

## بهینه‌سازی، مشخصه‌یابی و فعالیت آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلائی بیوستتز شده با استفاده از عصاره آبی گیاه *Sambucus ebulus* L.

امید عزیزیان شرمه<sup>۱\*</sup>، جعفر ولیزاده<sup>۲</sup>، میثم نوروزی فر<sup>۳</sup>، علی قاسمی<sup>۴</sup>، محرم ولیزاده<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران  
<sup>۲</sup> دانشیار، عضو هیأت علمی گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران  
<sup>۳</sup> استاد، عضو هیأت علمی گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران  
<sup>۴</sup> مربی، عضو هیأت علمی گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران  
<sup>۵</sup> استادیار، عضو هیأت علمی گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۳

### چکیده

گیاهان به‌عنوان منابع پایدار و دسترس در تهیه نانوذرات زیست سازگار در سال‌های اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. هدف از مطالعه حاضر بهینه‌سازی و مشخصه‌یابی و بیوستتز نانو ذرات طلا با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه آقظی (*Sambucus ebulus* L.) می‌باشد. پس از آماده کردن 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 عصاره، یون‌های طلا (III) را به اتم‌های طلا در ابعاد نانومتری کاهش داده و بلافاصله رنگ محلول به رنگ بنفش تغییر داد. به‌منظور دستیابی به نانوذرات طلا با شکل و اندازه یکنواخت، پارامترهای موثر بر سنتز، نظیر pH محیط واکنش، حجم عصاره، غلظت نمک طلا، دما و زمان واکنش مورد مطالعه قرار گرفت و تمامی پارامترها با استفاده از اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی بهینه شدند. برای مشخصه‌یابی نانوذرات از تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و پراش پرتو ایکس (XRD) استفاده شد. در نهایت خواص آنتی‌باکتریایی نانوذرات بر روی ۴ گونه باکتری بیماری‌زا استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، اشرشیا کلی و سالمونلا اینترتیندیس) با روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت و به‌صورت قطره‌اله عدم رشد گزارش شد. نتایج نشان دادند که نانو ذرات طلا کروی بوده و علاوه بر اینکه حداکثر جذب را در ۵۳۴ نانومتر دارند، با میانگین اندازه بین ۱۷-۱۱ نانومتر از فعالیت آنتی‌باکتریایی نسبتاً خوبی نیز علیه باکتری‌های برخوردارند.

واژه‌های کلیدی: آقظی، آنتی‌باکتریایی، بیوستتز، نانوذرات طلا، *Sambucus ebulus* L.

یا عقب پدید آید (Nejati and Davari, 2009). اما با رجوع به تاریخچه علم مواد، می توان چنین گفت که علم ذرات فلز، با آزمایش های مایکل فاراده آغاز شد گزارشات نشان می دهند که نانوذرات طلا نخستین بار به روش احیاء شیمیایی، با ابعاد ۳۰-۳ نانومتر از احیای محلول تتراکلوآئورات ( $\text{HAuCl}_4$ ) توسط فسفر ایجاد شده است (Tajarrodi and Kiazadeh, 2007). مهمترین ویژگی نانو ذرات طلا این است که، با اندازه های مختلف به رنگ های متفاوت دیده می - شوند (Louis and Pluchery, 2012). به طور کلی می توان روش های سنتز نانوذرات را به دو روش بالا به پایین و پایین به بالا تقسیم کرد. در روش نخست، ذرات طی مراحل فیزیکی نظیر آسیاب شدن بدست می آیند و در روش دوم، سنتز ذرات با روش های الکتروشیمی، سنتز فاز بخار، روش فتولیز، کاهش شیمیایی و غیره انجام می گیرد (Tiwari et al., 2008). مهمترین و رایج ترین روش در سنتز نانوذرات، روش کاهش شیمیایی می باشد که در آن از کاهش نمک فلزات در حضور یک عامل کاهنده شیمیایی به عنوان مثال سدیم بور هیدرید ( $\text{NaBH}_4$ ) برای کاهش یون های فلزی و یک تثبیت کننده به عنوان مثال پلی وینیل پیرولیدون (PVP) برای کنترل رشد ذرات و جلوگیری از تجمع استفاده می شود (Ramzani et al., 2013). روش های معمول ساخت نانوذرات گران قیمت هستند و آلودگی های زیست محیطی ناشی از تولید نانوذرات و محصولات جانبی آنها ایجاد می گردد (Mukkerjee et al., 2001; Shanker et al., 2004). فناوری نانو امروزه شاهد تغییرات و پیشرفت های چشمگیری در سنتز نانوذرات بوده است. روش های زیستی بی خطر را می توان برای سنتز نانوذرات بجای روش های قبل جایگزین نمود. میکروارگانیسم ها و گیاهان به علت دارا بودن ترکیبات معدنی و آلی موجود در خود، هنگامی که در معرض

در سال های اخیر تلاش های بسیار زیادی برای تولید نانوذرات به دلیل خواص ویژه شیمیایی، نوری و الکتریکی آنها صورت گرفته است که مؤید استفاده های گوناگون این مواد در زمینه هایی چون کاتالیست، اپتیک، داروهای زیستی، مغناطیس و غیره می باشد (Shah Mirzaee and Pazoki, 2007). فناوری نانو اصطلاحاً به طراحی، بررسی خصوصیات، تولید و استفاده از ساختارها، ابزار و سیستم هایی با کنترل شکل و اندازه در مقیاس نانومتریکی اطلاق می شود. خواص شیمیایی و فیزیکی نظیر خواص نوری و الکترونیکی نانوذرات با توجه به اندازه کوچک آنها (۱-۱۰۰ نانومتر) قابل تغییر است (Govindaraju et al., 2010). نانوذرات فلزی یکی از دسته های نانوذرات و نانو ساختارها را شامل می شوند که طبق تعریف عمومی، ذراتی از جنس فلز در ابعاد نانومتریکی هستند که جنس این نانوذرات می تواند از یک نوع فلز یا به صورت آلیاژی از دو یا چند فلز باشد. در میان نانو ساختارها، نانوذرات فلزی دارای اهمیت ویژه می باشند و این به علت تفاوت زیاد در برخی از خواص فیزیکی آن فلز، در دو حالت اتمی و توده می باشد. از جمله خواص جالب نانوذرات فلزی، بر همکنش آنها با نور است که از این خاصیت در شناسایی این نانوذرات استفاده می شود. یکی از انواع نانوذرات فلزی، نانوذرات طلا می باشند که از گذشته تاکنون مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. شاید بتوان شیشه گران قرون وسط را اولین افراد در سنتز و بکارگیری فناوری نانو دانست که با استفاده از روش های قدیمی برای رنگ دادن به شیشه هایشان استفاده می کردند. رنگدانه های تزئینی جام مشهور لیکرگوس در روم باستان نمونه ای از آنهاست که در آن از نانوذرات طلا استفاده شده است تا رنگ های متفاوتی از آن جام بر حسب نحوه تابش نور از جلو

عصاره لیمو را گزارش کردند (ستتزر نانوذرات طلا با مورفولوژی مثلثی و کروی در ابعاد  $214/4 \pm 4$  نانومتر نیز گزارش شده است (Narayanan and Sakthivel, 2011)). امروزه متأسفانه به علت وجود مقاومت دارویی، درمان بسیاری از بیماری‌های باکتریایی دچار مشکل شده است و بر همین اساس کشف راه‌های جدید برای مبارزه با این پاتوژن‌ها حائز اهمیت است. آنتی‌بیوتیک‌های جدید شناسایی شده که فعالیت مناسبی علیه باکتری‌های مقاوم داشته باشند بسیار کم بوده است. در سال‌های اخیر استفاده از نانوذرات فلزی به‌ویژه نانوذرات طلا که دارای فعالیت ضد میکروبی است در چچه جدیدی به‌منظور درمان عفونت‌های مقاوم به دارو به روی بشر گشوده است. با توجه به اثر همزمان این نانوذرات روی فرآیندهای مختلف سلول باکتری مانند پروتئین‌سازی، تولید انرژی و همانندسازی امکان ایجاد مقاومت به آنها وجود ندارد (Rai et al., 2009). البته در بین انواع مختلف نانوذرات فلزی تعداد محدودی در مصارف پزشکی قابل استفاده است، چرا که بایستی با بدن انسان سازگار بوده و سمیت کمی برای فرد داشته باشند، به همین دلیل نانوذرات طلا به عنوان یکی از مناسب‌ترین گزینه‌ها مطرح بوده چرا که از طرفی دارای خواص ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد ویروسی است و از طرف دیگر سمیت کمی نیز برای انسان دارد (Kalishwaralal et al., 2010). بنابراین این مطالعه با بررسی پارامترهای موثر بر بیوستتزر نانوذرات طلا با استفاده از گیاه دارویی آقطی و تأثیر این نانوذرات بر روی چند گونه باکتری بیماری‌زای انسانی انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

تهیه مواد شیمیایی و باکتری‌ها: کلیه مواد مورد استفاده با خلوص بالا تهیه شدند. نمک طلا

یون‌های فلزی قرار می‌گیرند، منجر به کاهش این یون‌های فلزی و تبدیل آنها به اتم‌های فلزی در ابعاد نانومتریکی می‌شوند (Shah Mirzaee and Pazoki, 2007; Ashiri and Safari, 2013). گیاهان به‌عنوان منابع پایدار و در دسترس در تهیه نانوذرات زیست‌سازگار در سال‌های اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. از مزایای این روش علاوه بر ارزان قیمت بودن، غیر سمی و زیست‌سازگار بودن، می‌توان به تولید نانوذرات با خلوص بالا، کم بودن زمان و کامل بودن واکنش اشاره نمود. گیاهان به سه صورت استخراج نانوذرات از طریق گیاه پالایی، ستتزر نانوذرات از توده زیستی و استفاده از عصاره گیاهان در ستتزر و استخراج نانوذرات فلزی نقش دارند. مطالعات مربوط به ستتزر نانوذرات طلا توسط گیاهان نشان می‌دهند که، گونه *Phacelia sericea* بیش از  $3857 \text{ mg kg}^{-1}$  طلا در توده ریشه خشک ذخیره می‌کند (Ashiri and Safari, 2013). مارشال و همکارانش (Marshall et al., 2007) تجمع نانوذرات طلا با اندازه ۵۰-۵ نانومتر را در گیاه خردل هندی گزارش کرده‌اند. تشکیل نانوذرات طلا در گیاه یونجه اولین بار توسط گاریدیا توریدی و همکاران (Gardea-Torredey et al., 2002) گزارش شد که به شکل‌های مکعبی، بیست وجهی و دوقلو در اندازه‌های ۴، ۶ و ۱۰ نانومتر بوده‌اند و در یک روش وابسته به pH نانوذراتی به شکل‌های چهار ضلعی، پلاکت شش ضلعی، بیست وجهی، ده وجهی و شکل‌های نامنظم بوده است (Ashiri and Safari, 2013). زیست توده گندم نیز توانسته است نانوذرات طلا در اسیدپتیه‌های گوناگون با ابعاد ۲ تا ۶ نانومتر با شکل‌های ده و بیست وجهی، شش ضلعی و میله‌ای ستتزر کند (Herrera et al., 2003) شانکار و همکارانش (Shankar et al., 2003; Shanker et al., 2004) احیای یون‌های طلا توسط برگ گل شمعدانی و

مازندران، شهرستان بابلسر بوده است. مقداری از برگ تازه آن پس از شستشوی کامل با آب دیونیزه شده و خشک کردن در دمای اتاق و بدون نور توسط آسیاب برقی کاملاً پودر شد. عصاره‌گیری به روش ماسراسیون و در قیف پرکولاسیون انجام شد. بدین منظور مقدار ۱ گرم از پودر گیاه با ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب دیونیزه شده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد بر روی دستگاه شیکر به هم زده شد. پس از خنک شدن، نمونه توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف و به منظور حذف کامل ذرات معلق به مدت ۳۰ دقیقه بوسیله دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره بدست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای استفاده‌های بعدی قرار داده شد.

**آماده سازی محلول استوک طلا (III) و سنتز نانوذرات طلا:** ابتدا محلول استوک طلا (III) از نمک طلای آن با غلظت ۱ میلی‌مولار ساخته شد. سپس مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره بدست آمده به ۴ میلی‌لیتر از محلول استوک طلا (III) در دمای اتاق اضافه شد. مقدار pH این محلول عدد ۴/۵۶ قرائت شد. مشاهده شد که بلافاصله پس از اضافه نمودن عصاره، رنگ محلول به سمت ارغوانی تغییر رنگ داده است که خود نشان دهنده تشکیل نانوذرات طلا می‌باشد. از محلول مورد نظر توسط اسپکتروفوتومتر فرابنفش - مرئی طیف‌گیری شد. پس از آن پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات طلا شامل: مقدار pH محلول، حجم عصاره، غلظت نمک طلا (III)، دمای واکنش و زمان انجام واکنش جهت بدست آوردن نانوذراتی با مورفولوژی یکنواخت تر و اندازه کوچکتر مورد بررسی قرار گرفت.

از شرکت سیگما-آلدریج، سدیم هیدروکسید (NaOH)، هیدرو کلریدریک اسید (HCl)، از شرکت مرک و باکتری‌های استفاده شده شامل، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus ATCC 2593*)، باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis ATCC 10240*)، اشرشیا کلی (*Escherichia coli ATCC 25922*) و سالمونلا اینتریتیدیس (*Salmonella enteritidis ATCC 13046*) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شدند و در طول آزمایش برای تمامی شستشوها و محلول سازی‌ها از آب دیونیزه شده استفاده شد.

**دستگاه‌ها:** کلیه طیف‌های جذبی توسط دستگاه طیفسنجی Jenway مدل ۶۷۱۵ با سل کوارتز ۱ سانتی متری ثبت شدند. اندازه‌گیری pH نیز با استفاده از دستگاه pH متر (827 pH lab) انجام شد. همچنین برای اندازه‌گیری‌های وزنی از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم مدل Kern و برای جداسازی، از سانتریفیوژ Sigma مدل 3-30k و اولتراسونیک مدل DSA 100 و شیکر مدل IKA KS 130 basic استفاده شد. در انتها با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، مدل Zeiss-EM10C-80 KV ساخت آلمان، اندازه و شکل نانوذرات سنتز شده بدست آمد. الگوی کریستالی پودر خشک نانوذرات طلا توسط دستگاه پراش پرتو ایکس (XRD) Bruker مدل D8 advance ساخت آلمان مشخصه‌یابی شد.

**آماده سازی عصاره:** گیاه دارویی آقطی با نام علمی *Sambucus ebulus L.* و نام محلی پَلَم یکی از گیاهان دارویی است که خاستگاه عمده آن در منطقه شمال ایران خصوصاً استان مازندران می‌باشد. این گیاه متعلق به خانواده کاپریفولیاسه<sup>۱</sup> از تیره پیچ امین الدوله است. در این تحقیق، محل جمع‌آوری این گیاه از استان

### بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات

**بهینه سازی pH واکنش:** جهت بهینه‌سازی مقدار pH، شش سری محلول شامل ۲ میلی‌لیتر عصاره و ۴ میلی‌لیتر محلول نمک طلا (III) ۱ میلی‌مولار با pHهای ۲، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ ساخته شد و طیف‌های جذبی آن‌ها توسط اسپکتروفوتومتر فرابنفش - مرئی در محدوده ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر گرفته شد و pH بهینه انتخاب شد. برای تنظیم اسیدیته محلول از یکی از دو محلول سدیم هیدروکسید و یا هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۱ مولار استفاده گردید.

**بهینه‌سازی مقدار حجم عصاره مصرفی:** برای بهینه سازی میزان عصاره‌ی گیاه مقادیر ۱ تا ۴ میلی‌لیتر از عصاره به ۴ میلی‌لیتر محلول نمک طلا (III) ۱ میلی‌مولار افزوده شد و pH واکنش برابر pH بهینه تنظیم شد. عصاره به عنوان عامل احیاء کننده و تثبیت کننده در تولید نانوذرات به کار می‌رود. از هر یک از محلول‌ها، جداگانه طیف اسپکتروفوتومتر فرابنفش - مرئی گرفته و در انتها حجم عصاره بهینه انتخاب شد.

**بهینه سازی مقدار غلظت نمک طلا (III):** برای بهینه سازی غلظت یون طلا (III)، مقدار عصاره بهینه شده را به ۴ میلی‌لیتر از غلظت‌های متفاوت محلول نمک طلا (III) (۰/۵ تا ۳) میلی‌مولار افزوده شد و pH واکنش به pH بهینه رسانده شد. از محلول‌ها طیف اسپکتروفوتومتر مرئی - فرابنفش گرفته و در انتها غلظت بهینه نمک طلا (III) انتخاب شد.

**بهینه‌سازی دمای واکنش:** دستیابی به نانوذرات طلا با استفاده از عصاره گیاه مذکور حتی در دمای اتاق نیز امکان‌پذیر بوده است. لیکن برای بدست آمدن نانوذراتی مطلوب‌تر، دمای واکنش نیز بررسی و بهینه شد. جهت بهینه نمودن دمای واکنش، محلول‌هایی با شرایط بهینه قبل و به صورت جداگانه در دماهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و از هر یک از نمونه‌ها به صورت مجزا طیف اسپکتروفوتومتری

فرابنفش - مرئی گرفته شد و در انتها دمای بهینه انتخاب شد.

**بهینه‌سازی زمان واکنش:** جهت بهینه نمودن زمان واکنش، محلول حاصل از مخلوط عصاره و نمک طلا (III) با تمامی بهینه سازی‌های قبل، در زمان‌های مختلف (از لحظه مخلوط تا ۶۰ دقیقه به فاصله هر ۱۰ دقیقه) ساخته و از هر کدام بصورت جداگانه طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش - مرئی گرفته شد و زمان بهینه انتخاب شد.

**مشخصه‌یابی نانوذرات طلا:** برای تأیید نتایج حاصل از طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش - مرئی، اندازه و شکل نانوذرات طلا سنتز شده توسط تکنیک‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری و پراش پرتو ایکس مورد بررسی قرار گرفت.

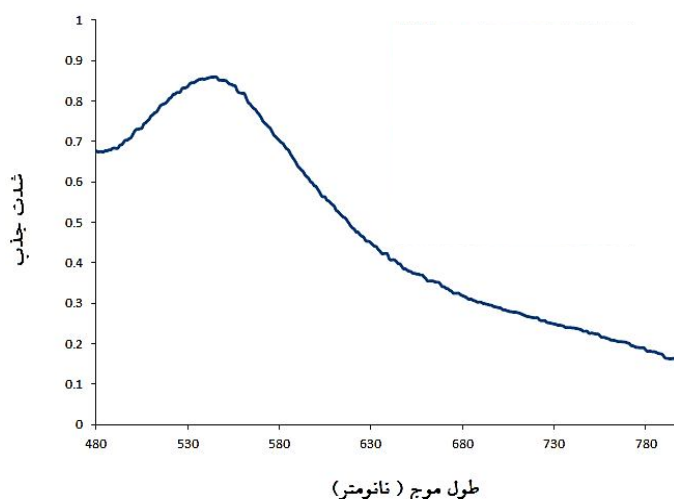
**فعالیت آنتی باکتریایی:** فعالیت آنتی باکتریایی نانوذرات طلای سنتز شده با روش دیسک دیفیوژن (NCCLS 2006) (Asghari et al., 2014) بر روی دو باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس) و دو باکتری گرم منفی (اشرشیا کلی و سالمونلا ایتریتیدیس) مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا هر یک از باکتری‌ها در محیط کشت مایع (Nutrient Broth) کشت داده شد (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، شیکر با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۲۴ ساعت). سپس از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری سوسپانسیونی معادل غلظت نیم مک فارلند آماده گردید و از هر سوسپانسیون باکتریایی حجم ۰/۱ میلی‌لیتر ( $10^8$  cfu/ml) روی محیط کشت مولر هیتون آگار تلقیح کرده و به صورت انبوه با سوآپ کشت داده شد. در ادامه دیسک‌های کاغذی (۶ میلیمتری) آغشته شده به محلول نانوذره طلا روی کشت باکتری مربوطه گذاشته شد و در نهایت پلیت‌ها را در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف هر دیسک را بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت اندازه‌گیری گردید. به منظور مقایسه چگونگی اثر آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلا علیه باکتری‌های مورد آزمایش، حساسیت

۱ طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا سنتز شده بدون اعمال شرایط بهینه را نشان می دهد که در طول موج ۵۴۵ نانومتر (رزونانس پلاسمون سطحی مربوط به نانوذرات طلا) بیشترین میزان جذب را داراست.

این باکتری ها به دیسک های آنتی بیوتیک های کوآموکسی کلاو، سیپروفلوکسازین و تتراسایکلین نیز مورد بررسی قرار گرفت.

## نتایج

مطالعه طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی: شکل



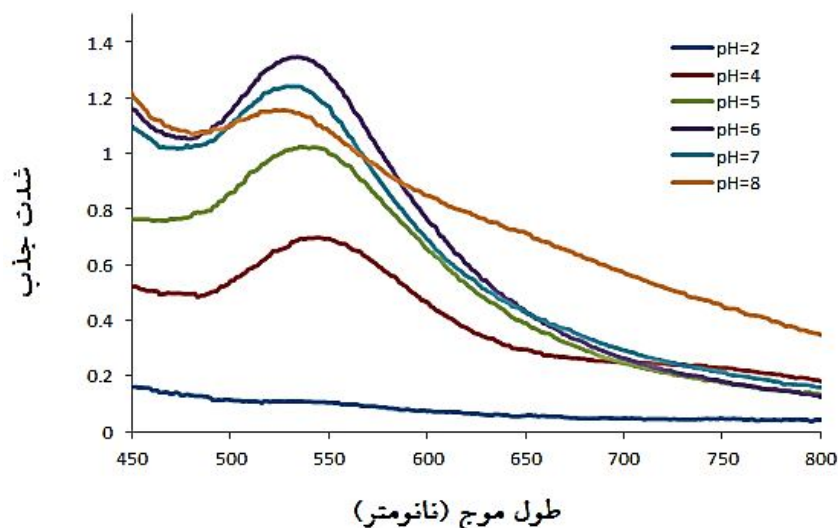
شکل ۱: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا بدون اعمال شرایط بهینه و در دمای اتاق

سنتری صورت نگرفته است. اما با افزایش میزان اسیدیته محلول تا ۶، جذب محلول افزایش می یابد که مربوط به افزایش میزان نانوذرات سنتز شده در محیط است. تغییر شدید در جذب طیف های اسپکتروفتومتری محلول های با اسیدیته متفاوت نشان دهنده این است که در مورد گیاه آقطی اندازه و میزان نانوذرات تولید شده تا حدود زیادی به این پارامتر وابسته است. در  $\text{pH}=6$  پیک تقریباً شارپ و متقارن دیده می شود. در نتیجه مقدار  $\text{pH}=6$  به عنوان اسیدیته بهینه انتخاب شد.

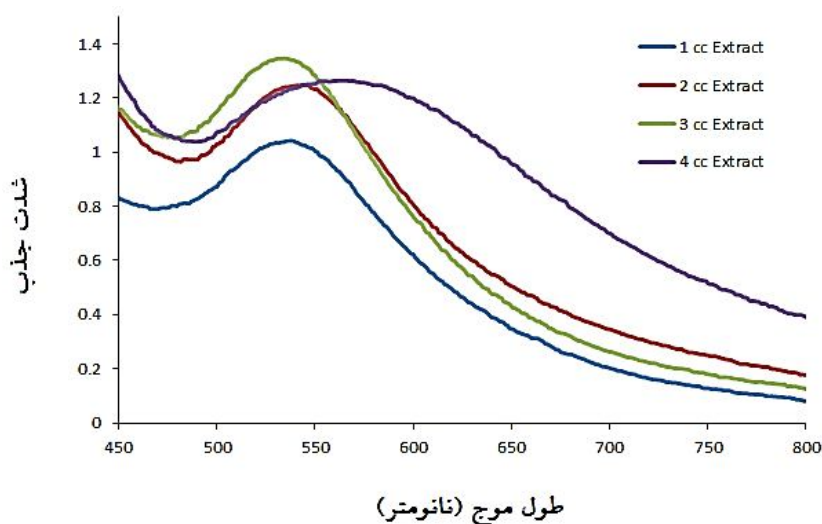
**تاثیر میزان عصاره:** برای بهینه سازی میزان عصاره گیاه مقادیر ۱ تا ۴ میلی لیتر از عصاره به ۴ میلی لیتر محلول نمک طلا اضافه شد و  $\text{pH}$  واکنش برابر ۶ تنظیم شد. از هر یک از محلول ها، جداگانه طیف اسپکتروفتومتر فرابنفش - مرئی گرفته شد (شکل ۳).

**تاثیر  $\text{pH}$  واکنش:** به محض مخلوط کردن ۲ میلی لیتر عصاره و ۴ میلی لیتر از نمک طلا با غلظت ۱ میلی مولار، مشاهده شد که رنگ محلول حاصل به رنگ ارغوانی تیره تغییر رنگ داده است که این رنگ مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا و دلیلی بر سنتز موفق این نانوذرات می باشد. در ابتدا اسیدیته این محلول ۴/۵۶ خوانده شد و به منظور بررسی تاثیر  $\text{pH}$  بر روند سنتز نانوذرات طلا، اسیدیته محلول در  $\text{pH}$  های کمتر و بیشتر از اسیدیته اولیه ساخته شد. بدین منظور به ترتیب، شش سری محلول با مقادیر گفته شده در  $\text{pH}$  های ۲، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ در دمای اتاق ساخته شد و از هر یک از محلول ها به ترتیب و جداگانه طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی گرفته شد (شکل ۲).

ملاحظه شد که در  $\text{pH}=2$  تغییر نامحسوسی در جذب ملاحظه نشده به طوری که می توان گفت هیچ



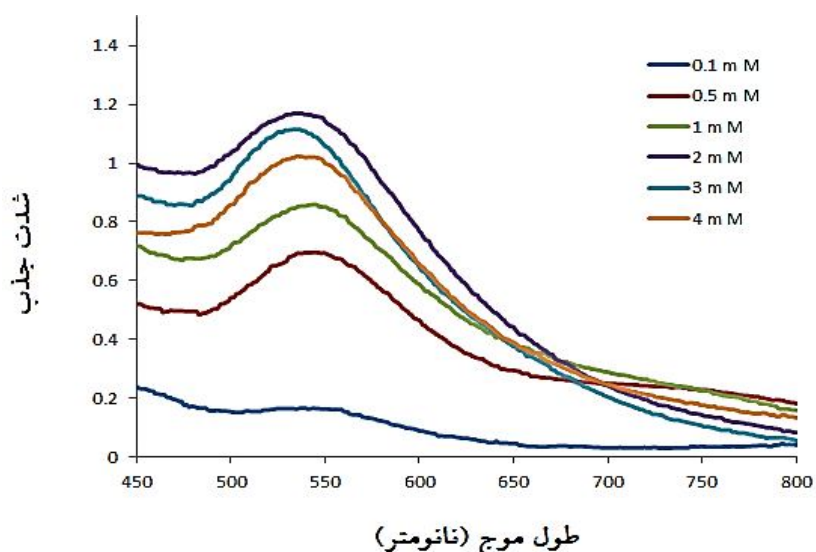
شکل ۲: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی نانوذرات طلا در pHهای متفاوت و در دمای اتاق



شکل ۳: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی نانوذرات طلا در حجم‌های متفاوت از عصاره و در دمای اتاق

بررسی اثر غلظت نمک طلا، محلول‌های مختلفی با غلظت‌های کمتر از ۱ میلی‌مولار (۰/۱ و ۰/۵ میلی‌مولار) و بیشتر از ۱ میلی‌مولار (۲، ۳ و ۴ میلی‌مولار) ساخته و از هر یک به صورت جداگانه طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی گرفته شد (شکل ۴).

ملاحظه شد که با افزایش میزان عصاره، میزان جذب نانوذرات طلا افزایش یافته است. با توجه به شکل ۴، مشاهده شد که مقدار ۳ میلی‌لیتر از عصاره، طیف بیشترین جذب را داراست در نتیجه این مقدار به عنوان حجم عصاره بهینه انتخاب شد. تاثیر غلظت نمک طلا: در این مطالعه به منظور

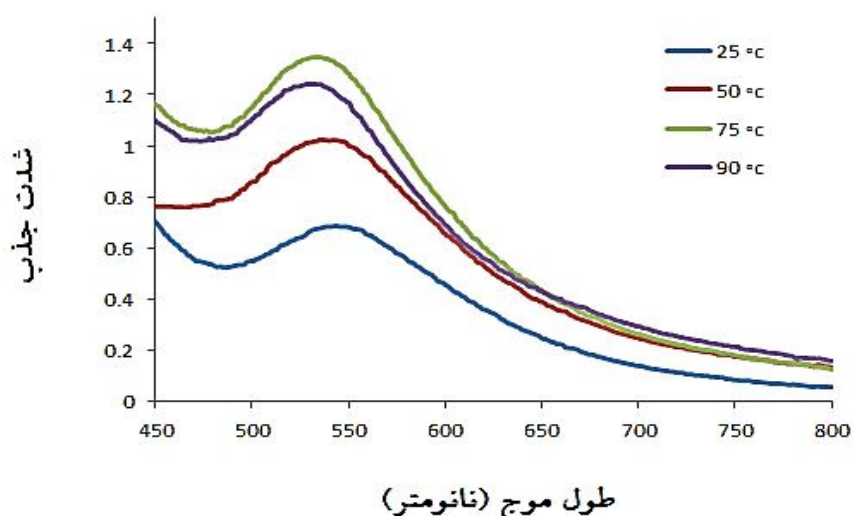


شکل ۴: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا در غلظت‌های متفاوت از نمک طلا و در دمای اتاق

که نانوذرات طلا توسط عصاره گیاه آقطی در دمای اتاق نیز قابل سنتز می‌باشند. برای بهینه نمودن دمای واکنش جهت سنتز نانوذراتی مطلوب‌تر، محلول حاصل از مخلوط عصاره با نمک طلا با تمامی بهینه‌های پارامترهای قبلی ساخته و هریک به‌صورت جداگانه در دماهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و از تمامی نمونه‌ها بصورت مجزا طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی گرفته شد (شکل ۵).

ملاحظه شد که هرچه غلظت نمک طلا افزایش می‌یابد جذب افزایش می‌یابد. این روند تا غلظت ۲ میلی‌مولار ادامه پیدا می‌کند. اما در غلظت‌های بیشتر از آن، جذب کاهش می‌یابد که می‌تواند بدلیل چسبیدن نانوذرات به یکدیگر و تولید نانوذراتی درشت‌تر و کاهش میزان نانوذرات سنتز شده باشد. در نتیجه میزان غلظت ۲ میلی‌مولار به‌عنوان غلظت بهینه انتخاب شد.

تأثیر دما در سنتز نانوذرات: در این مطالعه مشاهده شد

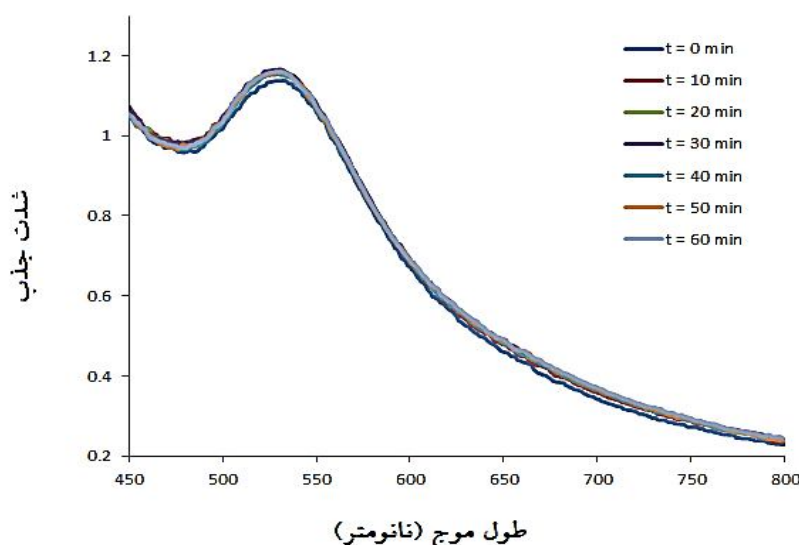


شکل ۵: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا در دماهای مختلف



نمک طلا و دمای واکنش، اثر زمان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تأثیر زمان مجاورت ۴ میلی‌لیتر محلول نمک طلا با غلظت ۲ میلی‌مولار با ۳ میلی‌لیتر عصاره در  $\text{pH}=6$  و در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد بر روند واکنش توسط دستگاه اسپکتروفتومتری نشان داد که متناسب با افزایش زمان برهمکنش، میزان جذب تا حدودی افزایش می‌یابد اما این افزایش چشمگیر نمی‌باشد (شکل ۶).

مشاهده شد که با افزایش دمای واکنش، جذب حاصل از رزونانس پلاسمون سطحی بطور محسوسی افزایش یافته است. لیکن این افزایش تا دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده و در دمای ۹۰ درجه افت شدیدی در جذب دیده شده است در نتیجه دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای بهینه انتخاب شد. **تأثیر زمان واکنش در سنتز نانوذرات:** با ثابت نگه‌داشتن شرایط بیوستتزر نانوذرات طلا در نقاط بهینه شده پارامترهای  $\text{pH}$ ، میزان عصاره، غلظت محلول

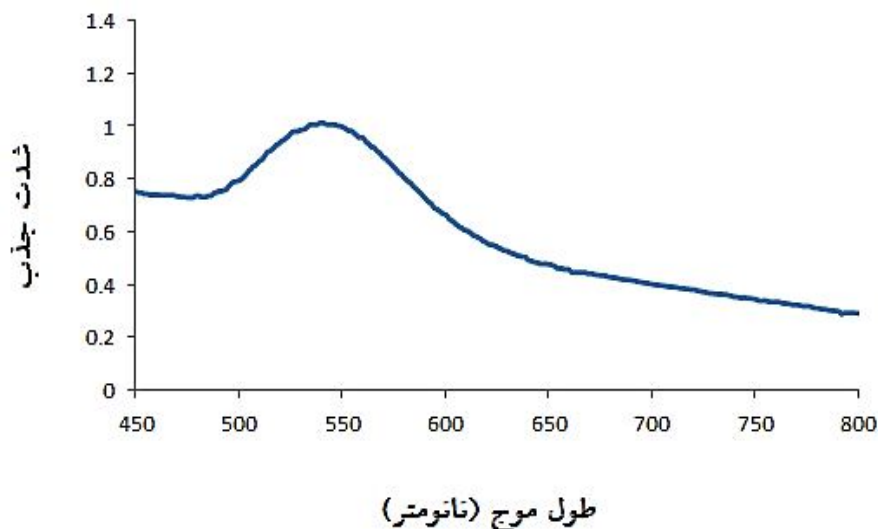


شکل ۶: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا در زمان‌های مختلف و در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد

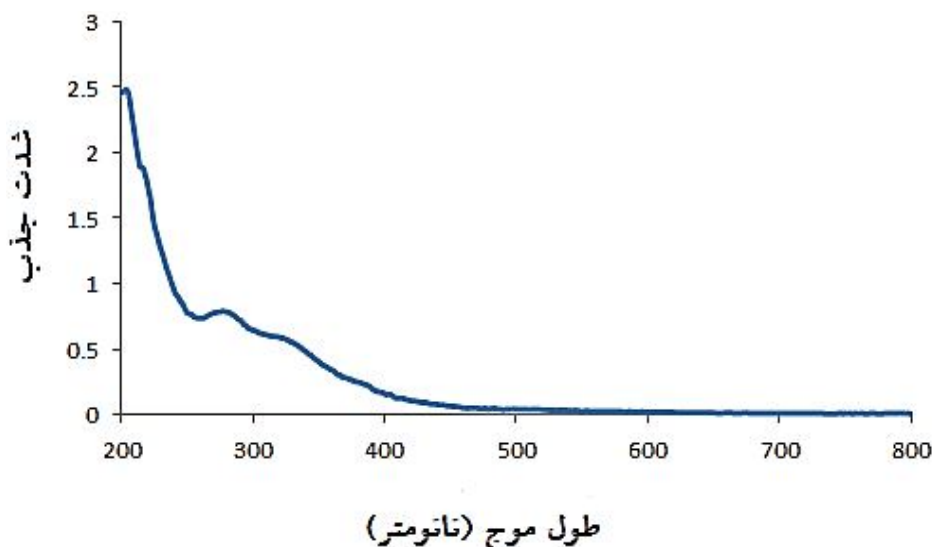
چسبیدن ذرات با اندازه کوچکتر به یکدیگر با گذشت زمان طولانی و تشکیل نانوذراتی با اندازه بزرگتر باشد.

طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی حاصل از عصاره آبی گیاه آقطی به‌صورت جداگانه گرفته شده است که نشان می‌دهد در طول موج ۵۳۴ نانومتر که مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا می‌باشد، هیچ پیکی وجود ندارد که این مهم دلیلی بر سنتز موفق نانوذرات طلا با استفاده از روش زیستی و استفاده از عصاره گیاه به‌عنوان عامل کاهنده و پایدارکننده می‌باشد (شکل ۸).

با توجه به شکل ۶، از زمان ۱۰ دقیقه به بعد روند تقریباً یکنواختی در افزایش میزان جذب مشاهده شد که نشان‌دهنده سنتز سریع نانوذرات در شرایط بهینه شده و پایدار بودن آن می‌باشد. در نتیجه، زمان ۱۰ دقیقه به‌عنوان زمان بهینه انتخاب شد. شکل ۷ طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی نانوذرات طلا پس از گذشت ۶ ماه از اعمال تمامی شرایط و پارامترهای بهینه شده را نشان می‌دهد که نانوذرات سنتز شده حتی با گذشت ۶ ماه نیز پایدار بوده‌اند. میزان جذب با گذشت ۶ ماه کمی کاهش پیدا کرده است و طیف کمی پهن شده است که این امر می‌تواند بدلیل



شکل ۷: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات طلا با گشت ۶ ماه از زمان سنتز

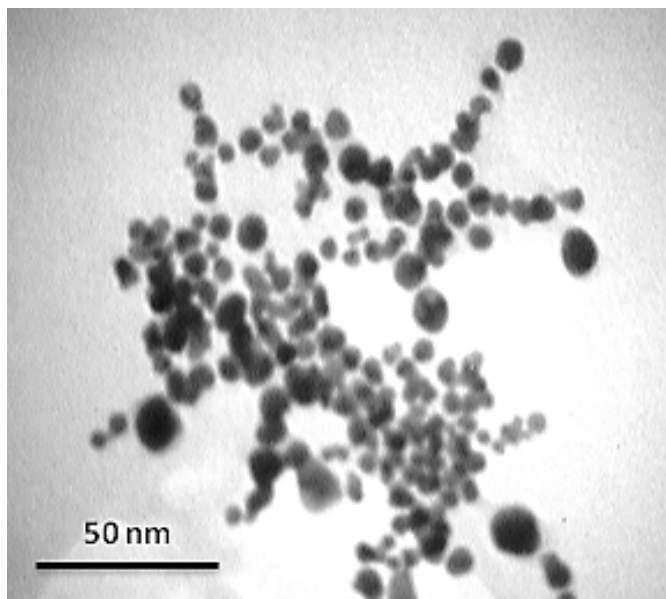


شکل ۸: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی عصاره آبی برگ

گیاه *Sambucus ebulus* L.

شرایط بهینه شده را نشان می‌دهد. تصویر نشان می‌دهد که نانوذرات بدست آمده همگی تقریباً کروی بوده و اندازه متوسط آنها بین ۱۷-۱۱ نانومتر بوده است.

بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): توزیع شکل و اندازه نانوذرات طلا سنتز شده توسط تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی شد. شکل ۹ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات طلا سنتز شده با اعمال تمامی



شکل ۹: تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانوذرات طلا سنتز شده با استفاده از عصاره‌ی برگ گیاه آقطی

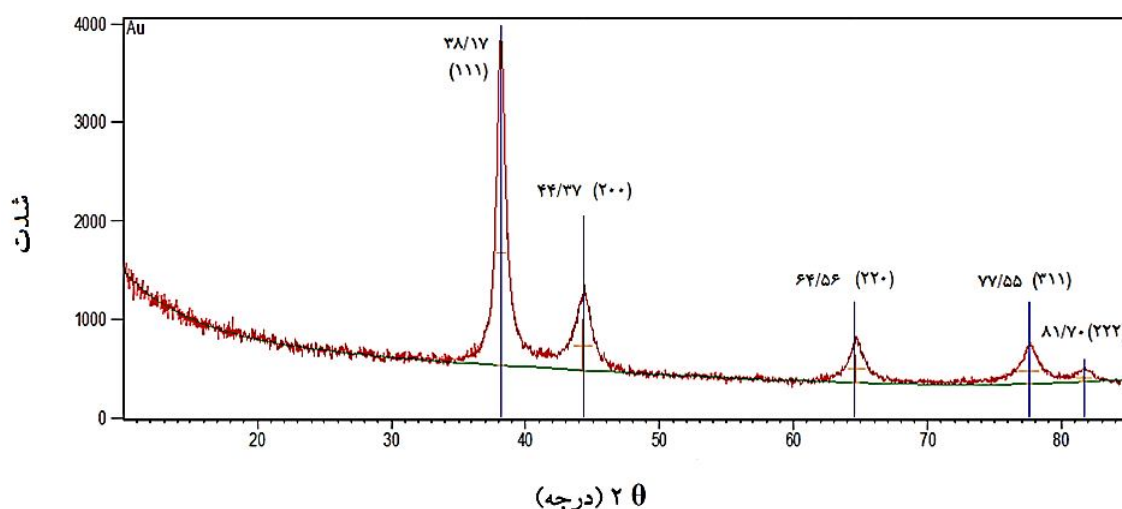
را نشان می‌دهند که دلیلی بر سنتز موفق نانوذرات می‌باشد. آنالیز ساختاری نشان می‌دهد که نانوذرات طلا دارای ساختار بلوری با شاخص‌های میلر (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) و (۲۲۲) در شبکه مکعبی می‌باشد. وجود قله‌های تیز در الگوها نشان‌دهنده درجه بالایی از بلورینگی برای نانوذرات می‌باشد. پیک (۱۱۱) از سایر پیک‌ها شدیدتر است در نتیجه صفحات بلوری نانوذرات طلا بیشتر در این جهت تشکیل شده‌اند. میانگین اندازه دانه‌های بلوری سنتز شده با محاسبه فرمول دبای-شرر ۱۱/۷۸-۱۶/۴۸ نانومتر برآورد شدند که با نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری و نتایج بدست آمده از بررسی طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش - مرئی کاملاً مطابقت داشت.

بررسی طیف پراش پرتو ایکس (XRD): برای بررسی بیشتر و مطالعه ساختار بلوری نانوذرات طلا سنتز شده، از آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD) استفاده شد (شکل ۱۰). میانگین اندازه دانه‌های بلوری با محاسبه پهناهای پیک‌های تشکیل شده در نمونه‌ها با استفاده از فرمول دبای-شرر (فرمول ۱)، برآورد شد:

فرمول ۱:

$$D = 0.9\lambda / \beta \cos \theta$$

که  $\beta$ ، پهناهای پیک‌ها در نصف ارتفاع ماکزیمم،  $\lambda$  طول موج اشعه X برابر با ۱/۵۴ نانومتر،  $\theta$  زاویه بین پرتو باز تابش و تابش و D اندازه دانه‌های بلوری می‌باشد. در نواحی ۳۸/۱۷ و ۴۴/۳۷، ۶۴/۵۶، ۷۷/۵۵،  $2\theta = 81/70$  نانوذرات طلا پیک‌های شارپ و تیزی



شکل ۱۰: تصویر پراش پرتو ایکس (XRD) نانوذرات طلا سنتز شده با استفاده از عصاره‌ی برگ گیاه آقطی

باکتریایی نانوذرات طلا روی باکتری‌های گرم مثبت تا حدودی بیشتر از باکتری‌های گرم منفی استفاده شده در این مطالعه می‌باشد، به طوری که بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۴ میلی‌متر) بوده است. شکل ۱۱ قطر هاله عدم رشد نانوذرات طلای سنتز شده و آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان می‌دهد.

**بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلا:** نتایج بررسی اثر آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلای تولید شده بر روی باکتری‌های مورد آزمایش و مقایسه فعالیت آنتی‌باکتریایی این نانوذرات با سه آنتی‌بیوتیک کوآموکسی کلاو، سیپروفلوکسازین و تتراسایکلین که به عنوان شاهد (کنترل مثبت) استفاده شده بودند، نشان داد که این نانوذرات تولیدی توانایی نسبتاً مناسبی در مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا بررسی شده، دارند (جدول ۱). با توجه به نتایج، فعالیت آنتی

جدول ۱: نتایج بررسی اثرات آنتی‌باکتریایی نانوذرات طلا در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده

ردیف	میکروارگانیزم‌ها (باکتری)	نانوذرات طلا	قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر		
			آنتی بیوتیک کوآموکسی کلاو	آنتی بیوتیک سیپروفلوکسازین	آنتی بیوتیک تتراسایکلین
۱	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۱۴	۱۸	۲۳	۲۱
۲	<i>باسیلوس سوبتیلیس</i>	۱۳	۲۰	۲۴	۲۳
۳	<i>اشرشیا کلی</i>	۱۱	۱۶	۲۱	۲۴
۴	<i>سالمونلا اینترتیدیس</i>	۱۰	۱۵	۲۰	۲۱



شکل ۱۱: هاله عدم رشد نانوذرات طلا و آنتی بیوتیک‌های مورد آزمایش علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

#### بحث

اسیدیته ۸، طیف پهن تر شده است که می‌تواند مربوط به اتصال نانوذرات به یکدیگر و سنتز نانوذرات با اندازه بزرگتر باشد. پیش از این پهن شدن طیف‌ها در اثر افزایش اندازه نانوذرات گزارش شده است (Shenya et al., 2011). آرمنداریز و همکارانش (Armendariz et al., 2004). در سال ۲۰۰۴، به بررسی تاثیر pH در شکل و سایز نانوذرات طلا سنتز شده با گیاه *Avenasativa* پرداختند و ملاحظه کردند که در pH کمتر نانوذرات بزرگتر (۲۵-۸۵ نانومتر) و در pH بالاتر نانوذرات کوچکتر (۲۰-۵ نانومتر) می‌توان سنتز نمود. در روش بیوستتزر نانوذرات توسط گیاهان، عصاره نقش کاهنده و پایدار کننده را ایفا می‌کند (Philip, 2010). گزارشات حاکی از آن است که با افزایش میزان عصاره، مقدار ترکیبات کاهنده و پایدار کننده نظیر ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و ترپنوئیدی در محلول افزایش یافته و میزان یون بیشتری را در معرض کاهش قرار می‌دهند و جذب مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا افزایش می‌یابد (Dwivedi and Gopal, 2010). مطالعات نشان می‌دهند که با افزایش میزان عصاره،

طیف جذبی نوری نانوذرات فلزی به چندین فاکتور مانند: اندازه ذرات، شکل، برهمکنش ذرات با یکدیگر و ضریب شکست محیط حساس است (Inbakandan et al., 2010). pH یکی از مهمترین پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات طلا می‌باشد (Waghmar et al., 2014). پیش از این گزارش‌هایی مبنی بر تاثیر pH واکنش بر تنوع اندازه و شکل نانوذرات شده است (Kamali et al., 2012). همچنین گزارش‌ها حاکی از آن است که pH بر روی شکل نانوذرات تاثیر چشمگیری ندارد و تنها اندازه آنها به میزان زیاد تحت تاثیر قرار می‌دهد (Gardea-Torresdey et al., 1999). در این مطالعه به نظر می‌رسد که در pH بالای ۶ با هیدرولیز گسترده یون طلا مواجه هستیم به طوری که باعث بوجود آمدن گونه‌های پایدار هیدروکسیدهای یون طلا شده و در نهایت موجب جلوگیری از ورود این یون به واکنش احیای زیستی می‌شود (Mironov and Makotchenko, 2009) و در نتیجه در اسیدیته ۶ به بعد با کاهش میزان جذب روبرو هستیم. همچنین در

علاوه بر افزایش در میزان نانوذرات سنتز شده و میزان جذب، نانوذراتی مطلوب‌تر با اندازه کوچک‌تر سنتز می‌شود (Dubeya et al., 2010). تحقیقات نشان می‌دهد که در سنتز نانوذرات، در غلظت‌های کمتر از میزان بهینه پایدار کننده، سبب می‌گردد عمل پایدار سازی نانوذرات به‌طور کامل انجام نگرفته و ذرات درشت‌تری به‌دست آید. افزون بر آن، افزودن غلظت‌های بیشتر از میزان بهینه، سبب تجمع ذرات پایدار کننده به دور خود شده که در نتیجه آن نیز پایدارسازی بطور کامل انجام نشده و ذرات درشت‌تری حاصل می‌شود و افت در شدت پیک نشان دهنده افزایش اندازه ذرات و افزایش پهنای آن نشان دهنده افزایش توزیع اندازه ذرات است (Foroghirad and Khatibzadeh, 2015). در نتیجه میزان ۳ میلی‌لیتر از عصاره به‌عنوان حجم بهینه انتخاب شد. مطالعات نشان می‌دهند که با افزایش غلظت یون فلزی، جذب خوانده شده افزایش می‌یابد و این افزایش غلظت و افزایش جذب، نشان دهنده افزایش سرعت واکنش و تولید نانوذرات بیشتر می‌باشد (Dwivedi and Gopal, 2010). گزارشات نشان می‌دهند، علاوه بر این با افزایش میزان جذب، افزایش کمی در اندازه نانوذرات سنتز شده ایجاد خواهد شد که می‌تواند به‌دلیل چسبیدن نانوذرات به یکدیگر باشد. همچنین با افزایش اندازه نانوذرات، جابجایی اندکی به سمت طول موج‌های قرمز در طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی مشاهده می‌شود (Mock et al., 2002; Vinoda et al., 2011). در نتیجه غلظت ۲ میلی‌مولار از یون طلا به‌عنوان غلظت مناسب انتخاب شد. تحقیقات نشان می‌دهند که با افزایش دمای واکنش، میزان جذب مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نیز افزایش می‌یابد (Rai et al., 2006). همچنین دمای واکنش بر اندازه نانوذرات سنتز شده نیز تأثیر می‌گذارد (Wiley et al., 2006). با افزایش دما، در طیف‌های اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی جابجایی به سمت طول موج‌های آبی دیده می‌شود که نشان‌دهنده کاهش اندازه نانوذرات می‌باشد (Song and Kim, 2009). این افزایش در جذب و کاهش در سایز نانوذرات می‌تواند به‌دلیل افزایش سرعت برخورد مولکول‌های کاهنده و پایدار کننده موجود در عصاره با یون‌های فلزی باشد به‌طوری‌که به محض احیاء یون‌های فلزی، پایدار کننده‌ها با اتصال به نانوذرات مانع از چسبیدن نانوذرات به یکدیگر شده و اندازه نانوذرات افزایش نمی‌یابد (Kaviya et al., 2011). همچنین افزایش موجب کاهش در زمان کامل شدن واکنش می‌گردد (Kasture et al., 2008). افزایش بیش از حد دما موجب کاهش در میزان جذب می‌شود. در این مطالعه با افزایش دما تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد، کاهش محسوسی در میزان جذب مشاهده شد که این پدیده می‌تواند بدین دلیل باشد که با افزایش بیش از حد دما، تمامی یا بخشی از ترکیبات موجود در عصاره گیاه که نقش احیاء کنندگی و پایدارکنندگی نانوذرات را داشته‌اند تجزیه شده و یا از بین رفته‌اند. پیش از این تخریب ترکیبات موثره موجود در گیاهان به‌دلیل افزایش بیش از حد دما گزارش شده است (Basiri, 2011). در نتیجه دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای بهینه انتخاب شد. زمان تأثیر زیادی بر میزان سنتز نانوذرات دارد به گونه‌ای که یکی از عوامل‌های اثبات میزان پایداری نانوذرات فاکتور زمان می‌باشد. گزارشات نشان می‌دهند که نانوذراتی که پایدار هستند با گذر زمان تغییر چشمگیری در میزان جذب آن‌ها مشاهده نمی‌شود. اما در برخی از نانوذرات مشاهده شده است که با گذر بیش از حد زمان تغییر زیادی در میزان جذب آن‌ها مشاهده شده که این پدیده به‌دلیل چسبندگی نانوذرات به هم و کاهش در میزان نانوذرات سنتز شده و کاهش در مقدار جذب و

علاوه بر افزایش در میزان نانوذرات سنتز شده و میزان جذب، نانوذراتی مطلوب‌تر با اندازه کوچک‌تر سنتز می‌شود (Dubeya et al., 2010). تحقیقات نشان می‌دهد که در سنتز نانوذرات، در غلظت‌های کمتر از میزان بهینه پایدار کننده، سبب می‌گردد عمل پایدار سازی نانوذرات به‌طور کامل انجام نگرفته و ذرات درشت‌تری به‌دست آید. افزون بر آن، افزودن غلظت‌های بیشتر از میزان بهینه، سبب تجمع ذرات پایدار کننده به دور خود شده که در نتیجه آن نیز پایدارسازی بطور کامل انجام نشده و ذرات درشت‌تری حاصل می‌شود و افت در شدت پیک نشان دهنده افزایش اندازه ذرات و افزایش پهنای آن نشان دهنده افزایش توزیع اندازه ذرات است (Foroghirad and Khatibzadeh, 2015). در نتیجه میزان ۳ میلی‌لیتر از عصاره به‌عنوان حجم بهینه انتخاب شد. مطالعات نشان می‌دهند که با افزایش غلظت یون فلزی، جذب خوانده شده افزایش می‌یابد و این افزایش غلظت و افزایش جذب، نشان دهنده افزایش سرعت واکنش و تولید نانوذرات بیشتر می‌باشد (Dwivedi and Gopal, 2010). گزارشات نشان می‌دهند، علاوه بر این با افزایش میزان جذب، افزایش کمی در اندازه نانوذرات سنتز شده ایجاد خواهد شد که می‌تواند به‌دلیل چسبیدن نانوذرات به یکدیگر باشد. همچنین با افزایش اندازه نانوذرات، جابجایی اندکی به سمت طول موج‌های قرمز در طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی مشاهده می‌شود (Mock et al., 2002; Vinoda et al., 2011). در نتیجه غلظت ۲ میلی‌مولار از یون طلا به‌عنوان غلظت مناسب انتخاب شد. تحقیقات نشان می‌دهند که با افزایش دمای واکنش، میزان جذب مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نیز افزایش می‌یابد (Rai et al., 2006). همچنین دمای واکنش بر اندازه نانوذرات سنتز شده نیز تأثیر می‌گذارد (Wiley et al., 2006). با افزایش دما، در طیف‌های اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی جابجایی به سمت طول موج‌های آبی دیده می‌شود که نشان‌دهنده کاهش اندازه نانوذرات می‌باشد (Song and Kim, 2009). این افزایش در جذب و کاهش در سایز نانوذرات می‌تواند به‌دلیل افزایش سرعت برخورد مولکول‌های کاهنده و پایدار کننده موجود در عصاره با یون‌های فلزی باشد به‌طوری‌که به محض احیاء یون‌های فلزی، پایدار کننده‌ها با اتصال به نانوذرات مانع از چسبیدن نانوذرات به یکدیگر شده و اندازه نانوذرات افزایش نمی‌یابد (Kaviya et al., 2011). همچنین افزایش موجب کاهش در زمان کامل شدن واکنش می‌گردد (Kasture et al., 2008). افزایش بیش از حد دما موجب کاهش در میزان جذب می‌شود. در این مطالعه با افزایش دما تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد، کاهش محسوسی در میزان جذب مشاهده شد که این پدیده می‌تواند بدین دلیل باشد که با افزایش بیش از حد دما، تمامی یا بخشی از ترکیبات موجود در عصاره گیاه که نقش احیاء کنندگی و پایدارکنندگی نانوذرات را داشته‌اند تجزیه شده و یا از بین رفته‌اند. پیش از این تخریب ترکیبات موثره موجود در گیاهان به‌دلیل افزایش بیش از حد دما گزارش شده است (Basiri, 2011). در نتیجه دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای بهینه انتخاب شد. زمان تأثیر زیادی بر میزان سنتز نانوذرات دارد به گونه‌ای که یکی از عوامل‌های اثبات میزان پایداری نانوذرات فاکتور زمان می‌باشد. گزارشات نشان می‌دهند که نانوذراتی که پایدار هستند با گذر زمان تغییر چشمگیری در میزان جذب آن‌ها مشاهده نمی‌شود. اما در برخی از نانوذرات مشاهده شده است که با گذر بیش از حد زمان تغییر زیادی در میزان جذب آن‌ها مشاهده شده که این پدیده به‌دلیل چسبندگی نانوذرات به هم و کاهش در میزان نانوذرات سنتز شده و کاهش در مقدار جذب و

سوتیلیس (گرم مثبت) نسبت به *اشرشیا کلی* (گرم منفی) به نانوذرات نقره حساسیت بیشتری دارد. گزارشات حکایت از آن دارد که نانوذرات نقره بر روی باکتری‌های گرم مثبت عملکرد بهتری دارند (Thakkar et al., 2010). برخی از مطالعات نیز حاکی از بی اثر بودن نانو ذرات طلا روی باکتری *اشرشیا کلی* بوده‌اند (Cho et al., 2005). البته روپارلیا و همکاران (Ruparelia et al., 2011) نشان دادند که تفاوت در این اثرات ضد میکروبی به سویه باکتری بستگی دارد، به طوری که برخی سویه‌های *اشرشیا کلی* نسبت به سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به نانوذرات طلا مقاومت بیشتری نشان دادند. در مطالعه‌ای دیگر، اثر نانو ذرات طلا بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *سودوموناس آئروجینوزا* و *شیگلا دیسانتریه* خیلی بیشتر از سایر باکتری‌های مورد مطالعه بوده است، که تمامی این باکتری‌ها از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی مقاوم به دارو به شمار می‌روند (Grace and Pandian, 2007). در مطالعه‌ای که بر روی اثر ضد میکروبی نانوذرات طلا، روی و نقره علیه برخی از میکروارگانیسم‌ها انجام شد، مشاهده گردید که نانو ذرات طلا بیشترین اثر را بر روی باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* داشته است ولی در کل، نانوذرات طلا نسبت به نانوذرات دیگر، اثر ضد میکروبی ضعیف تری را بر روی میکروارگانیسم‌ها دارا بوده و این اثر کاملا وابسته به غلظت نانوذرات طلا بوده است بگونه ای که در غلظت‌های بالا، قطرهای عدم رشد بیشتر و بارزتر مشاهده است (Abdollahi et al., 2014).

#### نتیجه‌گیری نهایی

مطالعه حاضر اولین گزارش بیوستتزر نانوذرات طلا با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه آقطی بوده است. به‌طور کلی نتایج این پژوهش پتانسیل بالای این گیاه را

پهن شدگی طیف‌ها می‌شود (Zakeri and Fasihi, 2011). در نتیجه در این مطالعه، زمان ۱۰ دقیقه، بهترین زمان مناسب جهت سنتز نانوذرات بوده است. در مورد مکانیسم اثر نانوذرات مطالعات زیادی صورت گرفته است. وجود اختلاف بار بین نانوذره (با بار مثبت) و مولکول‌های سطحی یا داخل سلولی میکروب‌ها (با بار منفی)، سبب اتصال نانوذرات به مولکول‌های زیستی می‌شود، که در این بین اثر نانوذرات با اتصال به پروتئین‌های غشایی که در انتقال مواد نقش دارند و نیز اتصال به پروتئین‌های آنزیمی و اکسید کردن گروه‌های فعال آنها مانند تیول، اهمیت بیشتری داشته و در نهایت می‌تواند منجر به مرگ میکروب‌ها شوند (Lin and Xing, 2007; Moadi et al., 2014). از طرف دیگر اتصال نانوذرات به سطح میکروب از تشکیل بیوفیلم میکروبی و در نتیجه رشد و تکثیر آنها جلوگیری کرده و پاک‌سازی میکروب‌ها را توسط سیستم ایمنی تسهیل می‌نماید (Jones et al., 2006; Amanda et al., 2010). مطالعات مختلفی در مورد اثرات ضد میکروبی نانوذرات فلزی مانند طلا و نقره صورت گرفته است. به‌عنوان مثال فیاض و همکاران (Fayaz et al., 2010) اثر سینرژیستیک نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک‌های رایج را بررسی نموده و دریافتند که اثر ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها در حضور نانوذرات افزایش یافته. که این افزایش در مورد باکتری‌های گرم منفی به علت اختلاف در دیواره سلولی بیشتر از گرم مثبت‌ها است. برخلاف یافته‌های حاصل از مطالعه فیاض و همکاران (Fayaz et al., 2010) در این مطالعه مشخص شد که اثر ضد باکتریایی نانو ذرات طلا روی هر دو گروه باکتری‌ها وجود داشته، ولی اثر در باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش تا حدودی بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. همچنین در تحقیقی دیگر یوون و همکاران (Yoon et al., 2007) نشان دادند که باسیلوس

- plants in nano biotechnology. Journal of Nanoparticle Research, 6: 377-382.
4. Asghari, J.H., Gorganli Doji, T., Ghaemi, A. 2014. Phytochemical and antimicrobial investigation of essential oil of *Ferula gummosa* Boiss. in Meighan region Semnan province. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 1(5): 28-35 (In Persian)
  5. Ashiri, S., Safari, J. 2013. Synthesis of gold and silver nanoparticles in plant substrates and their application. Nanotechnology, 1(186): 12-15. (In Persian)
  6. 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 of Science and Food Technology Journal, 3(4): 73-82. (In Persian)
  7. Cho, K. J., Park, T., Osaka, S. 2005. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochimica Acta, 51: 956-960.
  8. Dubeya, Sh. P., Lahtinen, M., Sillanpaa, M. 2010. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. Process Biochemistry, 45: 1065-1071.
  9. Dwivedi, A.D., Gopal, K. 2010. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 369: 27-33.
  10. Fayaz, A.M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Tchc, M., Kalaichelvan, P.T., Venketesan R. 2010. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine, 6: 103-109.
  11. Foroghird, S., Khatibzadeh, M. 2015. Green synthesis of silver nanoparticles used in conductive inks using sonochemical method. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 1(34): 1-9. (In Persian)
  12. Gardea-Torredey, J. L., Parsons, J. G., Gornez, E., Peralta-Videa, J., Troiani, H. E., Santiago P. 2002. Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. Nano letters, 2: 397-401.

در احیای یون‌های فلزی و سنتز نانوذرات فلزی نشان می‌دهد و می‌توان بیان کرد که این گیاه به‌عنوان منبع بالقوه تولید نانوذرات، می‌تواند استفاده شود و این نکته را به اثبات می‌رساند که استفاده از گیاهان به‌عنوان یک روش زیستی سریع و ارزان می‌تواند جایگزین روش‌های شیمیایی و فیزیکی در سنتز نانوذرات فلزی قرار گیرد. سنتز نانوذرات متأثر از پارامترهای گوناگونی هست که هر یک از این پارامترها در تولید بهتر این نانوذرات نقش ایفا می‌کنند. همچنین با توجه به اثبات فعالیت آنتی‌باکتریایی این نانوذرات، کاربرد آن در زمینه‌های مختلف برای پیشگیری از آلودگی‌ها و انتشار بیشتر عوامل عفونت پیشنهاد می‌شود و می‌توان گفت که گیاه دارویی آقطی علاوه بر نقش دارویی ویژه‌ای که دارد می‌تواند برای تولید نانوذرات طلا برای مصارف پزشکی و داروسازی استفاده گردد.

#### تشکر و قدردانی

پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را نسبت به حمایت‌های مالی دانشگاه سیستان و بلوچستان در راستای انجام این پژوهش اعلام نمایند.

#### References

1. Abdollahi, H., Javadi, H., Zand monfared, M.R. 2014. Synthesis of gold nanoparticles and study of their antimicrobial effects study on *Helicobacter pylori*. Journal of Qom University of Medical Sciences, 8(2): 44-50. (In Persian)
2. Amanda, S., Mohammad, F., John, J., Schlager, D., Syed, A. 2010. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. Journal of Nano medicine and Nanotechnology, 2: 544-568.
3. Armendariz, V., Herrera, I., Peralta-Videa, J. R., Jose-Yacaman, M., Troiani, H., Santiago, P., Gardea-Torresdey J.L. 2004. Size controlled gold nanoparticle formation by *Avena sativa* biomass: use of



13. Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K., J. Gamez, G., Dokken, K., Tehuacanero, S., Jose-Yacaman, M. 1999. Gold nanoparticles obtained by bio-precipitation from Gold (III) solutions. *Journal of Nanoparticle Research*, 1(3): 397-404.
14. Govindaraju, K., Tamilselvan, S., Kiruthiga, V., Singaravelu, G. 2010. Biogenic silver nanoparticles by *Solanum torvum* and their promising antimicrobial activity. *Journal of Bio pesticides*, 3(1): 394-399.
15. Grace, A.N., Pandian, K. 2007. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles: A brief study, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 297(1-3): 63-70.
16. Herrera, I., Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K.J., Peralta-Videa, R., Armendariz, V., Parsons, J.G. 2003. Binding of silver (I) ions by alfalfa biomass (*Medicago sativa*). Batch, time, temperature, and ionic strength studies. *Journal of Hazardous Substance Research*, 4: 1-16
17. Inbakandan, D., Venkatesan, R., Khan, S.A. 2010. Biosynthesis of gold nanoparticles utilizing marine sponge *Acanthella elongata*. *Colloids and Surfaces: B*, 81: 634-639.
18. Jones, G.L., Muller, C.T., O'Reilly, M., Stickler, D.J. 2006. Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 266-272.
19. Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ram Kumar Pandian, S., Kottaisamy, M., Barathmanikant, S., Kartikeyan, B., Gurunathan, S. 2010. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids Surfaces Bio interfaces*, 77(2): 257-262.
20. Kamali, M., Ghorashi, S.A.A., Asadollahi, M.A. 2012. Controllable synthesis of silver nanoparticles using citrate as complexing agent: characterization of nanoparticles and effect of pH on size and crystallinity. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 31(4): 21-28.
21. Kasture, M.B., Patel, P., Prabhune, A.A., Ramana, C.V., Kulkarni, A.A., Prasad, B.L.V. 2008. Synthesis of silver nanoparticles by sophorolipids: effect of temperature and sophorolipid structure on the size of particles. *Journal of Chemical Sciences*, 120 (6): 515-520.
22. Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B. 2011. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Polyalthia longifolia* Leaf Extract along with D-Sorbitol: Study of Antibacterial Activity. *Journal of Nanotechnology*, 2011: 1-5.
23. Lin, D.H., Xing, B.S. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150: 243-250.
24. Louis, C., Pluchery, O. 2012. Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology, imperial college press, London, United Kingdom, 395.
25. Marshal, A.T., Haverkamp, R.G., Davies, C.E., Parsons, J.G., Gardea-Torresdey, J.L., Agterveld, D.V. 2007. Accumulation of gold nanoparticles in *Brassica Juncea*. *International Journal of Phytoremediation*, 9: 197-206.
26. Mironov, I.V., Makotchenko, E.V. 2009. The hydrolysis of  $AuCl_4^-$  and the stability of aqua chlorohydroxo complexes of gold (III) in aqueous solution. *Journal of Solution Chemistry*, 38(6): 725-737.
27. Moadi, T., Ghahramanzadeh, R., Yosefi, M., Mohammadi, F. 2014. Synthesis of silver nanoparticles using four species plant and investigation of their antimicrobial activity. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 33(4): 1-9. (In Persian)
28. Mock, J.J., Barbic, M., Smith, D.R., Schultz, D.A., Schultz, S. 2002. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics*, 116: 6755-6759.
29. Mukkerjee, A., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S.R., Khan, M.I., Parishcha, R., Ajaykumar, P.V., Alam, M., Kumar, R., Sastry, M. 2001. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticles synthesis. *Nano letters*, 1: 515-519.

30. Narayanan, K.B., Sakthivel, N. 2011. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Journal of Advances in Colloid and Interface Science*, 169: 59-79.
31. Nejati, K., Davari, S. 2009. The effect of size of the nanoparticles on optical properties of plasmon line width. *Nanotechnology*, 5(142):44-46. (In Persian)
32. Philip, D. 2010. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus Rosasinensis*. *Physica E*, 42: 1417-1424.
33. Ramzani, F., Kazemi, B., Jebali, A. 2013. Biological synthesis of silver nanoparticles. *New cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 3(9):107-111. (In Persian)
34. Rai, A., Singh, A., Ahmad, A., Sastry, M. 2006. Role of halide ions and temperature on the morphology of biologically synthesized gold nanotriangles. *Langmuir*, 22 (2): 736-741.
35. Rai, M., Yadav, A., Gade, A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27: 76-83.
36. Ruparelia, J.P., Chatterjee, A.K., Duttagupta, S.P., Mukherji, S. 2011. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Free Radical Biology and Medicine*, 363: 481- 489.
37. Shah Mirzaee, H., Pazoki, M. 2007. A review on production of nanoparticles using microorganisms. *Nanotechnology*, 6 (119): 349-355. (In Persian)
38. Shankar, S. S., Ahmad, A., Pasricha, R., Sastry, S. 2003. Bio reduction of chloroaurate ions by *Geranium* leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. *Journal of Materials Chemistry*, 13: 1822-1826.
39. Shanker, S.S., Rai, A., Ankamwar, B., Singh, A., Ahmad, A., Sastry, M. 2004. Biological synthesis of triangular gold nanoprisms. *Nature Material*, 3: 482-488.
40. Shenya, D.S., Mathewa, J., 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.
41. Song, J.Y., Kim, B.S. 2009. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32 (1): 79-84.
42. Tajarrodi, A., Kiazadeh, A., 2007. The Comparison of the methods to synthesis of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 6(117): 217-222. (In Persian)
43. Thakkar, K.N., Mhatre, S.S., Parikh, R.Y. 2010. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine*, 6: 257-262.
44. Tiwari, D.K., Behari, J., Sen, P. 2008. Time and dose dependent antimicrobial potential of Ag nanoparticles synthesized by top-down approach. *Current Science*, 95: 647-655.
45. Vinoda, V.T.P., Saravanan, P., Sreedharc, B., Keerthi Devic, D., Sashidhard, R.B. 2011. A facile synthesis and characterization of Ag, Au and Pt nanoparticles using a natural hydrocolloid gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*). *Colloids and Surfaces B: Bio interfaces*, 83: 291-298.
46. Waghmar, S.S., Deshmukh, A.M., Sadowski, Z. 2014. Biosynthesis, optimization, purification and characterization of gold nanoparticles. *African journal of microbiology research*, 8(2): 138-146.
47. Wiley, B.J., Im, S.H., Li, Z.Y., McLellan, J., Siekkinen, A., Xia, Y. 2006. Maneuvering the surface plasmon resonance of silver nanostructures through shape-controlled synthesis. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(32): 15666-15675.
48. Yoon, K., Byeon, J.H., Park, J., Hwang, J. 2007. Susceptibility constant of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of Total Environment*, 373: 572-575.
49. Zakeri, M., Fasihi, J. 2011. Synthesis of gold nanoparticles using biomass of wheat and investigation of effective parameters. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 30(2): 35-41. (In Persian).