه از زمان واکنش و کاهش یون های Ag^{+} به Ag^{0}، رسوب بدست آمده سه بار با آب مقطر طی سانتریفیوژ (Eppendorf 5804R, Germany) با دور ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه شسته شدند. احیای کامل یون های Ag^{+} به نانوذرات نقره با تغییر رنگ محیط و طیف سنجی مورد بررسی قرارگرفته شد. تغییر رنگ واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین پودر خشک شده جهت آنالیز فرابنفش (UV -VIS)، میکروسکوپی الکترونی نگاره (SEM) و میکروسکوپی الکترونی گذاره (TEM) استفاده شد. جهت استریل نمودن نانوذره در هنگام استفاده از فیلترهای سرسرنگی ۰/۲ میکرونی استفاده شد.

سویه‌های مورد مطالعه: باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC27853، *باسیلوس سوبتلیس* ATCC 6633، *استرپتوکوکوس پیوژنز* ATCC8668، *اشریشیا کلی* ATCC25922 از مجموعه میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. آزمون‌هایی نظیر بررسی مورفولوژی میکروارگانیسم ها و رنگ آمیزی، آزمون‌های بیوشیمیایی و غیره به منظور تایید میکروارگانیسم استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی: جهت به دست آوردن سوسپانسیون های یکنواخت و همگن از معیار کدورت سنجی استاندارد نیم مک فارلند استفاده شد. سوسپانسیون تهیه شده با کدورت معادل نیم مک فارلند حدود $1/5\times10^{8}$ CFU/ml بوسیله محیط کشت مولرهینتون براث به میزان ۱/۱۰۰ جهت بدست آوردن تعداد $0/5\times10^{6}$ CFU/ml رقیق شد.

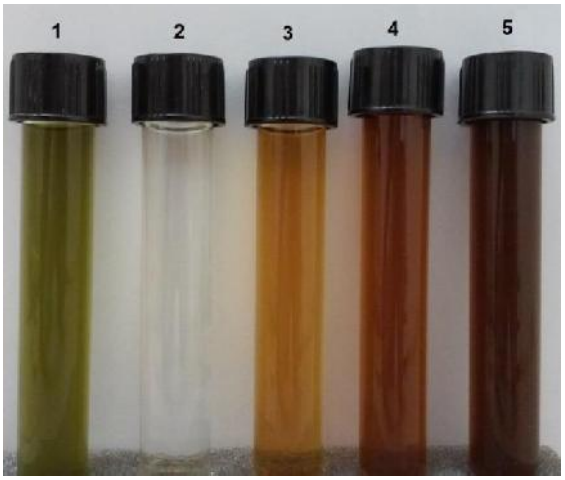
آزمون میکرودایلوشن براث برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC): برای تعیین MIC و MBC از روش رقت گیری سریالی در محیط کشت استفاده شد. در این روش از پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. برای کنترل مثبت باکتریهای گرم منفی از آنتی بیوتیک جنتامایسین و برای کنترل مثبت باکتری‌های گرم مثبت از ونکومایسین استفاده شد. هر آزمون با سه تکرار انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های ۱۲گانه ی ۵۰، ۲۵ ،

۱۲/۵ ، ۶/۲۵ ، ۳/۱۲۵ ، ۱/۵۶ ، ۰/۷۸ ، ۰/۳۹ ، ۰/۱۹۰، ۰/۹۰ و ۰/۰۴۸ میکرولیتر بر میلی لیتر از نانوذره به چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک شب گرمخانه گذاری شدند. یک چاهک بعنوان بلانک (محیط کشت خالی و سلول باکتری بدون نانوذره) استفاده شد. همچنین به منظور کنترل حلال مورد استفاده در رقیق سازی، یک چاهک حاوی محیط‌کشت بدون باکتری بعنوان کنترل منفی قرار داده شد. نهایتا، کدورت تمام چاهک‌ها با استفاده از دستگاه قرائت گر الایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانش شد. همچنین چاهکی که کدورت آن به دلیل عدم رشد باکتری شفاف تر بود، به عنوان MIC نانوذره گزارش شد. برای تعیین MBC، ۱۰ میکرولیتر از رقت MIC و چند رقت غلیظ تر از آن در محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده شد. پس از۲۴ ساعت گرمخانه گذاری پلیت‌ها از نظر رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند و اولین رقتی که هیچ رشدی روی آن دیده نشد به عنوان MBC گزارش شد (۳۰).

یافته‌ها

نتایج سنتز سبز نانوذرات نقره

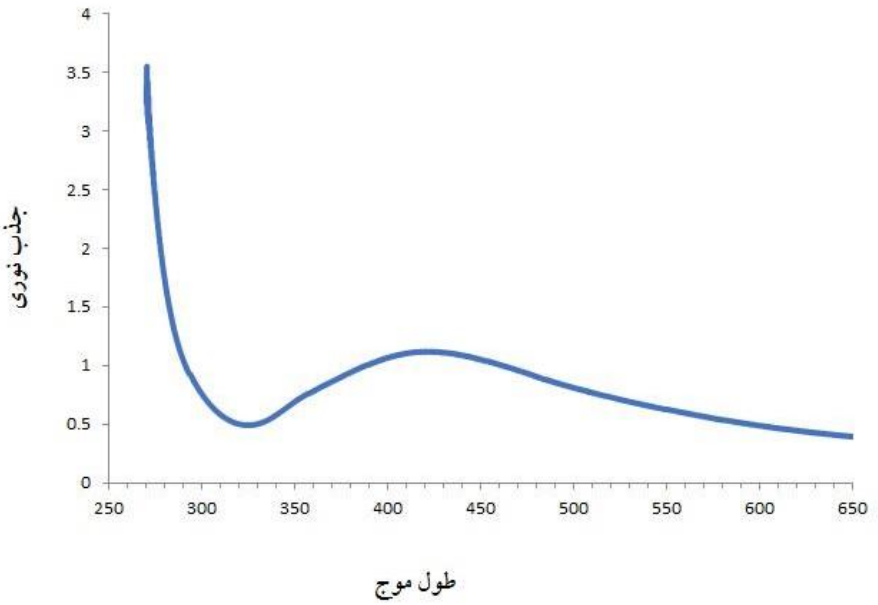
سنتز سبز نانوذرات نقره با تغییر رنگ واکنش طی مدت ۱۰ دقیقه از زمان واکنش انجام گرفت. عصاره گیاهی به کمک ماده موثره آن که شامل ترکیباتی همچون کتون، آلدهید، ترپن و فلاونوئید ها باعث احیای نمک نیترات نقره به نانوذرات نقره می شود. در طی فرایند سنتز، یون‌های Ag^{+} در معرض ترکیبات احیا کننده عصاره قرار گرفته و از این طریق احیا نمک نیترات نقره شروع می شود. رنگ مخلوط واکنش با اضافه کردن عصاره ی گیاهی (شکل ۱ شماره ۱) به محلول ۰/۰۱ میلی مولار نیترات نقره از بی رنگ (شکل۱ شماره ۲) به رنگ قهوه ای مایل به قرمز (شکل ۱ شماره های ۳و ۴) طی زمان های ۲/۵ و ۵ دقیقه و به تدریج در طی ۱۰ دقیقه (نمودار ۱ شماره ۵) از زمان واکنش به قهوه ای تیره تغییر نمود. تغییر رنگ محلول مشخص کننده ی احیای نیترات نقره و تشکیل نانوذرات نقره در واکنش می باشد.



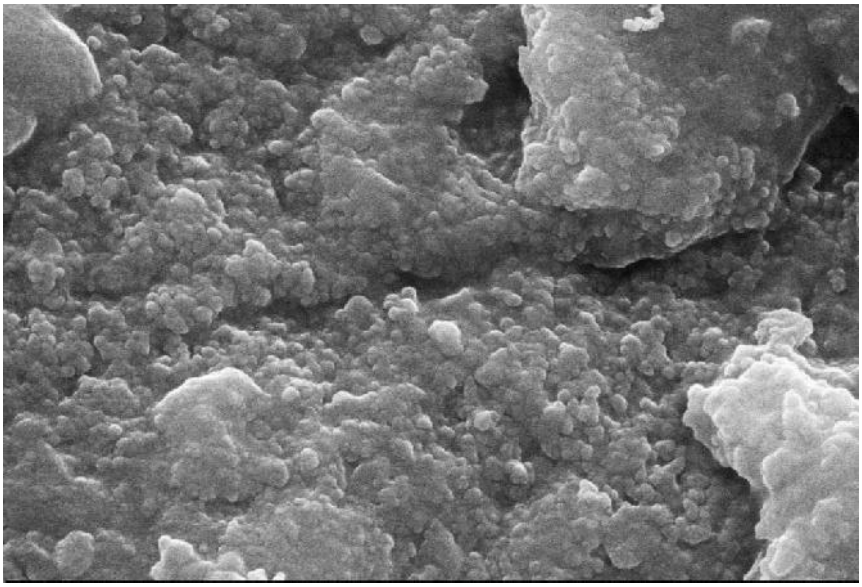
شکل ۱. تغییر رنگ محلول واکنش سنتز نانوذرات نقره. (۱) عصاره گیاه. (۲)محلول نیترات نقره (۳،۴ و۵) مخلوط واکنش عصاره گیاهی و نیترات نقره طی زمان های ۲/۵(۳) ، ۵ دقیقه (۴) و ۱۰ دقیقه (۵)

وجود پیک در طول موج ۴۳۰ نانومتر برای نانوذرات نقره با دستگاه طیف سنجی UV-VIS پس از انجام واکنش تایید شد (نمودار ۱).

ساختار سه بعدی نانوذرات نقره سنتز شده از طریق عکس میکروسکوپ الکترونی نگاره حاکی از وجود نانوذرات با اشکال غالبا کروی بود. البته این نانوذرات در برخی نقاط به صورت آگلومره و تجمع دیده می شود که می توان با سونیکاسیون پخش نمود و سپس با دستگاه میکروسکوپ ارزیابی نمود (شکل ۲).



نمودار ۱. نمودار آنالیز طیف سنجی مرئی فرابنفش.



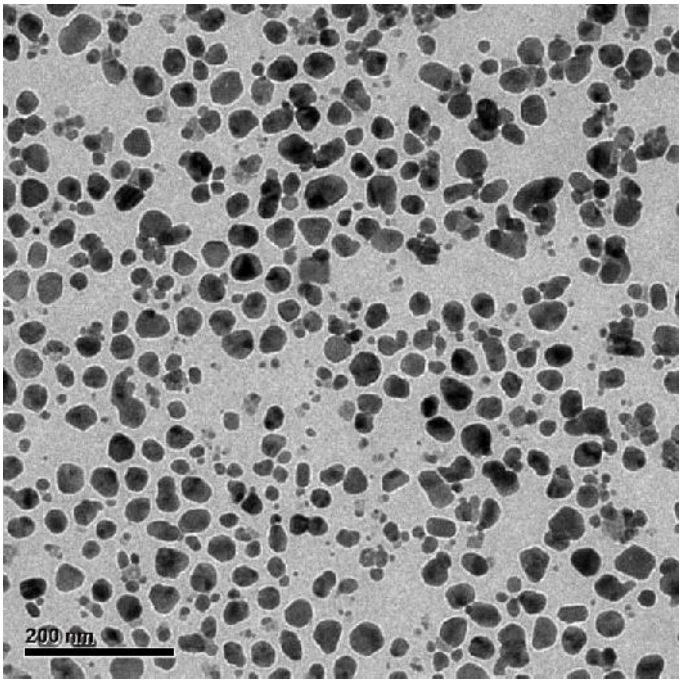
شکل ۲. میکروگراف الکترونی روبشی از نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM نانوذرات نقره در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج سنتز سبز نانوذرات نقره نشان داد که اندازه ای در محدوده ۱۰ تا ۵۰ نانومتر هستند و غالبا شکل کروی دارند.

نتایج حاصل از بررسی ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده

جدول ۱ نتایج حاصل از آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) مرتبط با نانو ذرات نقره و آنتی بیوتیک‌های ونکومایسین و جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت بر علیه باکتری های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. با توجه به گزارش مقالات، دوازده رقت از نانوذرات نقره ۵۰ ، ۲۵ ، ۱۲/۵ ، ۶/۲۵ ، ۳/۱۲۵ ، ۱/۵۶ ، ۰/۷۸ ، ۰/۳۹ ، ۰/۱۹۰ ، ۰/۹۰ و ۰/۰۴۸ میکرولیتر بر میلی لیتر به هر یک ازچاهک های پلیت ۹۶ خانه ای اضافه شد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود، نانوذرات نقره سنتز شده فعالیت خوبی علیه باکتری های گرم مثبت و منفی در این مطالعه از خود نشان داد. به طوری که *باسیلوس سوبتلیس* و *استرپتوکوکوس پایوژنز* در غلظت های ۳/۱۲ و ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب مهار شدند.

همچنین غلظت کشندگی برای این باکتری ها در غلظت‌های ۶۴ و ۳/۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد(جدول ۲). حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذره نقره برای اشریشیاکلی و سودوموناس ۱۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر بود و حداقل غلظت کشندگی نانوذره برای این باکتری ها به ترتیب ۵۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود. نتایج حاصل به میزان غلظت مهار کننده و کشنده ی هر یک از آنتی بیوتیک های مربوطه بسیار نزدیک بود.



شکل ۳. میکروگراف الکترونی گذاره از نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز

جدول ۱ . میزان غلظت بازدارندگی (MIC) نانوذرات نقره، آنتی بیوتیک ونکومایسین و جنتامایسین بر سویه های استاندارد (میکروگرم بر میلی لیتر)

سویه	MIC		
	نانو ذرات نقره	ونکومایسین	جنتا مایسین
اشریشیاکلی ATCC 25922	۱۲/۵	–	۰/۲۵
سودوموناس ائروزینوزا ATCC 27853	۱۲/۵	–	۲
باسیلوس سوبتلیس ATCC 6633	۳/۱۲	۴	–
استرپتوکوکوس پایوژنز ATCC 8668	۱/۵۶	۱	–

جدول ۲ . میزان حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات نقره، ونکومایسین و جنتامایسین بر سویه‌های استاندارد (میکروگرم بر میلی لیتر)

سویه	MBC		
	نانو ذرات نقره	ونکومایسین	جنتامایسین
اشریشیاکلی ATCC 25922	۵۰	–	۳۲
سودوموناس ائروزینوزا ATCC 27853	۲۵	–	۳۲
باسیلوس سوبتلیس ATCC 6633	۶۴	۱۶	–
استرپتوکوکوس پایوژنز ATCC 8668	۳/۱۲	۸	–

بحث و نتیجه گیری

فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز علیه باکتری های گرم مثبت و منفی در مطالعات متعددی بررسی شده است. شمس و همکاران در سال ۲۰۱۴ فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه آنها از عصاره دانه ی عدس (*Lens culinaris*) برای سنتز سبز استفاده شده بود. نتایج گزارش آنها نشان داد، نانوذرات سنتز شده به روش سبز فعالیت ضدمیکروبی شدیدی علیه *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد (۲۳). طی مقالات و پژوهش‌های اخیر، احیاءکننده‌های بیولوژیکی مختلفی برای سنتز نانوذرات فلزی گزارش شده است. چهار دول و خدادادی نانوذره نقره را به روش زیستی و با استفاده از عصاره میوه بلوط سنتز نمودند و فعالیت ضد میکروبی آن را علیه باکتری های ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی بررسی کردند. هاله‌های عدم رشد برای باکتری‌های *باسیلوس سوبتلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیاکلی* مشخص بود به طوری که کمترین هاله مربوط به *باسیلوس سوبتلیس* و بیشترین هاله مربوط به *اشریشیاکلی* بود (۳۱). همچنین شریواستاوا و همکاران و گوزمان و همکاران در مطالعاتی طی سال های ۲۰۰۷ و ۲۰۱۲ انجام دادند به این نتیجه رسیدند که فعالیت ضد میکروبی نانوذره نقره وابسته به غلظت بوده و برای باکتری های گرم منفی نسبت به گرم مثبت چشمگیرتر است (۳۲, ۳۳). این در حالی است که نانو ذرات نقره تولید شده به روش زیستی

در مطالعه حاضر با غلظت کمتری باکتری‌های گرم مثبت را مهار نمود. همچنین در مطالعه ی حاضر بهترین عملکرد نانوذره نقره سنتز شده مربوط به باکتری *استرپتوکوک پایوژنز* می باشد. کیم و همکاران طی مطالعه ای *اشریشاکلی* را حساس ترین باکتری نسبت به نانوذرات نقره معرفی کردند (۳۴). در مطالعه ی چهار دول و خدادادی نیز *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیاکلی* حساستر بودند (۳۱).

در واقع تفاوت بین باکتری ها در مقابل نانوذرات نقره به ساختار دیواره سلولی بر می گردد و باکتری های گرم منفی دیواره نازک تری نسبت به گرم مثبت ها دارند و از طرفی لایه ی لیپوپلی ساکارید باکتری های گرم منفی که دارای بار منفی می باشد باعث بر همکنش بین نانوذره دارای بار مثبت ضعیف با باکتری گرم منفی می شوند و این در نهایت باعث ایجاد سوراخ و ورود نانوذرات به درون سلول و مرگ سلول می شود (۳۵). از طرفی اندازه، بار و شکل نانوذرات نقره سنتز شده در این مطالعه تاثیر به سزایی در ورود آنها به سلول ها داشته است. با وجود این حقیقت در مطالعه حاضر نانوذره نقره نسبت به باکتری‌های گرم مثبت موثر عمل کرد، هر چند *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* دارای MBC پایین تری نسبت به *باسیلوس سوبتلیس* بودند. عدم همخوانی در این مطالعه را احتمالا بتوان به نوع عصاره ی احیاء کننده مرتبط دانست که نیاز به مطالعه ی بیشتری دارد. در مطالعه ای که جانسون و همکارانش در سال ۲۰۱۳ با استفاده از ناتوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی توسط گیاه گندواش (*Artemisia annua*) انجام دادند، گزارش دادند که این نانوذره هم علیه باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* و همچنین علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* فعالیت مهاری یکسانی داشت (۳۶).

در پایان با توجه به یافته های این مطالعه می توان گفت که عصاره گیاه درمنه توانایی مناسبی جهت احیای نمک نقره را دارا می باشد. نانوذرات نقره سنتز شده علیه تمام میکرو ارگانیسم های این پژوهش موثر بود و از این نانوذره احیا شده به روش زیستی می توان در مطالعات بیشتر برای درمان عفونت های ناشی از این ارگانیسم ها بهره برد.

منابع

1- Jung W.K, Koo H.C, Kim K.W, Shin S, Kim S.H, Park Y.H. (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 74(7),2171-8.

2- Rao C.R, Kulkarni G.U, Thomas P.J, Edwards P.P. (2000). Metal nanoparticles and their assemblies. Chem Soc Rev, 29(1), 27-35.

3- Ghorbani HR. (2015). Green Synthesis of Gold Nanoparticles. Oriental J Chem, 31(1):303-5.

4- Honary S, Barabadi H, Gharaei-Fathabad E, Naghibi F. (2012). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using Penicillium aurantiogriseum, Penicillium citrinum and Penicillium waksmanii. Dig J Nanomater Bios, 7, 999-1005.

5- Bollella P, Schulz C, Favero G, Mazzei F, Ludwig R, Gorton L, et al. (2017) Green Synthesis and Characterization of Gold and Silver Nanoparticles and their Application for Development of a Third Generation Lactose Biosensor. Electroanalysis, 29(1), 77-86.

6- Rai M, Yadav A, Gade A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv, 27(1), 76-83.

7- Chen X, Mao SS. (2007). Titanium dioxide nanomaterials: synthesis,

properties, modifications and applications. Chem Rev, 107(7), 2891-2959.
8- Gomathi M, Rajkumar P, Prakasam A, Ravichandran K. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using Datura stramonium leaf extract and assessment of their antibacterial activity. Resource-Efficient Technologies. doi: https://doi.org/10.1016/j.reffit.2016.12.005.
9- Senthilkumar P, Bhuvaneshwari J, Prakash LP, Ranjith S. (2015). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles from aqueous extract brown seaweed of *Padina boergesenii* and its antifungal activity. World J Pharm Sci, 4(10), 1858-70.
10- Sujitha V, Murugan K, Paulpandi M, Panneerselvam C, Suresh U, Roni M, et al. (2015) Green-synthesized silver nanoparticles as a novel control tool against dengue virus (DEN-2) and its primary vector Aedes aegypti. Parasitol Res, 114(9), 3315-25.
11- David L, Moldovan B, Vulcu A, Olenic L, Perde-Schrepler M, Fischer-Fodor E, et al.(2014). Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. Colloids Surf, B: Biointerfaces, 122, 767-77.
12- Marambio-Jones C, Hoek EM. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J Nanopart Res, 12(5),1531-51.
13- Kumar PV, Pammi S, Kollu P, Satyanarayana K, Shameem U. (2014). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using Boerhaavia diffusa plant extract and their anti bacterial activity. Ind Crops Prod, 52, 562-6.
14- Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh V, Shamsi S, Mehta B, et al. (2010). Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. Colloids Surf, B, 81(1), 81-6.
15- Jha AK, Prasad K. (2010). Green synthesis of silver nanoparticles using Cycas leaf. Int J Green Nanotechnol: Physics and Chemistry, 1(2), P110-P7.
16- Khalil MM, Ismail EH, El-Baghdady KZ, Mohamed D. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. Arabian J Chem, 7(6),1131-9.
17- Krishnaraj C, Jagan E, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan P, Mohan N.(2010). Synthesis of silver nanoparticles using Acalypha indica leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. Colloids Surf, B, 76(1), 50-6.
18- Sulaiman GM, Mohammed WH, Marzoog TR, Al-Amiery AAA, Kadhum AAH, Mohamad AB.(2013). Green synthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Eucalyptus chapmaniana* leaves extract. Asian Pac J Trop Biomed, 3(1), 58-63.
19- Dhayalan M, Denison MIJ, Krishnan K. (2017). In vitro antioxidant, antimicrobial, cytotoxic potential of gold and silver nanoparticles prepared using Embelia ribes. Nat Prod Res, 31(4), 465-8.
20- 20. Song JY, Jang H.K, Kim BS. (2009). Biological synthesis of gold nanoparticles using Magnolia kobus and Diopyros kaki leaf extracts. Process Biochem, 44(10),1133-8.
21- Begum NA, Mondal S, Basu S, Laskar RA, Mandal D.(2009). Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. Colloids Surf, B, 71(1), 113-8.
22- Rashidipour M, Heydari R. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles using extract of olive leaf: synthesis and in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells. J Nanostruct Chem, 4(3), 1-6.
23- Shams S, Pourseyedi S, Hashemipour Rafsanjani H. (2014). Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Eco-Friendly and Antibacterial. Int J Nanosci Nanotechnol, 10(2), 127-32.
24- Poiată A, Tuchiluş C, Ivănescu B, Ionescu A, Lazăr M.(2008). Antibacterial activity of some Artemisia species extract. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 113(3), 911-4.
25- Kazemi M, Akhavani S. (2013). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Artemisia tournefortiana Rchb. Essential Oil. Asian J Chem, 25(6), 2985-88.

26- Li S, Shen Y, Xie A, Yu X, Qiu L, Zhang L, et al. (2007). Green synthesis of silver nanoparticles using Capsicum annuum L. extract. Green Chem, 9(8), 852-8.
27- Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. Adv Colloid Interface Sci, 145(1), 83-96.
28- Shahnazi M, Azadmehr A, Hajiaghaee R, Mosalla S, Latifi R. (2015). Effects of *Artemisia Absinthium* L. Extract on the Maturation and Function of Dendritic Cells. Jundishapur J Nat Pharm Prod, 10(2), doi: 10.17795/jjnpp-20163.
29- Ali M, Kim B, Belfield KD, Norman D, Brennan M, Ali GS. (2016). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Artemisia absinthium* aqueous extract- A comprehensive study, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 1,58, 359-65.
30- Bazzaz F., Khajehkaramadian M., Shokooheizadeh H.R., (2005). *In vitro* antibacterial activity of *Rheum ribes* extract obtained from various plant parts against clinical isolates of gram negative pathogens, Iranian. J. Pharm. Res. 4, 87-91
31- Chahardooli M, Khodadadi E. (2014). The Biosynthesis of Silver Nanoparticles using OAK fruit extract and the investigation of their Anti-microbial Activities against nosocomial infection agents. J Ilam Uni Med Sci, 22(1), 27-33.
32- Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. Nanotechnol, 18(22), doi:10.1088/0957-4484/18/22/225103.
33- Guzman M, Dille J, Godet S. (2012). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 8(1), 37-45.
34- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 3(1), 95-101.
35- Mittal AK, Bhaumik J, Kumar S, Banerjee UC. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles: elucidation of prospective mechanism and therapeutic potential. J Colloid Interface Sci, 415, 39-47.
36- Johnsona A, Obota I, Ukponga U. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using Artemisia annua and Sida acuta leaves extract and their antimicrobial, antioxidant and corrosion inhibition potentials. J Mater Environ Sci, 5(3), 899-906.