

بررسی تولید زیستی و اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره تولید شده بوسیله عصاره متانولی گیاه دارویی میخک هندی (*Syzygium aromaticum*)

سودابه مفاخری^{1*}، فاطمه دهقان نیری²، مریم میرحسینی³

1- استادیار گروه مهندسی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

2- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

3- کارشناس ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین

* قزوین، کدپستی 34149-16818

smafakheri@gmail.com

(دریافت مقاله: 94/1/27 پذیرش مقاله: 95/2/26)

چکیده- نانوتکنولوژی به علت تولید نانوذرات در اندازه، شکل، ترکیب شیمیایی و پراکنش متفاوت و کاربردهای بسیار آنها، برای بشر، حوزه تحقیقاتی جذابی به حساب می آید. روش های تولید زیستی نانوذرات نسبت به روش های فیزیکی و شیمیایی، به دلیل کاهش مصرف انرژی و زمان، اولویت دارند. در این مطالعه امکان سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره متانولی جوانه های گل میخک هندی بررسی گردید و سپس اثر ضد باکتری و ضد قارچی نانوذرات نقره تولید شده، به دو روش دیسک و چاهک مورد آزمایش قرار گرفت. برای تأیید تولید نانوذرات نقره از دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج 300 تا 600 نانومتر و جهت اندازه گیری ابعاد و شکل نانوذرات از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد. همچنین به منظور بررسی ترکیبات آلی احتمالی که در سنتز نانوذرات دخالت دارند آنالیز FTIR انجام گردید. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، نانو ذرات تولید شده به وسیله عصاره متانولی میخک هندی؛ کروی بوده و در محدوده 27 تا 69 نانومتر قرار داشتند. همچنین نانو ذرات تولید شده، فعالیت ضد میکروبی مؤثری علیه باکتری های *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* نشان دادند. بنابراین می توان گفت که گیاه میخک هندی غیر از نقش دارویی ویژه ای که دارد، می تواند برای تولید نانوذرات نقره برای مصارف پزشکی و داروسازی استفاده شود.

کلیدواژگان: اثر ضد باکتری، اثر ضد قارچی، عصاره متانولی، میخک هندی، نانوذرات نقره.

1- مقدمه

نانوتکنولوژی علمی است که بر پایه نانوذرات، ذراتی با ساختار سه بعدی با اندازه بین 1 تا 100 نانومتر، استوار است. این مواد دارای اندازه و شکل متنوع مانند بلوری،

امروزه نانوتکنولوژی، به علت کاربرد وسیع در علوم و صنعت، با سرعت فراوانی در حال رشد و پیشرفت است.

کروی، سوزنی، میله‌ای و ... می‌باشند [1]. روش‌های بسیاری برای سنتز نانو ذرات ابداع شده است که بسیاری از آنها از نظر مصرف مواد و انرژی ناکارآمد هستند. در بیشتر تکنیک‌ها، از یک عامل کاهنده شیمیایی برای کاهش یون‌های فلزی و تثبیت کننده، به منظور کنترل رشد ذرات و جلوگیری از تجمع، استفاده می‌شود. در روش‌های سنتز شیمیایی ثبات ذرات بحث برانگیز می‌شود و تولید در مقیاس زیاد دشوار است. به همین دلایل، تقاضا برای تولید نانو ذرات با روش‌های دوستدار محیط زیست وجود دارد [2]. استفاده از میکروارگانیسم‌ها، گیاهان، عصاره‌های گیاهی و یا بیوماس گیاهی می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های فیزیکی و شیمیایی این فرایند باشد. تولید زیستی نانوذرات، ریسک خطرپذیری برای انسان، هوا و در مجموع اکوسیستم را بسیار پایین می‌آورد. سنتز نانوذرات با استفاده از مواد بیولوژیکی به خاطر ویژگی‌های جدید شیمیایی و فیزیکی و کاربردهای زیاد آنها در علوم مختلف پزشکی، کشاورزی، اپتیک، الکترونیک و مکانیک مورد علاقه بسیاری از محققان قرار گرفته است [3].

نانوذرات معمولاً خواص بهتری از نمونه‌های بالک همان عنصر از خود نشان می‌دهند. زیرا آنها سطح ویژه بالاتری نسبت به ذرات درشت‌تر دارند. در مورد نانوذرات ضدباکتری نقره نیز این موضوع صدق می‌کند و مقدار کمی از این مواد، تأثیرات ضد باکتری زیادی دارند. نانوذرات نقره به عنوان ابزار درمانی برای عفونت‌ها در مقابل میکروب‌ها استفاده می‌شود. بنابراین خواص نانوذرات و تأثیر آنها بر میکروب‌ها، در کاربردهای پزشکی حائز اهمیت است. اغلب باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت پیدا کرده‌اند، پس در آینده نزدیک نیاز مبرم به جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها با مواد جدید دارای خاصیت ضدباکتریایی وجود دارد. از آنجا که نانوذرات نقره با غلظت پایین در محیط بدن غیرسمی هستند، گزینه

خوبی برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار می‌آیند. این مواد در غلظت‌های کمتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، از رشد باکتری جلوگیری کرده و عوارض جانبی خیلی کمتری دارند [4]. گزارش‌های متعددی در رابطه با استفاده از سنتز زیستی نانوذرات نقره و فعالیت ضد میکروبی آنها وجود دارد؛ بعنوان مثال، چهاردولی و خدادادی (2013) از نانوذرات نقره حاصل از عصاره میوه بلوط علیه باکتری‌های ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی استفاده کردند [5]. شمس و همکاران در سال 2014، خاصیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره حاصل از عصاره بذر عدس را بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی کردند. نانوذرات نقره یک عامل مؤثر کشنده در برابر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت، حتی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است [6]. اخیراً، مشخص شده است که نانوذرات نقره فعالیت ضد باکتریایی آنتی بیوتیک‌های مختلف را افزایش می‌دهند [7].

میخک با اسم علمی *Syzygium aromaticum* از گیاهان ارزشمند خانواده Myrtaceae، درختی متوسط به ارتفاع 8 تا 30 متر با تاج نسبتاً متراکم، برگ‌های بدون کرک، براق و دارای تعداد زیادی غدد ترشح کننده اسانس در بخش زیرین پهنک، است. بیشتر بخش‌های این گیاه معطر می‌باشد اما جوانه‌های گل باز نشده آن پس از جمع‌آوری و خشک شدن به عنوان میخک دارویی یا میخک هندی مصرف می‌گردند. این درخت بومی اندونزی است که به فراوانی در کشورهای دیگر از جمله برزیل کشت می‌شود. میخک جایگاه مهمی در طب سنتی مشرق زمین دارد به طوری که سال‌هاست به عنوان نگهدارنده در صنایع غذایی استفاده می‌شود. این گیاه منبع غنی از ترکیبات فنلی مانند اوژنول، اوژنول استات و گالیک اسید می‌باشد [8].

هدف از اجرای این تحقیق بررسی امکان تولید نانوذرات نقره با استفاده از عصاره متانولی میخک هندی و سپس

تعیین اثر ضد باکتری و ضد قارچی نانوذرات تولید شده می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- تهیه عصاره متانولی از غنچه خشک شده میخک

هندی

استخراج عصاره میخک به روش سوکسله و با استفاده از حلال متانول انجام گردید. نمونه‌های گیاهی از عطاری معتبر تهیه و با مراجعه به هرباریوم گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی جنس و گونه آن تأیید گردید. حدود 10 گرم نمونه پودر شده درون کارتوش انتقال داده شد و در بخش استخراج کننده دستگاه قرار گرفت سپس 500 میلی‌لیتر متانول درون بالن ریخته شد، برای انجام عمل استخراج از دمای 50 °C به مدت 2 تا 3 ساعت استفاده شد. به منظور حذف حلال، عصاره حاصل در دستگاه روتاری تحت عملیات تقطیر در خلأ قرار گرفت. از خلأ 25 میلی‌متر جیوه در دمای 50 درجه سانتی‌گراد استفاده شد. در نهایت، با کمک گاز ازت باقیمانده حلال حذف شد و عصاره حاصل در فویل آلومینیومی پیچیده و در یخچال نگهداری شد.

2-2- سنتز نانوذرات نقره و تعیین ویژگی‌های آن

جهت سنتز نانوذرات نقره ابتدا استوک نیترات نقره با غلظت 500 میلی‌گرم در 50 میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد و از آن جهت تهیه 50 میلی‌لیتر محلول 1 میلی‌مولار نیترات نقره استفاده گردید. به این محلول 5 میلی‌لیتر از عصاره متانولی اضافه و در دمای محیط روی شیکر با دور 100 دور در دقیقه قرار داده شد. پس از اینکه فرایند سنتز نانوذرات نقره تکمیل شد، به منظور تغلیظ نانوذرات بیوسنتز شده، محلول کلونیدی حاصل، با دور 12000 rpm به مدت 30 دقیقه سانتریفیوژ (Hettich-D78532) ساخت

کشور آلمان)، شد. سپس فاز رویی جدا و سوسپانسیون باقی مانده جهت انجام تست‌ها استفاده گردید [9]. به منظور تأیید تولید نانوذره نقره از دستگاه اسپکتروفتومتری (Labomed-UVB3200 ساخت کشور انگلستان)، با طول موج 300 تا 600 نانومتر و برای اندازه‌گیری ابعاد و شکل نانوذرات از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل MIRA 3 ساخت کشور چک، استفاده شد. همچنین از دستگاه FTIR (Bruker مدل Tensor 27، ساخت کشور آلمان)، به منظور بررسی ترکیبات آلی احتمالی موجود در عصاره میخک که در سنتز نانوذرات دخالت دارند استفاده گردید [9,3].

2-3- سویه‌های باکتری و قارچ و روش بررسی اثر

نانوذرات نقره بر آن‌ها

به منظور بررسی خواص ضد قارچ و ضد باکتری نانوذرات نقره تولید شده روی باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و قارچ مخمر *Saccharomyces cerevisiae* از دو روش دیسک و چاهک استفاده شد. ابتدا مایه میکروبی دارای کدورت 0/5 مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ CFU/mL) تهیه گردید. در روش دیسک از مایه میکروبی توسط سواب بطور یکنواخت روی محیط کشت مغذی، کشت داده شد. دیسک‌های دیفیوژن بلانک (قطر 6 میلی‌متر) پوشش‌دار شده با نانوذرات نقره روی محیط کشت قرار داده شد. محیط‌های کشت به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از گذشت این زمان هاله عدم رشد باکتری و قارچ اطراف دیسک‌ها محاسبه شد [11,10].

در روش چاهک، ابتدا چاهک‌هایی به قطر 6 میلی‌متر در محیط کشت مغذی حاوی آگار ایجاد شد. سپس مایه میکروبی به صورت متراکم روی محیط، کشت داده شد و

4-3- طیف‌سنجی FTIR

آزمون طیف‌سنجی FTIR به منظور شناسایی گروه‌های فعال و گروه‌های احیاء‌کننده یون‌های نقره در محدوده $500-3500\text{ cm}^{-1}$ انجام شد. نتایج این آنالیز قبل و بعد از انجام واکنش با نیترات‌نقره در شکل 4 نشان داده شده است. پیک‌های مربوط به ارتعاشات در طول موج‌های 602، 676، 1152، 2360، 2924 و 3419 وجود دارند که به ترتیب مربوط به گروه‌های آلکیل، آلکن، گروه‌های کربونیل (CO)، CO₂، قندی (CH) و هیدروکسیل (OH) هستند [14،13].

5-3- اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره

در این مطالعه اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره حاصل از عصاره متانولی میخک، بر باکتری‌های *B. subtilis*، *S. aureus*، *E. coli* و قارچ مخمر *S. cerevisiae* به روش هاله عدم رشد (روش‌های دیسک و چاهک) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده وجود فعالیت ضد میکروبی قوی در نانوذرات تولید شده بوسیله عصاره متانولی گیاه میخک بود (شکل‌های 5 و 6).

میزان هاله عدم رشد باکتری و قارچ برحسب میلی‌متر به دو روش دیسک و چاهک تعیین گردید که در جدول‌های 1 و 2 آمده است. روش دیسک فقط برای دو باکتری *B. subtilis* و *S. aureus* نتیجه داد که در جدول 1 قابل مشاهده است. نانوذرات حاصل از عصاره متانولی میخک، فعالیت ضد باکتریایی زیادی از خود نشان دادند. مخمر *S. cerevisiae* بیشترین میزان حساسیت به نانوذره را از خود نشان داد. در روش چاهک، میزان هاله عدم رشد در غلظت 50 میکرولیتر نانوذره برای باکتری‌های *B. subtilis*، *S. aureus*، *E. coli* و مخمر *S. cerevisiae* به ترتیب 6، 10/25، 10/15 و 10/75 میلی‌متر محاسبه شد (جدول 2). بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش، نانوذره نقره حاصل از عصاره متانولی میخک روی هر دو گروه باکتری‌های

نانوذره تولید شده به میزان 10، 20، 40 و 50 میکرولیتر از استوک 1 میلی‌مولار، در چاهک ریخته و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد نگهداری شد، سپس هاله عدم رشد بعد از 24 ساعت بررسی گردید [11،10].

3- نتایج

3-1- سنتز نانوذرات نقره

در اثر احیای یون‌های نقره و تولید نانوذرات، رنگ نمونه‌ها از زرد کمرنگ به قهوه‌ای تیره تبدیل شد (شکل 1). تغییر رنگ مشاهده شده از زرد کم رنگ به قهوه‌ای تیره تا سیاه در اثر برهم کنش عصاره گیاهی و محلول نمک نقره با نتایج حاصل از پژوهش بسیاری از محققان کاملاً مشابه بود و اولین نشانه از تولید نانوذرات نقره محسوب می‌شود.

3-2- طیف‌سنجی ماوراءبنفش

شکل 2 نشان دهنده طیف جذبی نانو ذرات تولید شده، توسط دستگاه اسپکتروسکوپی است که افزایش جذب در محدوده 450 تا 600 نانومتر، بیانگر سنتز نانوذرات نقره است (شکل 2). یکی از ویژگی‌های جالب نانوذرات فلزی خواص نوری آن‌ها است، که متناسب با شکل و اندازه نانو ذرات تغییر میکند. در نانو ذرات فلزی تشدید پلاسمون سطحی مسئول خواص نوری منحصر به فرد آن‌هاست که تحت فاکتورهایی از قبیل اندازه نانو ذرات، شکل نانو ذرات، فاصله آن‌ها از همدیگر و ضریب شکست محیط پیرامون تغییر میکند [12].

3-3- عکس‌برداری الکترونی روبشی (SEM)

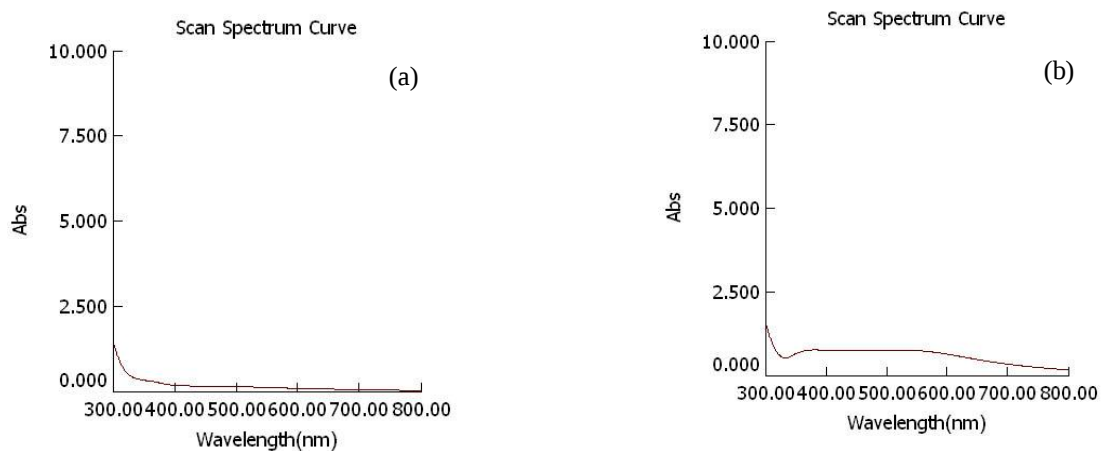
شکل 3 تصویر به دست آمده از نانو ذرات نقره با اشکال کروی و در محدوده اندازه 27 تا 69 نانومتر را نشان می‌دهد که با میکروسکوپ الکترونی نگاره تهیه شده است.

باکتری گرم مثبت *B. subtilis* نشان داد و هاله عدم رشد بزرگتری را ایجاد نمود (جدول 2).

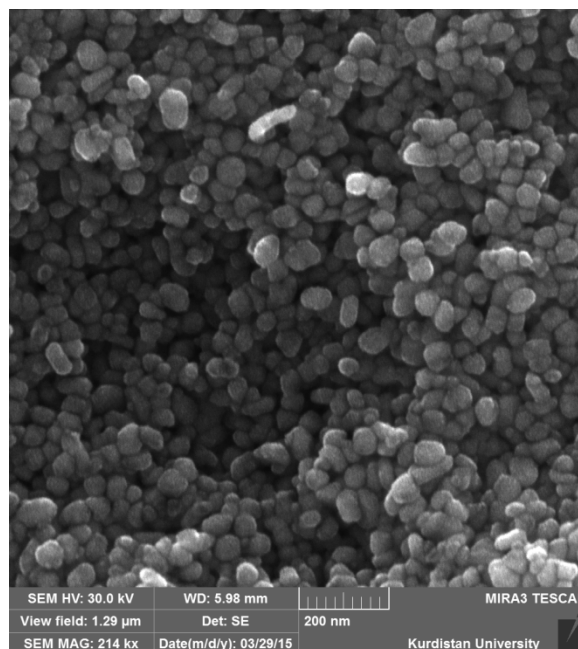
گرم مثبت و گرم منفی اثر باکتریوسایدی داشت، با این وجود، باکتری گرم منفی *E. coli* حساسیت بیشتری از



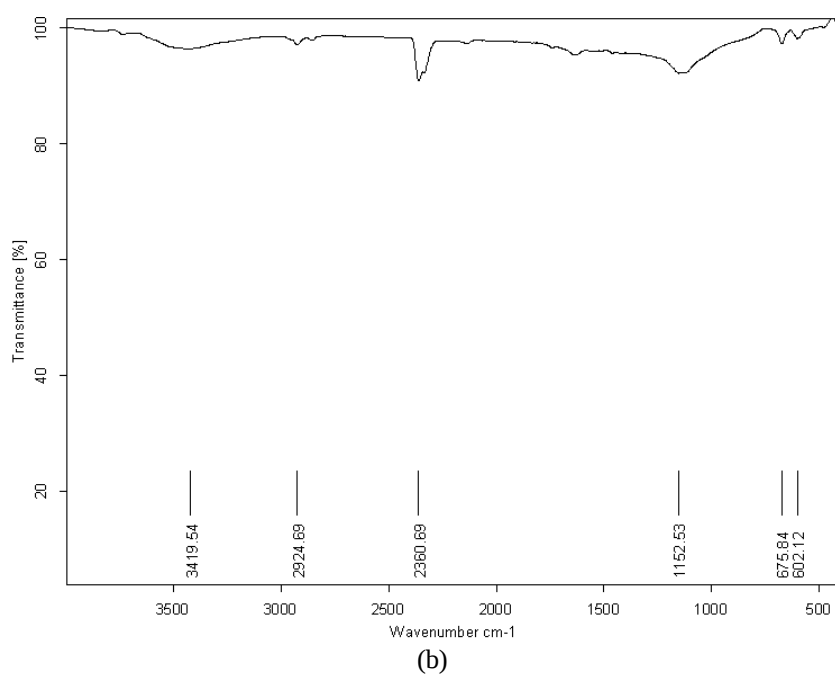
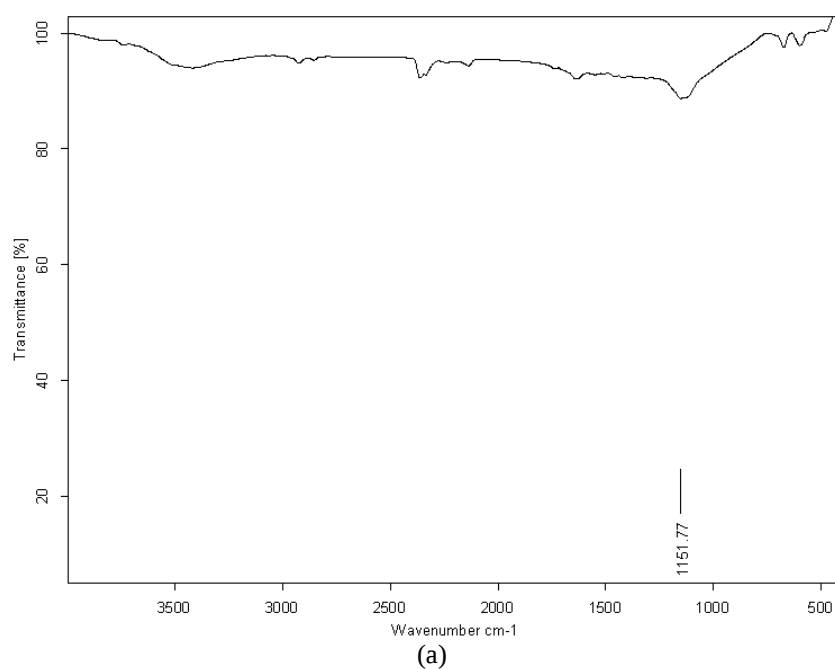
شکل 1 از چپ به راست مراحل مختلف تغییر رنگ واکنش و تولید نانوذرات نقره با استفاده از عصاره متانولی میخک



شکل 2 نمودار اسپکتروفتومتری با اشعه ماوراءبنفش در زمان‌های (a) صفر و (b) 12 ساعت



شکل 3 تصویر نانوذرات نقره بدست آمده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)



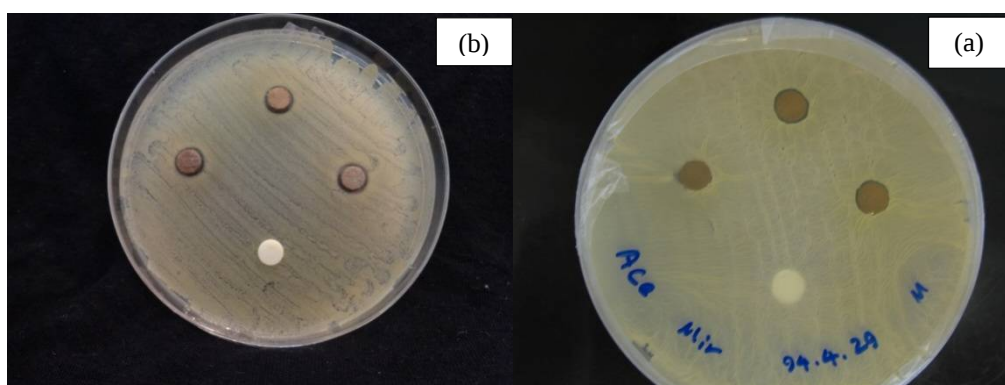
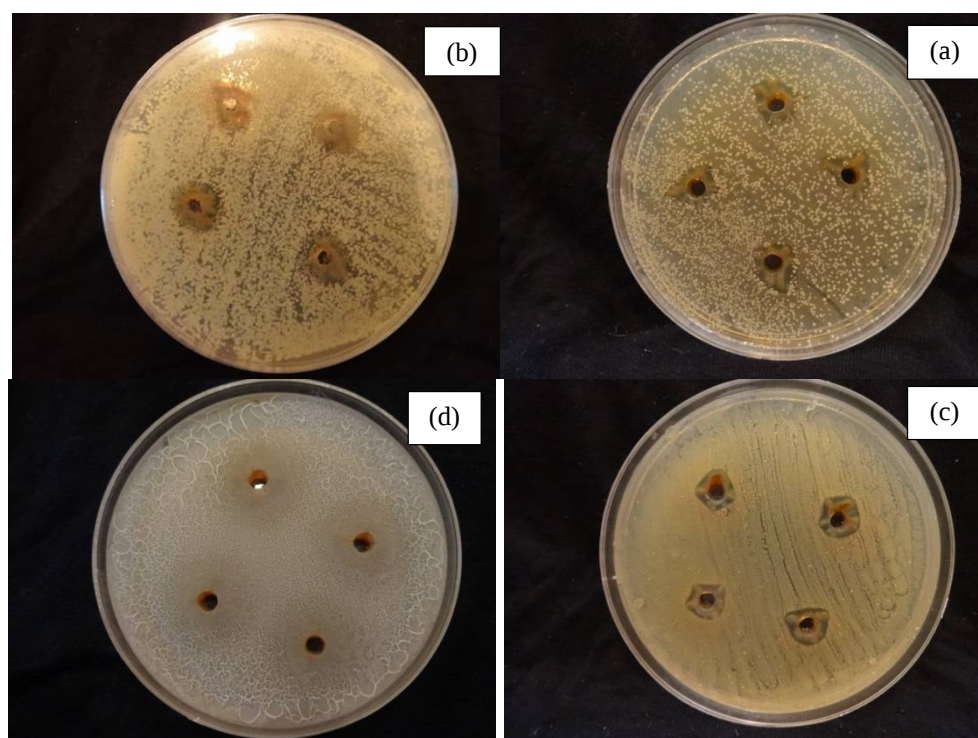
شکل 4 طیف سنجی FTIR. (a) عصاره خالص میخک، (b) پس از انجام واکنش عصاره با نیترات نقره

جدول 1 هاله عدم رشد به روش دیسک

میکروارگانیزم	هاله عدم رشد (میلی متر)
<i>B.subtilis</i>	7/5
<i>S.aureus</i>	8

جدول 2 هاله عدم رشد به روش چاهک

میزان نانوذره در هر چاهک (میکرولیتر)				میکروارگانیزم
50	40	20	10	
6	6	6	6	<i>B.subtilis</i>
10/25	9/75	8/5	7	<i>S.aureus</i>
10/15	10	8	8	<i>E.coli</i>
10/75	10/50	9/75	8	<i>S.cervisiae</i>

شکل 5 هاله عدم رشد (a) *B. subtilis* (b) *S. aureus* به روش دیسک. دیسک سفید شاهد و حاوی آب مقطر استریل است.شکل 6 هاله عدم رشد به روش چاهک، (a) *S. cerevisiae* (b) *S. aureus* (c) *E. coli* (d) *B. subtilis*

4- بحث

امروزه، تهیه نانوذرات زیستی با توجه به کارایی آنها در پزشکی و علوم زیستی رو به افزایش است؛ از سوی دیگر، افزایش آگاهی نسبت به شیمی سبز و فرایندهای بیولوژیکی، استفاده از روش‌های سازگار با محیط زیست را برای تهیه غیر سمی نانو مواد زیستی ضروری کرده است. روش‌های فیزیکی تولید نانوذرات نیازمند صرف انرژی بالایی بوده و روش‌های شیمیایی نیز معمولاً منجر به باقی ماندن مقداری از واکنش‌گرهای سمی و عدم استفاده از نانوذرات حاصل در کاربردهای زیستی می‌شود. به همین دلیل در سال‌های اخیر بیوستتر نانوذرات به وسیله گیاهان، به عنوان روشی زیست سازگار و سبز، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. استفاده از عصاره‌های گیاهی در تهیه نانو ذرات یک روش نوظهور و بسیار کاربردی است. در بین نانوذرات، نانوذرات نقره به دلیل خصوصیات منحصر به فردشان، کاربردهای فراوانی داشته و می‌توانند به عنوان محصولات تجاری محسوب شوند. سنتز این نانوذرات با استفاده از روش‌های فیزیکوشیمیایی به دلیل ناسازگاری با محیط زیست برای مصرف کنندگان و محققان جذابیت زیادی ندارند. بنابراین روش‌های سنتز زیستی به دلیل زیست سازگار بودن در اولویت قرار گرفته‌اند [15]. یکی از کاربردهای مهم نانو ذرات نقره در پزشکی، کاربرد آن‌ها به عنوان مواد ضد میکروبی است، که هنوز روش دقیق ممانعت از رشد میکروب‌ها توسط نانو ذرات نقره، به درستی مشخص نشده است.

در تحقیق حاضر، ابتدا امکان سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره میخک هندی به عنوان عامل کاهنده، بررسی شد و سپس تأثیر آنها بر توقف رشد باکتری‌ها و قارچ مخمر مورد آزمایش قرار گرفت. جهت بررسی تغییر رنگ محلول با گذشت زمان از آنالیز اسپکتروفتومتری استفاده شد. همان‌طور که در شکل 2(b) مشاهده می‌شود

با گذشت 12 ساعت از شروع واکنش میزان جذب در محدوده 450 تا 600 نانومتر به مقدار کمی افزایش یافت که بیانگر تولید نانوذرات نقره می‌باشد. تفاوت در زمان افزایش جذب، احتمالاً به دلیل شرایط آزمایشگاهی مختلف موجود در زمان تولید نانوذرات می‌باشد، به عنوان مثال درمورد تولید نانوذرات نقره توسط گیاه آلوئه ورا، این زمان 24 ساعت و پیک افزایش جذب اسپکتروفتومتری هم نامشخص گزارش شده است [16]. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اندازه نانوذرات سنتز شده بین 27 تا 69 نانومتر تعیین و شکل ذرات کروی مشاهده گردید. اگرچه شکل این ذرات بسیار مشابه با شکل نانوذرات نقره‌ای است که توسط گیاهان دیگر سنتز شده است ولی اندازه نانوذرات بدست آمده در تحقیق حاضر، کمتر از نتایج بسیاری از محققین که غالباً بیش از 70 نانومتر گزارش شده‌اند می‌باشد. Pal و همکاران در سال 2007، مطالعه‌ای انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که نانو ذرات نقره‌ای که به شکل کروی هستند مساحت بیشتری نسبت به سایر اشکال دارند و می‌توانند واکنش سطحی بیشتری بر باکتری هدف داشته باشند [17]. بنابراین علاوه بر اندازه ذرات، شکل آنها نیز در میزان خواص ضد میکروبی آن دخیل است. کریمی و محسن-زاده (1391) تولید گیاهی نانوذرات نقره توسط گیاه دارویی بومادران را مورد مطالعه قرار دادند و از عصاره گیاه بومادران به عنوان عامل کاهنده برای تولید زیستی نانوذرات نقره استفاده کردند. تشکیل نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج 450 نانومتر تأیید شد و اندازه و مورفولوژی این نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره تعیین شد. شکل ذرات کروی و اندازه متوسط آنها 110 نانومتر گزارش گردید [9]. Shamkar و همکاران، از عصاره گیاه چریش برای سنتز نانو ذرات نقره استفاده کردند، این محققان اندازه نانوذرات را بین 5 تا 35 نانومتر و شکل آنها را

کروی گزارش کردند [18]. نیکبخت و پورعلی (1394) اندازه نانو ذرات حاصل از عصاره متانولی برگ گیاه عناب را در رنج بین 5 تا 50 نانو متر و شکل آن را کروی گزارش کردند [19]. Jiale Huang و همکاران هم اندازه نانو ذرات نقره و طلا تولید شده به وسیله عصاره گیاه کافور را 55 تا 80 نانومتر گزارش کردند [20]. Elia و همکاران (2014) تولید نانوذرات طلا با استفاده از عصاره گیاهان مریم‌گلی، به‌لیمو، شمع‌دانی عطری و انار را مطالعه کردند. نانوذرات تولید شده با استفاده از عصاره مریم‌گلی، به‌لیمو و شمع‌دانی عطری، کوچک و در محدوده 1 تا 8 نانومتر بود در حالی که انار نانوذراتی در حدود 30 تا 70 نانومتر تولید کرد [21].

آنالیز FTIR به منظور بررسی ترکیبات آلی احتمالی که در سنتز نانو ذرات دخالت دارند انجام شد. بر اساس شکل 4 پس از واکنش با نیترات نقره مقداری جابجایی در محل و ارتفاع پیک‌ها بوجود آمده است. این جابجایی بطور واضح در محل پیک‌های 3419، 2360 و 1152 مربوط به شکسته شدن پیوندهای گروه‌های هیدروکسیل، کربونیل و CO₂، آزاد شدن هیدروژن و کربن و نقش آنها در کاهش بار و احیای یون‌های نقره است. نتایج این تحقیق نشان داد که گروه‌های OH و CO موجود در عصاره متانولی می‌تواند از ترکیبات احتمالی احیای نیترات نقره به نانوذرات نقره هستند. مکانیزم قطعی تشکیل نانوذرات طی سنتز سبز هنوز مشخص نشده است. با وجود این اعتقاد برخی از محققان بر این است که سطح فعال مولکول‌های ترپنوئیدی باعث احیای یون‌های فلزی و تثبیت نانوذرات سنتز شده می‌شوند. احتمالاً این مولکول‌ها با و یا بدون عامل احیاء‌کننده دیگر (قندها) در این فرایند مؤثر هستند. ترپنوئیدها گروه بزرگ و متنوعی از متابولیت‌ها هستند که از واحدهای ساختمانی پنج کربنی ایزوپرنی ساخته شده‌اند و انواع متفاوتی دارند. از آنجا که این مواد بیشترین گروهی از محصولات طبیعی هستند که تقریباً در

همه موجودات زنده وجود دارند بنابراین احتمال می‌رود که بسیاری از عصاره‌های گیاهی به علت وجود ترپنوئیدها و احیاء قندها در آنها می‌توانند در سنتز نانوذرات فلزی مورد استفاده قرار گیرند [22].

براساس نتایج حاصل از این آزمایش، نانوذرات نقره رشد باکتری‌ها و مخمر را متوقف کردند. مخمر *S. cerevisiae* حساسیت بیشتری به نانوذرات حاصل نشان داد. همانطور که انتظار می‌رفت با افزایش میزان نانوذرات هاله عدم رشد بزرگتر شد و بازدارندگی بیشتری نشان داد. بسیاری از منابع نشان داده‌اند که اثر مرگبار نانو ذرات نقره به دلیل عمل همزمان بر دیواره سلولی، نفوذ به غشای سیتوپلاسمی، اثر بر زنجیره تنفس سلولی همچنین بازداشتن سلول از همانندسازی DNA و در نتیجه جلوگیری از تولیدمثل می‌باشد که این ساختارها در همه باکتری‌ها یکسان است. Jagtap و همکاران در تحقیقی که در سال 2013 انجام دادند، از عصاره پودر بذر گیاه *Artocarpus heterophyllus* Lam. به عنوان عامل کاهنده در تولید نانوذرات نقره استفاده کردند و تأثیر نانوذره حاصل را بر باکتری‌های گرم مثبت (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) و گرم منفی (*Pseudomonas aeruginosa*) بررسی کردند. آنها به این نتیجه رسیدند که نانوذرات حاصل دارای تأثیر بازدارنده بسیار خوبی بر رشد و تکثیر هر دو گروه از باکتری‌ها بود [23]. عبدالعزیز و همکاران (2013)، با استفاده از عصاره برگ *Chenopodium murale* اقدام به سنتز نانو ذرات نقره با اندازه 30 تا 50 نانومتر نمودند. آنها گزارش کردند که نانوذرات تهیه شده به این روش دارای خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانتی قوی بود [24]. هارجای و همکاران (2013) با مطالعه خواص آنتی‌باکتریال نانوذرات حاصل از عصاره گیاه چریش دریافتند که نانوذرات نقره اثر آنتی‌باکتریال روی باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus*

فعالیت ضد میکروبی آن بر علیه عوامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام. 22: 27-33.

[6] Shams, S., Pourseyedi, S., and Hashemipour Rafsanjani, H. (2014) Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Eco-Friendly and Antibacterial. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **10**(2), 127-132.

[7] Shahverdi, A., Fakhimi, R., Shahverdi, A., and Minaian, S. (2007) Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. **3**, 168-171.

[8] Cortés-Rojas, D.F., de Souza, C.R.F., and Oliveira, W.P. (2014) *Clove (Syzygium aromaticum): a precious spice*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. **4**(2), 90-96.

[9] کریمی، ج.، محسن‌زاده، س. (1391) تولید گیاهی نانو ذرات نقره توسط گیاه دارویی بومادران. مجله علوم پزشکی رازی. (111) 20: 64-67.

[10] Li, W.R., Xie, X.B., Shi, Q.S., Duan, S.S., Ou-Yang, Y.S., and Chen, Y.B. (2011) Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals*. **24**, 135-141.

[11] Savithramma, N., LingaRao, M., Rukmini, K., and Suvamalathadevi, P. (2011) Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants. *International Journal of ChemTech Research*. **3** (3), 1394-1402.

[12] Rai, R., and Bai, J.A. (2011). Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. *Science against microbial pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. **1**, 197-209.

[13] Pavia, D.L., Lampman, G.M., and Kriz, G.S. (2001) *Introduction to Spectroscopy: A Guide for students in organic chemistry college publishing*. 3rd edition, 579 pp.

[14] Nakanishi, K. (1962). *Infrared absorption spectroscopy - Practical*, Holden-Day, Inc., San Francisco. 233 pp.

[15] Elia, P., Zach, R., Hazan, S., Kolusheva, S., Porat, Z., and Zeiri, Y. (2014) Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as

aureus دارد [25]. خلیل و همکاران (2013) دریافتند که نانوذرات حاصل از عصاره برگ زیتون اثر ضدباکتریایی روی باکتری‌های *S. aureus*, *E. coli* و *P. aeruginosa* دارد [26]. نتایج حاصل از این مطالعات، با نتایج به دست آمده از این تحقیق مطابقت دارد.

براساس نتایج حاصل، سنتز نانوذرات نقره با استفاده از میخک هندی بدون نیاز به مواد اولیه گران قیمت، قابلیت تولید در مقیاس صنعتی را دارد. با توجه به خاصیت ضد میکروبی این ذرات روی سویه‌های مورد آزمایش می‌توان از آنها بعنوان ماده ضد عفونی کننده مؤثر برای استریل کردن محیط بیمارستان و گندزدایی پسماندهای بیمارستانی استفاده نمود. بنابراین می‌توان گفت که گیاه میخک هندی غیر از نقش دارویی ویژه‌ای که دارد می‌تواند برای تولید نانوذرات نقره برای مصارف پزشکی و داروسازی استفاده شود.

5- منابع

[1] Ahmed, A., Mohamed, M., Moustafa, M., and Nazmy, H. (2013) mass concentrations and size distributions Measurements of atmospheric aerosol Particles. *Journal of Nuclear and Radiation Physics*. **8** (1-2), 55-64.

[2] Sintubin, L., Windt, W.D., Dick, J., Mast, J., van der Ha, D., Verstraete, W., and Boon, N. (2009) Lactic acid Bacteria as Reducing and Capping Agent for the Fast and Efficient Production of Silver Nanoparticles. *Applied Microbiology Biotechnology*. **6**, 741-749.

[3] کشاورزی، م. (1391). بررسی امکان بیوسنتز نانوذرات نقره در بیوماس گیاه یونجه در شرایط این ویترو. اولین کنفرانس ملی نانو فن‌آوری و کاربرد آن در کشاورزی و منابع طبیعی.

[4] غفیفه، م. (1391). فعالیت ضد باکتری نانوذرات نقره، طلا و پلاتین. سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (گیاهی، دامی و صنعتی).

[5] چهاردولی، م.، خدادادی، ا. (1392). تولید نانوذرات نقره به روش زیستی با استفاده از عصاره میوه بلوط و بررسی

- Chemistry Research. **47**(16), 6081-6090.
- [21] Elia, P., Zach, R., Hazan, S., Kolusheva, S., Porat, Z., and Zeiri, Y. (2014) Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. *International Journal of Nanomedicine*. **9**, 4007-4021.
- [22] Song, J.Y., Kwon, E.Y., and Kim, B.S. (2010). Biological synthesis of platinum nanoparticles using *Diopyros Kaki* leaf extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **33**(1), 159-64.
- [23] Jagtap, U.B., and Bapat V.A. (2013) *Green* synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* Lam. seed extract and its antibacterial activity. *Industrial Crops and Products*. **46**, 132-137.
- [24] Abdel-Aziz, M.S. (2014) Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. *Journal of Saudi Chemical Society*, **18**(4), 356-363.
- [25] Harjai, K., Bala, A., Gupta, R.K., and Sharma, R. (2013) Leaf extract of *Azadirachta indica* (neem): a potential anti-biofilm agent for *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens and Disease*. **69**, 62-65.
- [26] Khalil, M., Ismail, E., and El-Magdoub, F. (2013) Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract. *Arabian Journal of Chemistry*. **5**, 431-437.
- reducing agents. *International Journal of Nano medicine*. **9**, 4007-4021.
- [16] Shankar, S.S., Rai, A., and Ahmad, S. (2004). Rapid synthesis of Au core- Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth *J Colloid Interface Science*. **275**: 496-502.
- [17] Pal, S., Tak, Y.K., and Song, J.M. (2007) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle a study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. **26**, 1712-1720.
- [18] 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**(2) 496-502.
- [19] نیکبخت، مریم، و پورعلی، پرستو. (1394) بررسی تولید زیستی و اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره تولید شده به وسیله عصاره آبی و متانولی گیاه عناب. *مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی*. **25** (2)، 118-112.
- [20] Huang, J. (2008) Continuous-flow biosynthesis of silver nanoparticles by lixivium of sundried *Cinnamomum camphora* leaf in tubular microreactors. *Industrial and Engineering*