

Optimization, Characterization, and Investigation of Antibacterial Activity of Gold Nanoparticles Biosynthesized by Aqueous Extract of *Seidlitzia rosmarinus*

Omid Azizian Shermeh^{1*}, Mozghan Taherizadeh², Moharam Valizadeh³, Jafar Valizadeh⁴, Ali Qasemi⁴, Behrooz Naroei⁴

¹Medicinal & Ornamental Plants Research Center, University of Sistan & Baluchestan, Zahedan, Iran.

²Bacteriology Laboratory, Rural Water & Sewage Company of Sistan & Baluchestan, Zahedan, Iran.

³Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, Higher Educational Complex of Saravan, Saravan, Iran.

⁴Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Sistan & Baluchestan, Zahedan, Iran.

*Corresponding Author:
Omid Azizian Shermeh,
Medicinal & Ornamental Plant Research Center,
University of Sistan & Baluchestan, Zahedan, Iran.

Email:
Omid_azizian@yahoo.com

Received: 3 May, 2016

Accepted: 12 Jun, 2016

Abstract

Background and Objectives: The advantages of biological methods are Low cost, non-toxicity, production of high purity nanoparticles, low time-consuming, and completeness reaction time. In the present study, biosynthesis of gold nanoparticles using aqueous extract of *Seidlitzia rosmarinus* and their antimicrobial activity, were investigated.

Methods: In this study, after preparing the extract, 2 ml of it was added to 4 ml of $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ with concentration of 1mM, and the color of solution immediately changed to purple. The parameters affecting the synthesis of nanoparticles [such as pH of reaction medium, extract volume, concentration of gold (III) salt, temperature, and reaction time], were assessed and optimized using UV-vis spectrophotometry. A transmission electron microscope (TEM) was used to characterize the nanoparticles. The antibacterial activity of nanoparticles against four species of pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhimurium*), were assessed by agar well diffusion method.

Results: Gold nanoparticles showed the maximum absorbance at 544 nm. It was found that the nanoparticles have spherical shape and their average size was 10-18 nm. Also, the results of antibacterial activities showed that the synthesized nanoparticles had relatively high antibacterial activity.

Conclusion: In the current study, the aqueous extract of *Seidlitzia rosmarinus* due to its secondary components and antioxidant activity, has high potential in reduction of gold metal ions as well as synthesis and stabilization of gold nanoparticles, and these synthesized gold nanoparticles were also relatively high antibacterial activity.

Keywords: Metabolism; Antibacterial activity; *Rosmarinus*; Nanoparticles.

بهینه‌سازی، مشخصه‌یابی و بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلای بیوسنتز شده با استفاده از عصاره آبی گیاه اشنان

امید عزیزیان شرمه^{۱*}، مژگان طاهری‌زاده^۲، محرم ولی‌زاده^۳، جعفر ولی‌زاده^۴، علی قاسمی^۵، بهروز نارویی^۶

چکیده

زمینه و هدف: از مزایای استفاده از روش‌های زیستی می‌توان به ارزان بودن، غیرسمی بودن، تولید نانوذرات با خلوص بالا، کوتاهی زمان و کامل بودن واکنش اشاره کرد. در مطالعه حاضر، بیوسنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره آبی گیاه اشنان (*Seidlitzia rosmarinus*) و فعالیت ضد میکروبی آنها بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه، پس از آماده‌سازی عصاره، ۲ میلی‌لیتر از آن به ۴ میلی‌لیتر از نمک طلا ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) با غلظت ۱ میلی‌مولار اضافه شد که بلافاصله رنگ محلول به رنگ ارغوانی تغییر رنگ داد. پارامترهای مؤثر بر سنتز نانوذرات (نظیر pH محیط واکنش، حجم عصاره، غلظت نمک طلا (III)، دما و زمان واکنش)، بررسی و با استفاده از اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی بهینه‌سازی شدند. برای مشخصه‌یابی نانوذرات، از تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده گردید. فعالیت آنتی‌باکتریایی نانوذرات بر روی چهار گونه باکتری بیماری‌زا (نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انترکوکوس فکالیس*، *اشرشیاکلی* و *سالمونلا تیفی* موربوم) با روش انتشار چاهکی در آگار مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نانوذرات طلا، حداکثر جذب را در ۵۴۴ نانومتر نشان داد و مشخص گردید نانوذرات سنتز شده، کروی شکل بوده و میانگین اندازه آنها بین ۱۸-۱۰ نانومتر می‌باشد. همچنین نتایج فعالیت آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلا نشان داد نانوذرات سنتز شده، فعالیت آنتی‌باکتریایی نسبتاً خوبی علیه برخی از باکتری‌ها دارد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر، عصاره آبی گیاه اشنان به واسطه داشتن ترکیبات ثانویه و خاصیت آنتی‌اکسیدانی، پتانسیل بالایی در احیای یون‌های فلز طلا، سنتز و پایدارسازی نانوذرات طلا داشت. همچنین این نانوذرات طلای تولید شده، دارای خاصیت آنتی‌باکتریایی نسبتاً بالایی بود.

کلید واژه‌ها: متابولیسم؛ فعالیت آنتی‌باکتریایی؛ اشنان؛ نانوذرات.

^۱مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.

^۲آزمایشگاه باکتریولوژی، شرکت آب و فاضلاب روستایی سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.

^۳گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران.

^۴گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

امید عزیزیان شرمه، مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
omid_azizian@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۲۲

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Azizian Shermeh O, Taherizadeh M, Valizadeh J, Qasemi A, Naroei B. Optimization, characterization, and investigation of antibacterial activity of gold nanoparticles biosynthesized by aqueous extract of seidlitzia rosmarinus. Qom Univ Med Sci J 2017;11(5):38-52. [Full Text in Persian]

مقدمه

در چند دهه اخیر، تهیه نانوذرات و مطالعه آنها توجه دانشمندان را در حوزه‌های گوناگون علوم بنیادی و کاربردی به خود جلب کرده است (۱). فناوری نانو به مفهوم مطالعه و توسعه مواد در مقیاس اتمی، مولکولی و ماکرومولکولی بوده که منجر به دستکاری واحدهای ساختمانی مواد و تبدیل آنها به مقیاس نانومتری (۱۰۰-۱ نانومتر) می‌شود (۲). نانوذرات، از آنجا که پلی بین حالت حجیم ماده و حالت اتمی یا مولکولی هستند، مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳). در سالهای اخیر، نانوذرات فلزی به دلیل کاربردهای متنوع در زمینه‌های مختلف، به‌طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته است (۴، ۵). در این بین، نانوذرات طلا بیشتر از سایر نانوذرات فلزی، توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است. عدم سمیت سلولی نانوذرات طلا برای بافت‌های سالم، سهولت در ساخت، اندازه هسته، نسبت سطح به حجم، انتقال و تنظیم فرآیندهای تحویل دارو؛ این نانوذرات را به کاندیدای مناسبی برای کاربردهای درمانی و تشخیصی تبدیل کرده است (۶). با توسعه و گسترش علوم مرتبط با فناوری نانو و روش‌های مبتنی بر تولید نانوذرات، نگرانی برای آلودگی محیط زیست و تولید محصولات جانبی خطرناک، دوچندان شده است (۷). روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی، سه روش اصلی و متداول از روش‌های تولید نانوذرات هستند (۸) که این روش‌ها، خود زیرشاخه دو روش اصلی تولید نانوذرات؛ یعنی روش بالا به پایین و پایین به بالا می‌باشند (۹). مهم‌ترین و رایج‌ترین روش در سنتز نانوذرات، روش کاهش شیمیایی بوده که در آن از کاهش نمک فلزات در حضور یک عامل کاهنده شیمیایی (مانند سدیم بورهیدرید، NaBH_4) برای کاهش یون‌های فلزی و یک تثبیت‌کننده (به عنوان مثال پلی وینیل پیرولیدون) برای کنترل رشد ذرات و جلوگیری از تجمع استفاده می‌شود (۱۰). اخیراً روش‌های زیستی مثل استفاده از قارچ‌ها (۱۱)، باکتری‌ها (۱۲)، توده زیستی و عصاره گیاهان (۱۳)؛ به دلیل ساده بودن، کم هزینه بودن، داشتن راندمان بالا، غیرسمی و سازگار با محیط زیست بودن، توجه ویژه‌ای را نسبت به سایر روش‌ها به خود اختصاص داده‌اند (۱۴). در زمینه تولید زیستی نانوذرات؛ استفاده از عصاره گیاهان علاوه بر دلایل ذکر شده، به دلیل دسترسی آسان، کامل بودن

واکنش، کوتاهی زمان واکنش، تولید نانوذرات با اشکال مختلف، یکنواخت و همگن بودن اندازه ذرات؛ اهمیت بیشتری یافته است (۱۵). در پژوهش‌های متعددی، سنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره گیاهان بیان شده است.

در مطالعات مربوط به سنتز نانوذرات طلا به وسیله گیاهان نیز تولید این نانوذرات از قارچ‌های خوراکی (۱۶)، زنجبیل (۱۷)، *Hibiscus rosa sinensis* (۱۸)، *Magnolia kobus* و *Diopyros kaki* (۱۹)، *Terminalia catappa* (۲۰) و *Averrhoa bilimbi* (۲۱) گزارش شده است.

گیاه اشنان با نام علمی *Seidlitzia rosmarinus* گیاهی است درختچه‌ای پایا با شاخه‌های سفیدرنگ که ارتفاع آن به ۱/۵ متر می‌رسد و از تیره *Chenopodiaceae* است (۲۲). در مطالعه حاضر به بیوسنتز نانوذرات طلا با استفاده از عصاره آبی این گیاه و تأثیر این نانوذرات بر روی چند گونه باکتری بیماری‌زای انسانی پرداخته شد. فاکتورهای مؤثر بر سنتز نانوذرات (مانند pH محیط واکنش، میزان عصاره، غلظت یون طلا (III)، دما و زمان واکنش) جهت به دست آوردن نانوذراتی یکنواخت‌تر و با اندازه کوچکتر مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بهینه کردن آنها از تکنیک اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی و برای مشخصه‌یابی از تکنیک میکروسکوب الکترونی عبوری (Transmission Electron Microscopy, TEM) استفاده گردید.

روش بررسی

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش، با بالاترین خلوص تهیه شدند. نمک طلا ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) از شرکت سیگما - آلد ریچ، سدیم هیدروکسید (NaOH) و هیدروکلریدریک اسید (HCl)، از شرکت مرک و باکتری‌های استفاده شده *Staphylococcus aureus* ATCC 2593، *Escherichia coli* ATCC 12290، *Enterococcus faecalis* ATCC 25922 و *Salmonella tifimurium* ATCC 12045 از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران (Persian Type Culture Collection, PTCC) تهیه گردید. در حین آزمایش برای ساختن تمامی محلول‌ها و شست‌وشو، از آب ۲ بار تقطیر استفاده شد.

گیاه اشنان، یکی از گیاهان دارویی و خودرو در مناطق کوهی ایران است (شکل شماره ۱). در این تحقیق، گیاه مورد نظر از استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شد. مقداری از نمونه تازه، پس از شست‌وشوی کامل و خشک کردن در دمای آزمایشگاه و به دور از نور آفتاب، به وسیله آسیاب برقی آزمایشگاهی کاملاً پودر شد. ۱۰ گرم از پودر حاصل با ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب ۲ بار تقطیر را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد (حمام آب گرم) هم زده و حرارت داده شد. مخلوط حاصل پس از سرد شدن در دمای آزمایشگاه، به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲، صاف و برای حذف کامل ذرات معلق در آن، به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد.

جهت بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی عصاره آبی گیاه، همانند قبل، مقدار ۱۰ گرم از پودر گیاه با ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب ۲ بار تقطیر، مخلوط و پس از ۲۴ ساعت، عمل فیلتراسیون مطابق مرحله قبل انجام گرفت. پس از تخلیص و حلال‌زدایی، از عصاره آبی حاصل؛ غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با حلال DMSO (برای استفاده در آزمایش انتشار چاهکی در آگار) تهیه گردید. عصاره به دست آمده، به منظور سنتز نانوذرات (با غلظت ۱۰٪ وزنی - حجمی) و عصاره‌های حاصل برای بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی، در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.



شکل شماره ۱: گیاه اشنان (*Seidlitzia rosmarinus*).

ابتدا محلول نمک طلا (III)، از نمک آن با غلظت ۱ میلی‌مولار ساخته شد. سپس مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاه (با غلظت ۱۰٪ وزنی - حجمی) به ۴ میلی‌لیتر از محلول نمک طلا (III) ساخته شده، اضافه گردید. مقدار pH محلول حاصل به وسیله دستگاه pH متر (عدد ۴/۲۳)، قرائت شد. از محلول مورد نظر به وسیله اسپکتروفتومتر فرابنفش - مرئی (Jenway-6715) طیف‌گیری شد. همچنین به منظور دستیابی به نانوذراتی با مورفولوژی و اندازه مناسب، فاکتورهای مؤثر بر سنتز نانوذرات طلا {شامل: pH محیط واکنش، مقدار عصاره مصرفی، غلظت یون فلز طلا، دما و زمان واکنش}، بررسی و در انتها بهینه‌سازی شدند. همان‌طوری که در مرحله سنتز اولیه نانوذرات ذکر گردید، ابتدا با اعمال شرایط پیش فرض (اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر عصاره با غلظت ۱۰٪ وزنی - حجمی به ۴ میلی‌لیتر از محلول

نمک طلا با غلظت ۱ میلی‌مولار در اسیدیته اولیه محلول؛ یعنی pH=۵، در دمای اتاق و زمان لحظه مخلوط کردن) نانوذرات ساخته شد و سپس با تغییر هریک از پارامترها، تأثیر آنها بر سنتز نانوذرات بررسی گردید. جهت بهینه‌سازی در هر مرحله، تنها پارامتر مورد بررسی متغیر بوده و مابقی پارامترها ثابت بودند. جهت بهینه نمودن مقدار pH واکنش، ۷ سری محلول شامل: ۲ میلی‌لیتر عصاره و ۴ میلی‌لیتر محلول نمک طلا (III) با غلظت ۱ میلی‌مولار با pHهای ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ ساخته شد و طیف‌های جذبی تمامی آنها به وسیله اسپکتروفتومتر فرابنفش - مرئی به صورت جداگانه، گرفته و pH بهینه انتخاب گردید. برای تنظیم pH محلول از یکی از دو محلول سدیم هیدروکسید و یا هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۱ مولار استفاده شد.

جهت بهینه کردن میزان عصاره مصرفی نیز مقادیر ۴-۵/۰ میلی‌لیتر از عصاره به ۴ میلی‌لیتر محلول نمک طلا (III) با غلظت ۱ میلی‌مولار افزوده و pH واکنش برابر pH بهینه تنظیم شد. از تمامی محلول‌ها، طیف اسپکتروفتومتر فرابنفش - مرئی را به صورت جداگانه گرفته و در انتها حجم عصاره مصرفی بهینه انتخاب شد. برای بررسی تأثیر غلظت یون طلا (III) و بهینه کردن آن، مقدار بهینه‌شده حجم عصاره به ۴ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف محلول نمک طلا (III) (۵/۰، ۱، ۱/۵، ۲ و ۵/۲ میلی‌مولار)، اضافه و pH واکنش به pH بهینه رسانده شد. از محلول‌های ساخته‌شده، طیف اسپکتروفتومتر فرابنفش - مرئی گرفته شد و غلظت بهینه انتخاب گردید.

برای بهینه کردن دمای واکنش و تأثیر دما در روند سنتز نانوذرات طلا، محلول‌هایی با شرایط بهینه قبل، و به صورت جداگانه در دماهای ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۵ و ۶۵ درجه سانتیگراد ساخته شد. پس از طیف‌گیری به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی، دمای بهینه انتخاب گردید.

به منظور بهینه‌سازی زمان واکنش، محلولی با اعمال تمامی شرایط بهینه‌شده قبل، در زمانهای مختلف (از لحظه مخلوط تا ۳ ساعت بعد از ساختن نمونه با فاصله زمانی ۳۰ دقیقه)، ساخته شد و از هر کدام به صورت جداگانه، طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی گرفته شد و زمان بهینه انتخاب گردید.

به منظور تأیید نتایج به دست آمده از طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی، اندازه و شکل نانوذرات طلا سنتز شده به وسیله تکنیک میکروسکوپ الکترونی عبوری (Zeiss-EM10C-80 KV) مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه‌های باکتریایی با استفاده از محیط کشت لوریا برتانی و سابورد دکستروز و براساس روش‌های استاندارد، احیا شدند و برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی، از کشت ۲۴ ساعته هر میکروارگانیزم به صورت جداگانه به لوله‌های آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر مولر هینتون براث تلقیح شد و سوسپانسیونی با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند آماده گردید. بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره آبی گیاه اشنان با روش انتشار از چاهک در آگار (۲۳) انجام گرفت. بدین منظور از سوسپانسیون هر باکتری به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار ریخته و با

سواب استریل در سه جهت به صورت انبوه کشت داده شد. پس از آن در سطح هریک از پلیت‌های کشت داده‌شده، چاهک‌هایی به قطر تقریباً ۶ میلی‌متر و به فاصله ۲ سانتی‌متری از هم، ایجاد و درون هر چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر از هریک از رقت‌های آماده‌شده عصاره آبی (با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با سمپلر ریخته شد. از آنتی‌بیوتیک‌های ضدباکتریایی (آمپی‌سیلین، جنتامایسین و کوآموکسی‌کلاو؛ هر کدام با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، 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 انکوبه شدند و در نهایت، پس از گذشت ۴۸-۲۴ ساعت، کشت‌های باکتریایی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفتند و قطر هاله‌های تشکیل شده بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و گزارش شد.

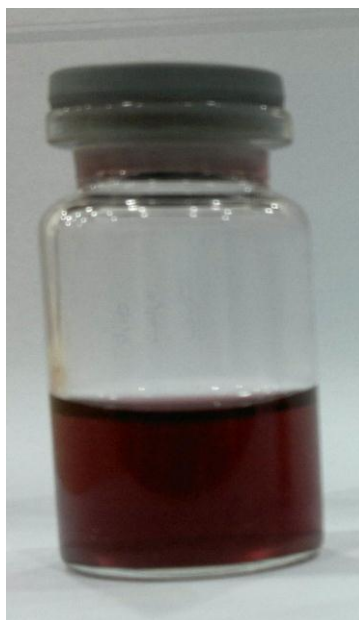
برای بررسی اثرات آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلا سنتز شده نیز از روش‌های انتشار چاهکی در آگار استفاده گردید. پس از تهیه محلول استوک نانوذرات طلا با اعمال تمامی شرایط بهینه‌شده، سری رقت‌های مورد استفاده برای تعیین هاله عدم رشد در روش انتشار از چاهک ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و محلول ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نمک طلا و آنتی‌بیوتیک‌های ضدباکتریایی (آمپی‌سیلین، جنتامایسین، کوآموکسی‌کلاو) به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. سایر مراحل انجام کار؛ مشابه نحوه آماده‌سازی محیط‌های کشت، سویه‌های باکتریایی استفاده‌شده و روش انجام؛ همانند روش‌های مورد استفاده در آزمایش مربوط به عصاره آبی گیاه بود.

یافته‌ها

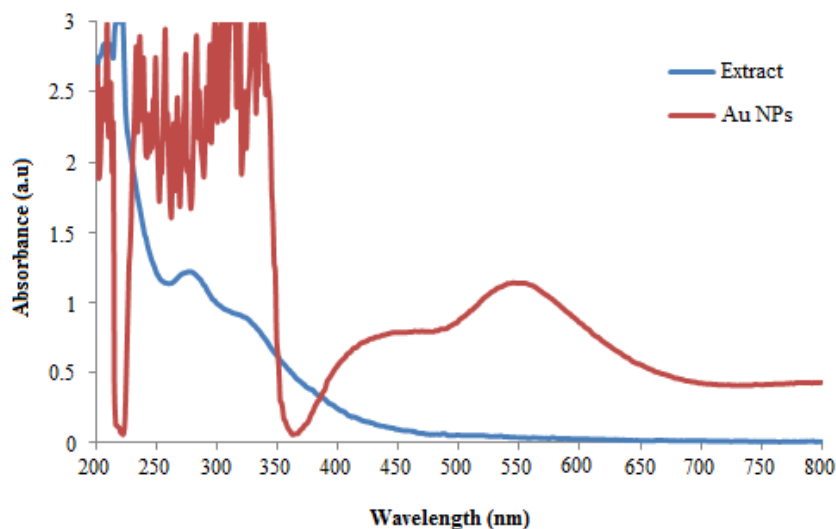
در سنتز اولیه نانوذرات طلا به وسیله گیاه، مشاهده گردید بلافاصله با مخلوط کردن عصاره و نمک طلا در اسیدیته اولیه، رنگ محلول به رنگ ارغوانی تغییر رنگ داده است که خود نشان‌دهنده سنتز موفق نانوذرات طلا بود (شکل شماره ۲). همچنین پس از طیف‌گیری از محلول مورد نظر، نانوذرات طلا در محدوده طول موج ۶۰۰ - ۵۰۰ نانومتر، بیشترین میزان جذب را دارا بود که مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا

به‌دست آوردن نانوذراتی با شکل یکنواخت‌تر و اندازه کوچک‌تر مورد بررسی قرار گرفت.

می‌باشد (نمودار شماره ۱). پس از آن پارامترهای مؤثر بر سنتز نانوذرات طلا {شامل: مقدار pH محلول واکنش، حجم عصاره مصرفی، غلظت نمک طلا (III)، دما و زمان انجام واکنش} جهت



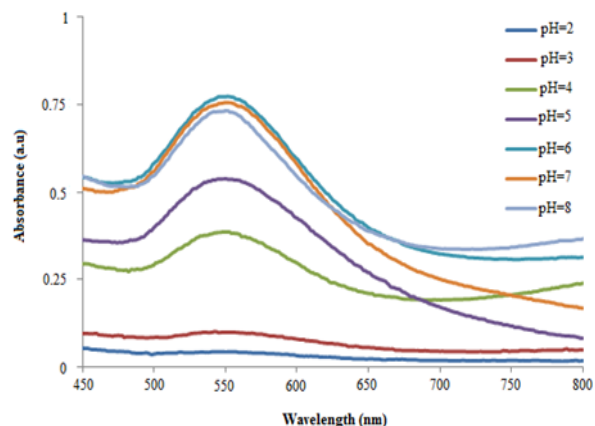
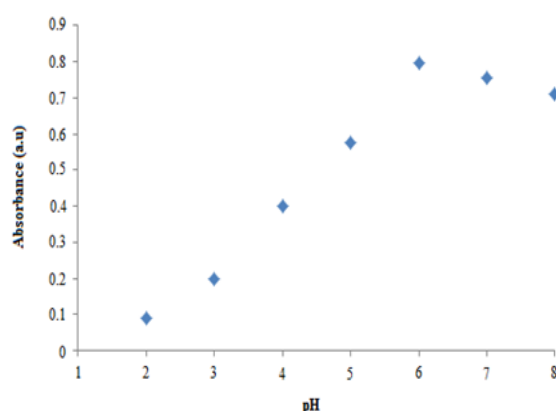
شکل شماره ۲: محلول ارغوانی‌رنگ نانوذرات طلا سنتز شده.



نمودار شماره ۱: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی عصاره آبی گیاه اشنان و محلول حاوی نانوذرات طلا.

به‌منظور بررسی تأثیر فاکتور مهم pH بر سنتز نانوذرات طلا، ۷ سری محلول pHهای بالاتر و کمتر (۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸) از pH اولیه، ساخته شد و از هریک از محلول‌ها به‌صورت جداگانه طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی گرفته شد (نمودار شماره ۲).

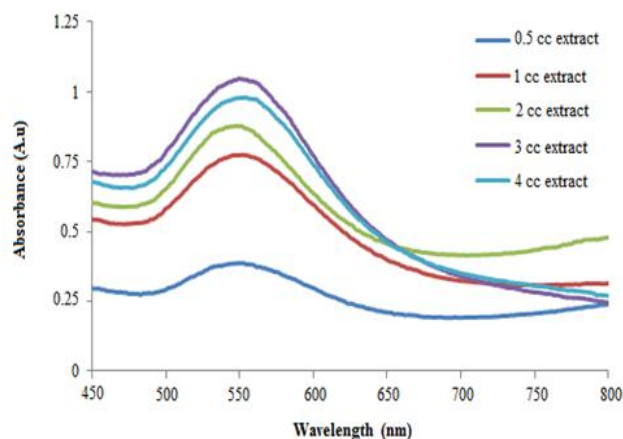
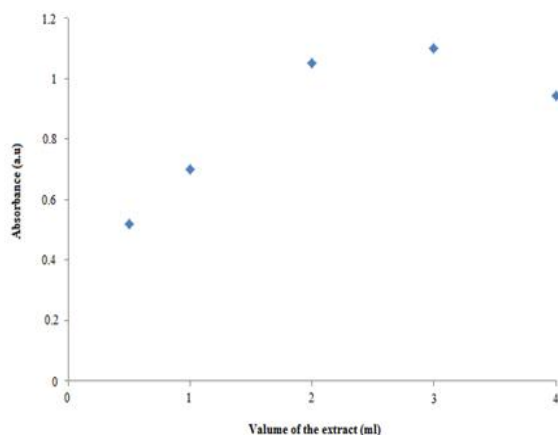
پس از مخلوط کردن ۲ میلی‌لیتر عصاره و ۴ میلی‌لیتر از نمک طلا با غلظت ۱ میلی‌مولار؛ رنگ محلول به رنگ ارغوانی تیره تغییر رنگ داد که این رنگ مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا و دلیلی بر سنتز موفق این نانوذرات می‌باشد. مقدار pH محلول حاصل به‌وسیله دستگاه pH متر، (عدد ۴/۲۳) قرائت شد.



نمودار شماره ۲: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا و روند تغییر در میزان جذب آنها در pHهای متفاوت.

همچنین، به منظور انتخاب میزان عصاره مصرفی بهینه، مقادیر ۴-۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره به ۴ میلی‌لیتر محلول نمک طلا با غلظت ۱ میلی‌مولار افزوده و اسیدیته واکنش نیز برابر ۶ تنظیم شد. از تمامی محلول‌های حاصل، به صورت مجزا طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی گرفته شد (نمودار شماره ۳).

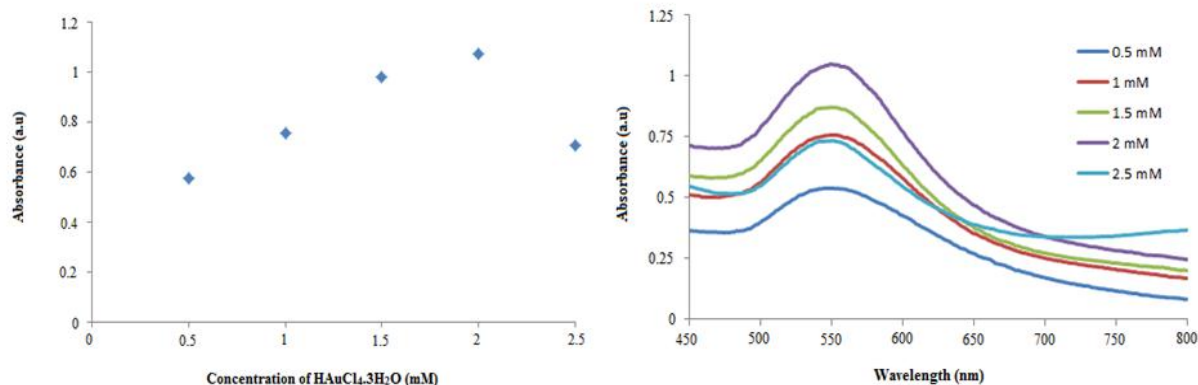
با توجه به نمودار شماره ۲ با افزایش pH تا ۶؛ جذب، افزایش و پس از آن کاهش یافت. ماکزیمم جذب مربوط به نانوذرات نقره در pH=۶ مشاهده گردید. در نتیجه این pH به عنوان اسیدیته بهینه انتخاب شد.



نمودار شماره ۳: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا و روند تغییر در میزان جذب آنها در حجم‌های مختلف از عصاره.

به منظور مطالعه تأثیر غلظت نمک طلا بر روی سنتز آن، ۵ سری محلول با غلظت‌های متفاوت (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌مولار) ساخته شد و از تمامی محلول‌ها به صورت جداگانه، طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی گرفته شد (نمودار شماره ۴).

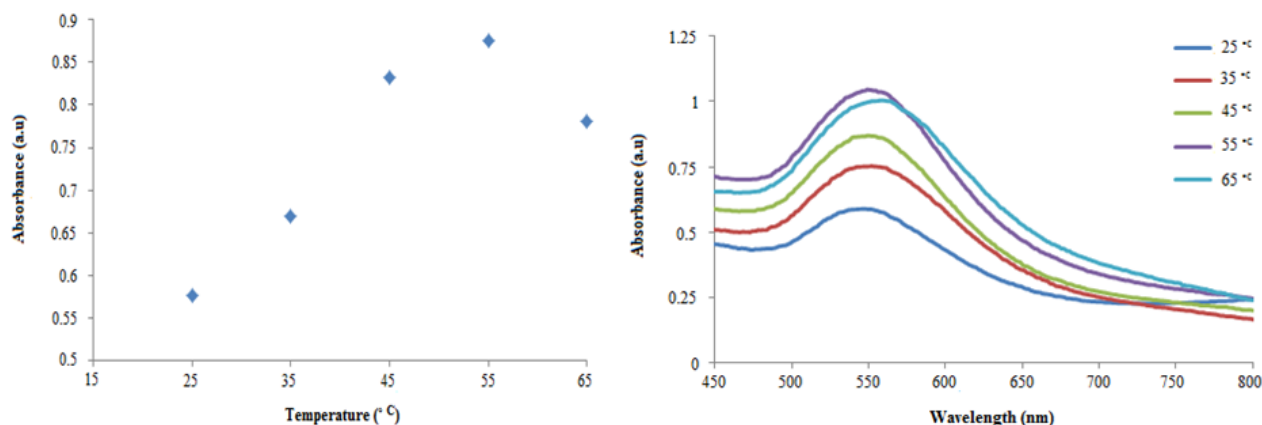
با افزایش تدریجی مقدار عصاره از ۰/۵-۳ میلی‌لیتر، مقدار جذب مربوط به نانوذرات طلا، افزایش چشمگیری داشت. لیکن در حجم ۴ میلی‌لیتر از عصاره، کاهش در مقدار جذب دیده شد. در نتیجه، مقدار ۳ میلی‌لیتر از عصاره به عنوان حجم عصاره بهینه‌شده انتخاب گردید.



نمودار شماره ۴: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا و روند تغییر در میزان جذب آنها در غلظت‌های متفاوت از نمک طلا.

در مطالعه حاضر، نانوذرات طلا در دمای اتاق نیز قابل سنتز بود. اما برای به‌دست آوردن نانوذراتی مناسب‌تر، دمای واکنش نیز بررسی و در نهایت، دمای بهینه انتخاب گردید. ابتدا محلول‌های مورد نظر براساس تمامی شرایط بهینه‌شده قبل، به‌صورت جداگانه در دماهای ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۵ و ۶۵ درجه سانتیگراد، ساخته شدند و سپس از تمامی نمونه‌ها به‌صورت جداگانه، طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی گرفته شد (نمودار شماره ۵).

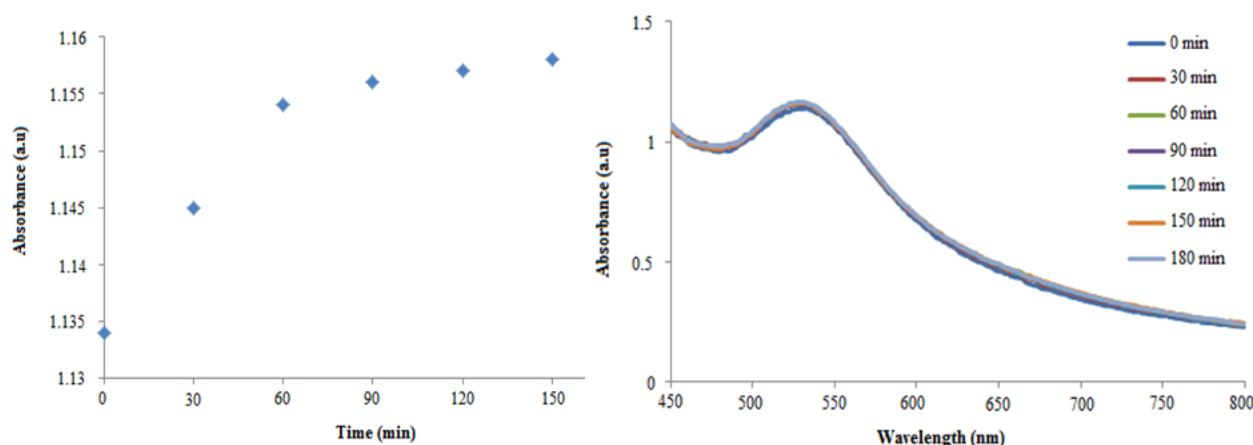
با توجه به نمودار شماره ۴؛ با افزایش تدریجی در میزان غلظت نمک طلا، جذب مربوط به نانوذرات طلا افزایش یافت. این روند افزایش تا غلظت ۲ میلی‌مولار ادامه داشت؛ لیکن در غلظت بیشتر از آن (۲/۵ میلی‌مولار)، کاهش چشمگیری در میزان جذب مشاهده گردید. در نتیجه، مقدار غلظت ۲ میلی‌مولار از نمک طلا به‌عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.



نمودار شماره ۵: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا و روند تغییر در میزان جذب آنها در دماهای مختلف.

با بررسی تأثیر زمان مجاورت محلول طلا (III) با عصاره، بر روند سنتز نانوذرات طلا مشخص گردید با افزایش زمان برهمکنش، مقدار جذب اندکی افزایش می‌یابد، اما این افزایش چشمگیر نیست (نمودار شماره ۶)، به‌طوری‌که از زمان ۶۰ دقیقه به بعد، تغییر محسوسی در مقدار جذب مشاهده نشد که این یافته، پایدار بودن نانوذرات حاصل را اثبات کرد. در نتیجه، زمان ۶۰ دقیقه به‌عنوان زمان بهینه انتخاب گردید.

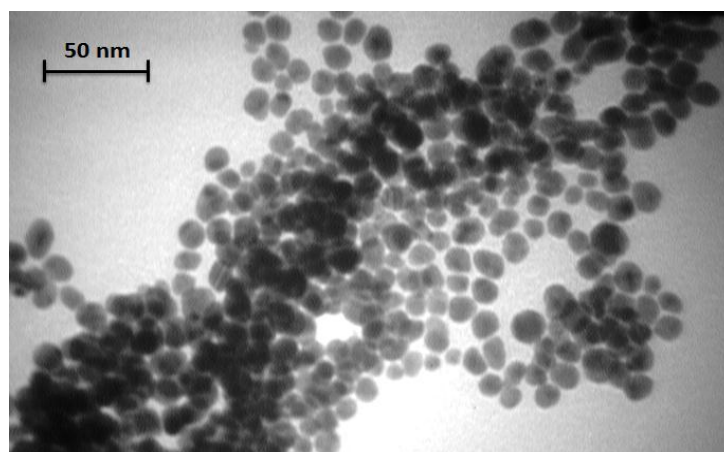
با افزایش دما، مقدار جذب به‌صورت چشمگیری افزایش یافت، اما این افزایش در میزان جذب خوانده‌شده تا دمای ۵۵ درجه سانتیگراد بود و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد، کاهش محسوسی در جذب دیده شد که می‌تواند به‌دلیل تجزیه و یا از بین رفتن تمامی و یا بخشی از ترکیبات طبیعی مؤثره در گیاه باشد. در نتیجه سنتز نانوذرات، کاهش یافت. دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به‌عنوان دمای مطلوب انتخاب گردید.



نمودار شماره ۲: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا و روند تغییر در میزان جذب آنها در زمانهای مختلف.

اعمال تمامی شرایط بهینه و انتخاب شده را نشان می‌دهد. در شکل، نانوذرات تولید شده همگی تقریباً کروی بوده و اندازه متوسط آنها بین ۱۸-۱۰ نانومتر می‌باشد.

شکل و اندازه نانوذرات تولید شده به وسیله تکنیک تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی گردید. شکل شماره ۳ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات طلا سنتز شده با



شکل شماره ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانوذرات طلا سنتز شده، با استفاده از عصاره آبی گیاه اشنان.

در آگار در جدول شماره ۱ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد عصاره، بیشترین تأثیر را روی باکتری *اشرشیاکلی* (قطر هاله ۲۱ میلی‌متر) داشته و کمترین اثر روی باکتری *سالمونلا تیفی* موریروم (قطر هاله ۱۶ میلی‌متر) بوده است.

نتایج بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی عصاره گیاه نشان داد عصاره، اثر باکتری کشی قابل ملاحظه‌ای بر روی تمامی باکتری‌ها دارد که با افزایش غلظت عصاره، این اثر مهار کنندگی بیشتر می‌شود. نتایج مربوط به اثر غلظت‌های مختلف عصاره با روش انتشار چاهکی

جدول شماره ۱: قطر هاله عدم رشد باکتریایی عصاره آبی گیاه اشنان با روش انتشار از چاهک در آگار (بر حسب میلی‌متر)

حلال (کنترل منفی) DMSO	آنتی بیوتیک های مورد استفاده (کنترل مثبت)			غلظت های مختلف عصاره آبی (میلی گرم بر میلی لیتر)					میکروارگانیزم
	کوآموکسی کلاو (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر)	جنتامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر)	آمپی سیلین (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر)	۴۰۰	۲۰	۱۰	۰	۲۵	
۰	۲۵	۲۷	۲۵	۲۰	۱۷	۱۴	۱۲	۱۰	استافیلوکوکوس اورئوس
۰	۲۶	۲۸	۲۷	۲۱	۱۸	۱۵	۱۳	۱۱	اشرشیاکلی
۰	۲۳	۲۶	۲۶	۱۷	۱۵	۱۳	۱۰	۹	انترکوکوس فکالیس
۰	۱۹	۲۵	۲۵	۲۶	۱۵	۱۱	۹	۷	سالمونلا تیفی موریوم

نانوذرات طلائی تولید شده، اثر آنتی‌باکتریایی چشمگیری بر روی نمونه‌های مورد آزمایش داشت؛ به گونه‌ای که در غلظت‌های بسیار پایین نیز از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کرد. این در حالی است که عصاره آبی گیاه در غلظت‌های استفاده شده مربوط به نانوذرات، اثر آنتی‌باکتریایی به نسبت کمتری داشت.

همچنین اثر آنتی‌باکتریایی محلول حاوی نمک طلا در مقایسه با عصاره و نانوذرات تولید شده از آن، به مراتب کمتر بود. نتایج نشان داد نانوذرات طلا، بیشترین تأثیر را بر روی باکتری *اوترکوکوس فکالیس* (قطر هاله ۲۴ میلی‌متر) و کمترین اثر را بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (قطر هاله ۱۹ میلی‌متر) داشته است (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: قطر هاله عدم رشد میکروبی نانوذرات طلا با روش انتشار از چاهک در آگار (بر حسب میلی‌متر)

میکروارگانیزم‌ها	غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا (میکروگرم بر میلی‌لیتر)					آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به همراه محلول یونی نمک طلا (III) (کنترل مثبت)		
	۱۰	۲۰	۴۰	۶۰	۱۰۰	محلول نمک طلا (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)	آمی سیلین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)	جنتامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۶	۹	۱۲	۱۶	۱۹	۴	۲۱	۲۴
<i>اشرشیاکلی</i>	۹	۱۱	۱۳	۱۶	۲۰	۵	۲۲	۲۳
<i>اوترکوکوس فکالیس</i>	۱۱	۱۳	۱۶	۱۹	۲۴	۸	۲۵	۲۵
<i>سالمونلا تیفی موربوم</i>	۱۰	۱۲	۱۴	۱۸	۲۳	۷	۲۴	۲۱

اثر حلال DMSO (کنترل منفی)، برای تمامی میکروارگانیزم‌های مورد استفاده، صفر می‌باشد.

در مطالعه حاضر فعالیت آنتی‌باکتریایی عصاره آبی گیاه اشنان و نانوذرات طلائی سنتز شده از آن بر روی ۴ باکتری صورت گرفت و مشخص گردید نانوذرات در غلظت‌های مربوطه دارای قدرت مهارکنندگی بیشتری نسبت به عصاره و محلول نمک طلا می‌باشند. میزان اثر آنتی‌باکتریایی عصاره و نانوذرات طلا وابسته به غلظت بود.

بحث

pH یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر بر سنتز نانوذرات طلا می‌باشد (۲۴). پیش از این نیز گزارش‌هایی مبنی بر تأثیر pH بر روی چگونگی تشکیل نانوذرات به ثبت رسیده است. گزارش‌ها حاکی از آن است که pH بر روی شکل نانوذرات، تأثیر چشمگیری ندارد و اندازه آنها را به میزان زیاد، تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۵، ۲۶). در مطالعه حاضر، با توجه به یافته‌های مربوط به بهینه pH=۲، تغییر قابل‌ملاحظه‌ای در جذب مشاهده نشد؛ به گونه‌ای که می‌توان ادعا کرد سنتز قابل توجه‌ای صورت نگیرد، اما با افزایش تدریجی میزان pH محلول تا ۶، جذب محلول حاصل افزایش یافت که مربوط به افزایش در میزان سنتز نانوذرات بود. اما در pH‌های بالاتر از pH=۶، کاهش اندکی در میزان جذب نانوذرات مشاهده شد.

این گونه به نظر می‌رسد که در pH بالای ۶ (pH مساوی ۷ و ۸)، یون‌های طلا هیدرولیز شده؛ به گونه‌ای که موجب به وجود آمدن گونه‌های پایدار هیدروکسیدهای یون طلا می‌شوند که در انتها از ورود این یون به واکنش احیای بیولوژیکی و زیستی ممانعت می‌شود (۲۵). در pH مساوی ۷ و ۸، طیف جذبی تقریباً پهن‌تر شده که این پدیده مربوط به سنتز نانوذرات با اندازه بزرگتر، به دلیل اتصال نانوذرات به یکدیگر است. پیش از این، پهن شدن طیف‌ها در اثر افزایش اندازه نانوذرات گزارش شده بود (۲۷). در نتیجه، مقدار pH=۶ به عنوان اسیدیته بهینه انتخاب گردید. ذاکری و همکاران در مطالعه‌ای بر روی سنتز نانوذرات طلا به وسیله گندم در یک روش وابسته به pH، گزارش کردند بهترین اسیدیته جهت سنتز نانوذرات طلا، در pH‌های اسیدی بوده که این مورد با یافته‌های این تحقیق کاملاً مطابقت داشت (۲۸). در سنتز نانوذرات به وسیله عصاره گیاهان؛ عصاره، نقش کاهندگی و احیا کردن یون‌های فلزی، همچنین پایدار کردن این نانوذرات را ایفا می‌کند (۲۹). ترکیبات ثانویه گوناگون، آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و یا دیگر عوامل کاهنده (ترکیبات آنتی‌اکسیدانی) در تهیه نانوذرات فلزی به وسیله گیاهان، نقش اساسی دارند (۳۰).

گیاه اشنان نیز دارای ترکیبات مؤثره فراوانی همچون ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، فنل‌ها، کتون‌ها، ترکیبات ترپنی و...، است که هریک از این ترکیبات در احیای یون‌های فلزی و تثبیت نانوذرات سنتز شده، نقش به‌سزایی دارند (۳۱). گزارشها نشان می‌دهد با افزایش مقدار عصاره، میزان ترکیبات طبیعی مؤثره موجود در گیاه افزایش یافته و نانوذرات بیشتری تولید و جذب نیز افزایش می‌یابد (۳۲). Castro-Longoria و همکاران نشان دادند در سنتز زیستی نانوذرات، نسبت حجمی عصاره و نمک فلزی، تأثیر به‌سزایی در تولید و پایداری نانوذرات حاصل دارد. آنها بهترین نسبت را نسبت ۳:۷ عصاره و نمک گزارش کردند (۳۳). یافته‌های مربوط به انتخاب حجم عصاره مورد نیاز در این پژوهش نیز این گزارشها را تأیید می‌کند. همچنین مطالعات نشان می‌دهد در غلظت‌های کمتر از میزان بهینه، عمل احیاکنندگی و پایدارسازی نانوذرات به‌صورت کامل اتفاق نیافتاده و نانوذرات به میزان کمتر و با اندازه درشت‌تری به دست می‌آید. همچنین با افزودن مقدار بیشتری از میزان بهینه، ذرات پایدarkerکننده به دور خود بیشتر تجمع کرده که این عمل موجب می‌گردد تا پایدارسازی به‌طور کامل انجام نشده و ذراتی با اندازه درشت‌تر به دست آید. پژوهش‌ها حاکی از آن است که با افزایش در اندازه نانوذرات و میزان جذب کاهش یافته و متقابلاً با افزایش در توزیع ذرات، پهنای طیف‌ها افزایش می‌یابد (۳۴). در نتیجه، روند افزایش جذب به تناسب افزایش میزان حجم عصاره در این تحقیق صعودی بود، اما در حجم ۴ میلی‌لیتر، کاهش محسوسی در میزان جذب مشاهده گردید. گزارشها نشان می‌دهد افزایش جذب در اثر افزایش غلظت یون فلزی به این دلیل است که یون‌ها بیشتر در معرض عمل کاهش قرار می‌گیرند و در نتیجه، نانوذرات بیشتری تولید خواهد شد (۳۵). در مطالعه‌ای مشابه، مشاهده گردید با افزایش غلظت از ۱ به ۳ میلی‌مولار از نمک فلزی، میزان جذب افزایش چشمگیری یافته است (۳۶). همچنین کاهش در میزان جذب در اثر افزایش بیش از حد غلظت یون فلزی، می‌تواند به دلیل چسبندگی نانوذرات به هم و سنتز نانوذراتی با اندازه کمی بزرگتر باشد (۳۷). لذا در مطالعه حاضر، غلظت ۲ میلی‌مولاری از نمک طلا، به‌عنوان غلظت مناسب جهت سنتز نانوذرات انتخاب شد که با مقالات مشابه کاملاً همخوانی داشت.

مطالعات نشان داده است دمای واکنش، اثر مهمی بر میزان جذب خوانده‌شده و اندازه نانوذرات سنتز شده دارد؛ به‌طوری‌که با افزایش دما، میزان جذب افزایش، ولی اندازه نانوذرات کاهش می‌یابد (۳۸،۳۹). با افزایش دما، احتمال و سرعت برخورد مولکول‌های احیاکننده و تثبیت‌کننده با یون‌های فلزی افزایش می‌یابد؛ به‌گونه‌ای که به محض برخورد، عمل احیا و تثبیت بلافاصله انجام گرفته و فرصتی برای اتصال نانوذرات به یکدیگر و تولید نانوذرات با اندازه درشت‌تر نیست (۴۰). پیش از این گزارش شده بود که در افزایش بیش از حد دما، احتمال تخریب ترکیبات مؤثره موجود در گیاه افزایش می‌یابد (۴۱). Yong Song و همکاران نیز گزارش کردند با افزایش دما از ۲۵-۹۵ درجه سانتیگراد، در مقدار جذب مربوط به نانوذرات، ابتدا افزایش چشمگیر بوده، اما در انتها این افزایش کاملاً ناچیز و در نهایت، کاهش در میزان جذب مشاهده می‌شود (۴۲). لذا در مطالعه حاضر، دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به‌عنوان دمای مناسب انتخاب شد که این انتخاب با دلایل ذکر شده در مقالات مشابه کاملاً مطابقت داشت. زمان نیز یکی از فاکتورهای مؤثر بر سنتز و پایداری نانوذرات است. با توجه به یافته‌های این پژوهش؛ زمان بهینه، ۶۰ دقیقه انتخاب شد. در مطالعه‌ای مشابه، در واکنشی وابسته به زمان در سنتز نانوذرات، Ramteke و همکاران گزارش کردند با افزایش زمان از لحظه شروع واکنش تا ۱۲۰ دقیقه بعد از آن، از زمان ۶۰ دقیقه به بعد، تغییر محسوسی در مقدار جذب مربوط به نانوذرات مشاهده نمی‌شود. بنابراین زمان ۶۰ دقیقه، زمان مناسبی است که این یافته کاملاً با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت (۴۳). تاکنون مطالعات متعددی جهت تعیین مکانیسم اثر نانوذرات بر روی باکتری انجام شده است. همچنین پژوهش‌های بسیاری مبتنی بر واکنش‌های احتمالی بین نانوذرات با ماکرومولکول‌های موجودات زنده نشان می‌دهد اختلاف بین بار منفی میکروارگانیزم و بار مثبت نانوذرات فلزی، به‌صورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذرات عمل کرده و باعث اتصال نانوذرات به سطح سلول و در نتیجه منجر به مرگ سلول می‌شود (۴۴). همچنین تشکیل کلنی، رشد سلول باکتری و تشکیل ماتریکس‌های فیلم زیستی فشرده میکروبی باعث ایجاد عفونت می‌شوند و نانوذرات از تشکیل این عامل‌های دفاعی

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر، اولین گزارش سنتز زیستی و بیولوژیکی نانوذرات طلا با استفاده از عصاره آبی گیاه اشنان در یک مسیر سنتزی آسان، مقرون به صرفه و دوستدار محیط زیست می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد هریک از پارامترهای مؤثر بر سنتز نانوذرات، چه نقش‌هایی در چگونگی سنتز نانوذرات داشته و با توجه به ایمن بودن روش‌های زیستی از لحاظ بهداشتی و محیط زیست، طبیعتاً برای مصارف پزشکی مناسب‌تر خواهند بود. بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاه و نانوذرات طلائی سنتز شده از آن، حاکی از آن است که عصاره، فعالیت ضد میکروبی قابل قبولی داشته و هنگامی که طلا در ابعاد نانومتریکی خود قرار دارد، اثر آنتی‌باکتریالی آن به صورت چشمگیری افزایش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند، مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به همکاران محترم آزمایشگاه تحصیلات تکمیلی فیتوشیمی، مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی دانشگاه سیستان و بلوچستان در جهت اجرا و اتمام این پژوهش اعلام نمایند. همچنین از زحمات جناب مهندس مجتبی حسین‌پور کارشناس محترم آزمایشگاه نانوتکنولوژی دانشگاه خواجه نصیرالدین طوسی جهت تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

میکروب‌ها در برابر سامانه ایمنی سلول میزبان جلوگیری می‌کنند (۴۶،۴۵). مطالعات مختلفی در مورد اثرات ضد میکروبی نانوذرات فلزی، به خصوص نانوذرات طلا صورت گرفته است، این مطالعات نشان می‌دهند نانوذرات طلا بر هر دو گونه باکتری گرم مثبت و منفی اثر می‌گذارد، اما این اثر بر روی باکتری گرم منفی، کمی بیشتر از گرم مثبت است (۴۷). برخی از نتایج تحقیقات نیز حاکی از کم اثر بودن نانوذرات طلا بر روی باکتری *اشرشیاکلی* بوده است (۴۸). مطالعات دیگری نیز نشان می‌دهد غلظت نانوذرات طلائی مورد استفاده بر خاصیت ضد میکروبی باکتری‌ها مؤثر است (۴۹). Grace و همکاران (سال ۲۰۰۷) اعلام کردند غلظت ۰/۵ میلی‌مولار از نانوذرات طلا، تأثیر خیلی زیادی بر روی باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *میکروکوکوس لوتئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* ندارد (۵۰). در یک مطالعه با بررسی تأثیر نانوذرات طلا، روی و نقره بر روی باکتری‌های بیماری‌زا، گزارش کردند تأثیر ضد میکروبی نانوذرات طلا به مراتب کمتر از روی و نقره است. در مطالعه‌ای دیگر مشاهده گردید نانوذرات طلا در غلظت‌های بالاتر، اثر ضد میکروبی خوبی بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* داشته است (۵۱). عبداللهی و همکاران در پژوهشی دیگر اعلام کردند تأثیر ضد میکروبی نانوذرات طلا در غلظت‌های کم بر روی هیچ‌کدام از ایزوله‌ها مشاهده نشده، ولی می‌توان عنوان کرد نانوذرات طلا نسبت به سایر نانوذرات فلزی دیگر، تأثیر کمتری بر روی *هلیکوباکتر پیلوری* دارد (۵۲).

References:

- McNeil SE, Leukoc J. Nanotechnology for the Biologist. J Leukoc Biol 2005;78(3):585-94.
- Wang S, Chen T, Chen R, Hu Y, Chen M, Wang Y. Emodin loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, characterization and antitumor activity studies. Int J Pharm 2012;430(1-2):238-46.
- Kaushik Thakkar N, Snehit Mhatre S, Rasesh Parikh Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine 2010;6(2):257-62.
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. Microbial resistance to metal in the environment. Ecotoxicol Environ Saf 2000;45(3):198-207.
- Beveridge TJ, Hughes MN, Lee H, Leung KT, Poole RK, Savvaidis I, et al. Metal-microbe interactions: Contemporary approaches. Adv Microb Physiol 1997;38:177-243.

6. Faghri Zenouz N, Saloutiti M, Doulatyari L. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Streptomyces* sp.ERI-3. *Biotechnol Tarbiat Modares Univ* 2012;3(1):15-22. [Full Text in Persian]
7. Supraja S, Chakravarthy N, Sagadevan K. Green synthesis of silver nanoparticles from *cynodon dactylon* leaf extract. *J Chem Tech Res* 2013;5(1):271-77.
8. Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, et al. Silver colloid nano-particles: synthesis, character-ization, and their antibacterialactivity. *J Phys Chem B* 2006;110:16248-53.
9. Azizian Shermeh O, Valizadeh J, Noroozifar M, Ghasemi A, Valizadeh M. Optimization, characterization and anti microbial activity of gold nano particles biosynthesized using aqueous extract of *Sambucus ebulus* L. *Eco-phytochemical J Med Plants* 2016;4(1):1-18. [Full Text in Persian]
10. Ramezani F, Kazemi B, Jebali A. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Leishmania* sp. *N Cellular Molecular Biotechnol J* 2013;3(9):107-111. [Full Text in Persian]
11. Gajbhiye M, Kesharwani J, Ingle A, Gade A, Rai M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activeity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine* 2009;5(4):382-6.
12. Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi AA. Rapid synthesis of silver nanoparticles using cultureesupernatants of *Enterobacteria*: A novel biological approach. *Process Biochem* 2007;42(5):919-23.
13. Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core Ag shell nanoparticles using *Neem* (*Azadirachta indica*) leaf broth. *J Colloid Interface Sci* 2004;275(2):496-502.
14. Mohasseli T, Pourseyedi Sh. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of *Sesamum indicum* seeds. *Biotechnol Tarbiat Modares Univ* 2015;6(1):10-20. [Full Text in Persian]
15. Azizian Shermeh O, Valizadeh J, Noroozifar M, Qasemi A. Investigation the antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesis by aqueous extract of *Sambucus ebulus* L. *J Ilam Univ Med Sci* 2016;25(4):92-108. [Full Text in Persian]
16. Philip D. Biosynthesis of Au, Ag and Au–Ag nanoparticles using edible mushroom extract. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2009;73(2):374-81.
17. Praveen Kumar K, Paul W, Chandra P, Sharma P. Green synthesis of gold nanoparticles with *Zingiber officinale* extract: Characterization and blood compatibility. *Process Biochem* 2011;46(10):2007–13.
18. Vijayaraghavana K, Mahadevana A, Sathishkumara M, Pavagadhia S, Balasubramaniana R. Biosynthesis of Au(0) from Au(III) via biosorption and bioreduction using brown marine alga *Turbinaria conoides*. *Chem Eng J* 2011;167(1):223–27.
19. Jae Yong Song, Hyeon-Kyeong Jang, Beom Soo Kim. Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts. *Process Biochem* 2009;44(10):1133–8.
20. Ankamwar B. Biosynthesis of gold nanoparticles (Green-Gold) using leaf extract of *terminalia catappa*. *E-Journal Chem* 2010;7(4):1334-39.
21. Rimal Isaac SR, Sakthivel G, Murthy Ch. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Averrhoa Bilimbi* fruit extract. *J Nanotechnol* 2013;128(5):89-101.
22. Ahmadi M, Fata A, Khamesipour A, Rakhshandeh H, Miramin Mohamadiu A, Selehi Gh, et al. The efficacy of hydro alcoholic extract of *Seidlitzia rosmarinus* on treatment of experimental zoonotic leishmaniasis in murine model. *Avecina J Phytomed* 2014;4(6):385-91.
23. Nasiri Semnani Sh, Rahnema M, Ghasempour H, Alizadeh H. Evaluation of antibacterial effects of *Lecanora muralis* SP. Extract on *Staphylococcus ayreus* and *Salmonella typhimurium* in in-vitro and in animal model. *J Fasa Univ Med Sci* 2014;4(3):318-26. [Full Text in Persian]

24. Waghmar SS, Deshmukh AM, Sadowski Z. Biosynthesis, optimization, purification and characterization of gold nanoparticles. *African J Microbiol Res* 2014;8(2):138-46.
25. Gardea-Torresdey JL, Tiemann KJ, Gamez G, Dokken K, Tehuacanero S, Jose-Yacamán M. Gold Nanoparticles Obtained by Bio-Precipitation from Gold(III) Solutions. *J Nanoparticl Res* 1999;1(3):397.
26. Armendariz V, Herrera I, Peralta-Videa JR, Jose-Yacamán M. Size controlled gold nanoparticle formation by *avena sativa* biomass: use of plants in nanobiotechnology. *J Nanoparticl Res* 2004;6(4):377.
27. Shenya DS, Mathewa J, Philip D. Phytosynthesis of Au, Ag and Au–Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of *Anacardium occidentale*, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2011;79(1):254-62.
28. Zakeri M., Fassihi J. Production of nanogold particles by biomass (wheat) and investigation on effective parameters. *Iranian J Chem Chem Eng* 2011;2(61):35-41.
29. Philip D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosasinensis*. *Physica E* 2010;42(5):1417–24.
30. Beyrami Miavaghi M, Pourakbar L. Phytosynthesis of silver nanoparticles by medicinal plant *Malva neglecta*. *Qom Univ Med Sci J* 2016;10(3):38-44. [Full Text in Persian]
31. Emad A, Gheybi f, Rasouli S M, Khanzadeh R, Mohammadi Jozani S. Herbalist industrial *Seidlitzia rosmarinus*. Tehran: Pouneh; 2012. [Full Text in Persian]
32. Prabha Dubeya Sh, Lahtinen M, Sillanpää M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. *Process Biochem* 2010;45(7):1065–71.
33. Castro-Longoria E, Alfredo R. Vilchis-Nestor B, Avalos-Borja M. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;83(1):42-8.
34. Foroghi Rad S, Khatibzadeh M. Green synthesis of silver nano particles for conductive inks, using sonochemical technique. *Iranian J Chem Chem Eng* 2015;1(34):1-9. [Full Text in Persian]
35. Dwivedi AD, Gopal K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Coll Surf A: Physicochem Eng Aspect* 2010;369(1-3):27–33.
36. Vinod VT, Saravanan P, Sreedhar B, Devi DK, Sashidhar RB. A facile synthesis and characterization of Ag, Au and Pt nanoparticles using a natural hydrocolloid gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*). *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;83(2):291-8.
37. Mock JJ, Barbic M, Smith DR, Schultz DA, Schultz S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J Chem Phys* 2002;116:6755-59.
38. Rai A, Singh A, Ahmad A, Sastry M. Role of halide ions and temperature on the morphology of biologically synthesized gold nanotriangles. *Langmuir* 2006;22(2):736-41.
39. Wiley BJ, Im SH, Li ZY, McLellan J, Siekkinen A, Xia Y. Maneuvering the surface plasmon resonance of silver nanostructures through shape-controlled synthesis. *J Phys Chem B* 2006;110(32):15666-75.
40. Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B. Green synthesis of silver nanoparticles using *polyalthia longifolia* leaf extract along with d-sorbitol: study of antibacterial activity. *J Nanotechnol* 2011;(2011):1-5.
41. Basiri Sh. Investigation of the effect of temperature and air velocity in the dryer on the amount and quality of essential oil of *Thymus*. *J Food Sci Technol* 2011;3(4):75-85. [Full Text in Persian]
42. Yong Song J, Hyeon-Kyeong J, Kim BS. Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts. *Process Biochem* 2009;44(10):1133–38.
43. Ramteke Ch, Chakrabarti T, Ketan Sarangi B, Pandey RA. Synthesis of silver nanoparticles from the aqueous extract of leaves of *Ocimum sanctum* for Enhanced antibacterial activity. *J Chem* 2013(2013):1-7.

44. Lin DH, Xing BS. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environ Pollut* 2007;150(2):243-50.
45. Jones GL, Muller CT, O'Reilly M, Stickler DJ. Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. *J Antimicrob Chemother* 2006;57(2):266-72.
46. Amanda S, Mohammad F, John J, Schlager D, Syed A. Metal-Based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2010;2(5):544-68.
47. Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Tchc M, Kalaichelvan PT, et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: A study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 2010;6(1):103-9.
48. Cho KJ, Park T, Osaka S. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta* 2005;51(6):956-60.
49. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interf Sci* 2004;275(1):177-82.
50. Grace AN, Pandian K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles: A brief study. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2007;297(1-3):63-70.
51. Nazari ZE, Banoe M, Sepahi AA, Rafii F, Shahverdi AR. The combination effects of trivalent gold ions and gold nanoparticles with different antibiotics against resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Gold Bull* 2012;45(2):53-9.
52. Abdollahi H, Javadi H, Zand Monfared MR. Synthesis of gold nanoparticles and study of their antimicrobial effects study on *Helicobacter pylori*. *Qom Univ Med Sci J* 2014;8(2):44-50. [Full Text in Persian]