مطالعه اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff.) علیه برخی از میکروب‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی

امید عزیزیان شرمه [a*]، مژگان طاهری زاده [b]، محرم ولیزاده [c]، علی قاسمی [d]، مریم بیگمی [e]، افسانه کمالی دلجو [f]

[a] دانش آموخته کارشناسی ارشد فیتوشیمی، عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد زاهدان، دانشگاه آزاد اسلامی، زاهدان، ایران

[b] دانشجوی دکتری شیمی تجزیه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

[c] استادیار گروه گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

[d] مربی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

[e] دکتری بهداشت مواد غذایی، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

[f] دانش آموخته کارشناسی ارشد زراعت و اصلاح نباتات، عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد زاهدان، دانشگاه آزاد اسلامی، زاهدان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۴/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۸/۲۹

چکیده

مقدمه: رشد پاتوژن‌های غذایی از شایع‌ترین مشکلات صنایع غذایی است. فناوری نانو کاربرد وسیعی در تمام قسمت‌های صنایع غذایی دارد. پیشرفت مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها و اثر ضدمیکروبی بالای نانوذرات نقره، محققین را به سمت استفاده از نانوتکنولوژی سوق داده است. در این تحقیق، به سنتز زیستی نانوذرات نقره و بهینه سازی فاکتورهای موثر بر آن و اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره علیه برخی میکروب‌های مواد غذایی در جهت استفاده در بسته بندی‌های ضد میکروبی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: ابتدا نانوذرات نقره به روش زیستی توسط عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی سنتز شد. بمنظور دستیابی به نانوذرات نقره با شکل یکنواخت و اندازه کوچک، پارامترهای موثر بر سنتز شامل pH محلول واکنش، حجم عصاره، غلظت یون نقره و زمان، مورد مطالعه قرار گرفته و توسط اسپکتروفتومتری فرابنفش–مرئی بهینه سازی شدند. پس از بررسی خصوصیات نانوذرات توسط تکنیک های میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و پراش پرتو ایکس (XRD)، فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیا کلی*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *پنی سیلیوم اکسپانسوم* و *کلاویسپس پورپورا* از طریق دو روش انتشار چاهک در آگار و حداقل غلظت مهارکنندگی میکروب (MIC) بررسی شد.

یافته‌ها: نانوذرات نقره بیوسنتز شده با اندازه تقریبی ۲۵–۲۰ نانومتر فعالیت ضد میکروبی بالایی علیه تمامی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه داشته‌اند و این فعالیت وابسته به غلظت بوده است. بطوری که در غلظت‌های بسیار پایین نیز از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کردند.

نتیجه‌گیری: سنتز نانوذرات نقره به روش زیستی موجب حصول نانوذراتی با حداقل اندازه و کارایی بهتر آن‌ها می‌شود. این نانوذرات امروزه می‌توانند در صنعت غذایی به عنوان فیلترهای ضدعفونی کننده مواد غذایی، پوشش‌ها و بسته بندی مواد غذایی و پاکسازی خطوط تولید مواد غذایی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: *بیوسنتز، صنایع غذایی، فعالیت ضد میکروبی، گیاه کروفس کوهی، نانوذرات نقره*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: omid_aziziyan@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

با توجه به استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها و افزایش مقاومت در باکتری‌ها، یافتن جایگزین‌های مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها امری ضروری می‌باشد. به همین دلیل مطالعات گسترده‌ای در مورد پتانسیل استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی با منشأ گیاهی و نیز استفاده از نانوذرات برای کنترل و درمان عوامل بیماری‌زا صورت گرفته است (عزیزیان شرمه و همکاران، ۱۳۹۵). فناوری نانو اصطلاحاً به طراحی، بررسی خصوصیات، تولید و استفاده از ساختارها و ابزارها با کنترل شکل و اندازه در مقیاس نانومتریک (۱۰۰-۱ نانومتر) اطلاق می‌شود (Govindaraju *et al.*, 2010). بطور کلی روش‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی را می‌توان روش‌های متداول تولید نانوذرات نام برد (محصلی و پورسیدی، ۱۳۹۴). تولید نانوذرات با روش‌های فیزیکی و شیمیایی علاوه بر پرهزینه بودن، آلودگی‌های زیست محیطی را به همراه دارد و دارای عوارض جانبی فراوانی خواهند بود. در سال های اخیر استفاده از روش‌های زیستی مانند استفاده از گیاهان بدلیل ساده بودن، کم هزینه بودن، داشتن راندمان بالا، غیر سمی و سازگار با محیطزیست بودن، فراوان و قابل دسترس بودن، کامل بودن و کم بودن زمان واکنش، تولید نانوذرات با اشکال مختلف و یکنواخت بودن و کوچک بودن اندازه آن‌ها، توجه ویژه‌ای را نسبت به سایر روش‌ها به خود جلب کرده است (Wang *et al.*, 2009).

در میان نانومواد و نانوذرات، نانوذرات نقره به دلیل ویژگی وابسته به اندازشان توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده‌اند. یکی از مهمترین ویژگی این نانوذرات، فعالیت ضدمیکروبی بالای آن‌ها می‌باشد. بدلیل ویژگی ضدمیکروبی فوق العاده قوی نقره و سمیت اندک یون‌های آزاد آن برای سلول‌های پستانداران، علاقه برای استفاده از این نانوذرات جهت کاربردهای پزشکی (Ravichandran *et al.*, 2016) و غذایی در حال افزایش است (Bosetti *et al.*, 2002). نانوذرات نقره تولید شده با روش زیستی دارای ویژگی‌های مفیدی مانند میزان سطح بالا، اندازه کوچک و پراکندگی بالا است که مجموعه این عوامل سبب شده تا اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره در مقایسه با یون نقره افزایش چشمگیری داشته باشد (Kaviya *et al.*, 2011). نانوذرات نقره تولید شده به روش زیستی بعلت کوچک‌تر بودن و یکنواخت بودن شکل و اندازه آن‌ها، اثرات میکروب‌کشی بیشتری خواهند داشت. با توجه به افزایش اثرات ضد میکروبی نقره در مقیاس نانو، می‌توان از نانوذرات نقره برای مبارزه با عوامل بیماریزایی مختلف استفاده نمود بطوریکه امروزه با توسعه علم نانوتکنولوژی و تولید نانوذرات نقره، این نانوذرات کاربردهای فراوانی در علوم مختلف مانند پزشکی، داروسازی، آرایشی و بهداشتی و صنعت مواد غذایی پیدا کرده‌اند و استفاده از نقره و نانوذرات آن به عنوان ماده باکتری‌کش قدرتمند، رونق یافته است (Chaloupka *et al.*, 2010; Cho & Mirkin, 2002; Cao *et al.*, 2002). یکی از صنایعی که تاکنون در استفاده از فناوری نانو پیش قدم بوده است، صنایع غذایی می‌باشد. دانشمندان و صاحبان صنایع، استفاده‌های بالقوه‌ای از فناوری نانو را تقریباً در همه‌ی بخش‌های صنایع غذایی شناسایی کرده‌اند. دو نمونه از مهمترین این بخش‌ها عبارتند از: فراوری مواد غذایی (بهبود بافت یا کیفیت غذا، تولید مواد ژله‌ای) و بسته بندی مواد غذایی (محافظت از غذا و مواد غذایی در مقابل عوامل بیماری‌زا و در مقابل اشعه ماورابنفش) که در این بین نیز فناوری نانو در بسته بندی مواد غذایی کاربرد بیشتری داشته است. مطالعات گسترده ای بر روی اثر ضدمیکروبی و مهار کنندگی نانوذرات بویژه نانوذرات نقره بر پاتوژن های غذایی صورت گرفته است (Zarei *et al.*, 2014).

خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره و استفاده مفید از آن در بیوتکنولوژی و مهار اختصاصی میکروب‌ها در مطالعات مختلفی بررسی و به اثبات رسیده است، بطوریکه نانوذرات نقره می‌توانند با مهار سیستم تنفسی باکتری‌ها بر متابولیسم و نیز فرایندهای تولید مثل میکروارگانیسم‌ها اثرگذار باشند و باعث ایجاد آسیب‌هایی در غشای سلولی باکتری‌ها گردند (Christian *et al.*, 2008). اثر نانوذرات نقره بر روی باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی، کپک ها و قارچ ها نیز به اثبات رسیده است. علیرغم استقبال گسترده از استفاده از نانوذرات نقره، قوانین اتحادیه‌ی اروپا حد مجاز یون‌های نقره در مواد غذایی را به ۰/۰۵ mg Ag/Kg محدود کرده است (Fernandez *et al.*, 2009). افزایش جمعیت و کمبود مواد غذایی، سبب شده است تا در چند دهه اخیر توجه خاصی به مواد غذایی و راه‌های نگهداری آن‌ها صورت گیرد (سلمان‌پور احمدی و همکاران، ۱۳۹۴).

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش بیماری‌های غذایی، همراه با مشکلات اجتماعی و اقتصادی حاصل و پیشرفت مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، محققین و داروسازان را به سمت استفاده از نانوتکنولوژی سوق داده است (رضایی و کرمانشاهی، ۱۳۹۴). بسیاری از منابع غذایی خصوصاً منابع غذایی دامی، منبع تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها هستند که برخی از آن‌ها بصورت میکروارگانیسم‌های بومی شناخته می‌شوند که غیر بیماری‌زا هستند و مابقی بعنوان میکروارگانسم‌های بیماری‌زا هستند و موجب مسمومیت غذای می‌شوند که بعنوان مثال می‌توان به *لیستریا*، *استافیلوکوکوس*، *سالمونلا*، *اشرشیا کلی*، *شیگلا* و مانند آن اشاره کرد (شکر فروش و همکاران، ۱۳۹۱). تاکنون روش‌های مختلفی مانند سردسازی محصول بلافاصله پس از صید (برای دام، طیور و آبزیان) (Ozogul *et al.*, 2009)، بسته‌بندی در خلا و اتمسفر اصلاح شده (Ozogul *et al.*, 2004)، انجماد (Aubourg *et al.*, 2005) استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و مصنوعی (Banerjee, 2006)، بکارگیری اسانس‌ها (Frangos *et al.*, 2010)، روکش‌دار کردن و بسته‌بندی (Fan *et al.*, 2009)، اثر ترکیبی روکش غذایی و اسانس‌ها (Ojagh *et al.*, 2010) در افزایش ماندگاری محصولات و حفظ کیفیت آن‌ها بکار گرفته شده است که از بین این روش‌ها، تغییرات در سیستم بسته‌بندی مواد غذایی بیشتر از سایرین مورد استفاده قرار می‌گیرد.

بسته‌بندی‌های ضد میکروبی یکی از روش‌های بسته‌بندی فعال است. بسته‌بندی فعال سیستمی است که دارای خواص ممانعت کنندگی است که این خواص با افزودن عناصر دیگر به سیستم بسته بندی، ایجاد می‌شود. این سیستم‌ها توانایی نابودکردن یا جلوگیری از فعالیت‌های میکروارگانیسم پاتوژن که در غذاها هستند را دارند (پیرو موسوی و همکاران، ۱۳۹۲). بسته‌بندی‌های ضدمیکروبی با تأمین اهداف متعارف بسته‌بندی شامل: افزایش عمر ماندگاری، حفظ کردن کیفیت و تضمین سلامتی، موجب از بین بردن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌شوند. تاکنون مطالعات مختلفی بر روی اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره صورت گرفته است (Monteiro *et al.*, 2009; Stobie *et al.*, 2008). مطالعات نشان دادند که نانوذرات نقره بر ماندگاری بسیاری از میوه‌ها تأثیر چشمگیری داشته است (Chung & Chu, 2010; Ding *et al.*, 1998). گزارشات حاکی از آن است که استفاده از نانوذرات نقره در بستر نانوزیست کامپوزیت کیتوزان برای استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی، موجب مهار بسیاری از میکروب‌های بیماری‌زا شده است (ابراهیمی اصل و زارعی، ۱۳۹۴). نتایج بررسی‌ها نشان داد که کاربرد بسته بندی با پوشش زئولیت نقره (متوسط قطر ۵۰ نانومتر) منجر به ممانعت یا کاهش رشد باکتری *Alicyclobaciluus cidoterrestris* شده است (زندی ناوگران و همکاران، ۱۳۹۳). همچنین با استفاده از پلاستیک پلی‌اتیلنی محتوی ۰/۱ تا ۰/۸ درصد وزنی نانوذرات نقره، می‌توان زمان ماندگاری مواد غذایی را از یک هفته تا یک ماه بیشتر از بسته‌های زیپ‌دار معمولی افزایش داد (زندی ناوگران و همکاران، ۱۳۹۳). بسته‌های پلی اتیلنی حاوی نانوذرات نقره در مقایسه با بسته‌های معمولی اثر مفیدتری بر خواص فیزیکی، شیمیایی و حسی میوه عناب چینی نشان داده است (Chung & Chu, 2010). گزارشات حکایت از آن دارد که مواد بسته بندی محتوی نانوذرات نقره بطور چشمگیری میزان سرعت پوسیدگی و فساد را کاهش می‌دهد (Yang *et al.*, 2010; Qiuhui *et al.*, 2011). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که روش آغشته سازی با نانوذرات نقره نسبت به روش پوشش دهی سطوح اثر آنتی میکروبی بیشتری را موجب می‌شود (Furno *et al.*, 2004).

با توجه به اهمیت استفاده از نانوذرات نقره در بسته‌بندی‌های مواد غذایی و روش سبز سنتز این نانوذرات، مطالعه حاضر، به بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره بیوسنتز شده با منشأ گیاهی (عصاره آبی برگ گیاه *Kelussia odoratissima* Mozaff.) بر روی برخی از باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی شامل (*Bacillus cereus* PTCC 1154، *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 *Escherichia coli* PTCC 1763، *Salmonella tifimurium* PTCC 1609، *Listeria monocytogenes* 4b PTCC 1299، *Aspergillus Flavus* PTCC 5251، *Penicillium expansum* PTCC 5004 *Clavicpes purpurea* 5202) در استفاده این نانوذرات در فیلترهای ضدعفونی کننده مواد غذایی، پوشش‌ها و بسته‌بندی مواد غذایی و پاکسازی خطوط تولید مواد غذایی می‌پردازد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

- مواد شیمیایی و میکروارگانیسم‌ها

همه مواد شیمیایی مورد استفاده در این طرح پژوهشی، با بالاترین خلوص تهیه شدند. نمک نقره نیترات ($AgNO_3$) از شرکت سیگما- آلدریچ، سدیم هیدروکسید (NaOH) و هیدرو کلریدریک اسید (HCl)، از شرکت مرک و باکتری‌های استفاده شده شامل (*Staphylococcus aureus* PTCC 1431، *Bacillus cereus* PTCC 1154، *Escherichia coli* PTCC 1763، *Salmonella tifimurium* PTCC 1609، *Listeria monocytogenes* 4b 1299) و قارچ‌های استفاده شده شامل (*Aspergilus Flavus* PTCC 5004، *Penicillium expansum* PTCC 5251، *Clavicpes purpurea* PTCC 5202) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران[1] تهیه شدند و در حین آزمایش برای ساختن تمامی محلول‌ها و شستشوها از آب دوبار تقطیر استفاده شد.

- آماده سازی عصاره

گیاه کرفس کوهی با نام علمی *Kelussia odoratissima* Mozaff. در شهریور ماه، سال ۱۳۹۵ از منطقه تفتان از توابع شهرستان خاش واقع در استان سیستان و بلوچستان جمع آوری شد. مقداری از برگ تازه آن پس از شستشوی کامل با آب دوبار تقطیر و خشک کردن در دمای اتاق و بدون نور توسط آسیاب برقی کاملاً پودر شد. مقدار ۵ گرم از پودر آن با ۵۰۰ میلی‌لیتر از آب دوبار تقطیر مخلوط شد و اجازه داده شد تا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به همزده و حرارت داده شود. مخلوط حاصل پس از سرد شدن در دمای آزمایشگاه، توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف و برای حذف کامل ذرات معلق در آن به مدت ۳۰ دقیقه بوسیله دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm (دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. عصاره بدست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای استفاده‌های بعدی نگهداری شد.

- سنتز اولیه نانوذرات نقره

ابتدا مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره آبی گیاه به ۴ میلی‌لیتر از محلول نمک نقره نیترات با غلظت ۱ میلی‌مولار اضافه شد و مقدار pH محلول توسط دستگاه pH متر، عدد ۵/۶۳ قرائت شد. مشاهده شد که رنگ محلول به سمت قهوه‌ای متمایل شده است که این خود نشان دهنده سنتز موفق نانوذرات نقره بوده است. از محلول مورد نظر توسط اسپکتروفوتومتر فرابنفش- مرئی (Jenway 6715) طیف‌گیری شد.

- بررسی پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره

تأثیر مقدار pH بر سنتز نانوذرات: برای بهینه‌سازی مقدار pH، پنج سری محلول حاوی ۲ میلی لیتر عصاره و ۴ میلی لیتر محلول نمک نقره نیترات با غلظت ۱ میلی‌مولار ساخته و پس از تنظیم pH (۲، ۴، ۶، ۸ و۱۰)، حجم نهایی محلول در بالن حجمی به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. طیف‌های جذبی محلول‌ها توسط اسپکتروفتومتر فرابنفش- مرئی در محدوده جذبی ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر گرفته و pH بهینه انتخاب شد. برای تنظیم pH محلول از یکی از دو محلول NaOH و یا HCl با غلظت ۰/۱ مولار استفاده گردید.

تأثیر میزان عصاره بر سنتز نانوذرات: جهت بررسی تأثیر میزان عصاره مصرفی گیاه، مقادیر ۱ تا ۵ میلی‌لیتر از آن به ۴ میلی‌لیتر محلول نقره نیترات با غلظت ۱ میلی‌مولار افزوده شد و pH واکنش برابر pH بهینه تنظیم و مشابه مرحله قبل حجم نهایی محلول در بالن حجمی به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. از هر کدام از محلول‌های ساخته شده، جداگانه طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و در انتها مقدار حجم بهینه عصاره انتخاب شد.

تأثیر مقدار غلظت نمک نقره نیترات بر سنتز نانوذرات: برای بررسی تأثیر غلظت یون نقره (I)، مقدار بهینه شده از حجم عصاره به ۴ میلی‌لیتر از غلظت‌های متفاوت محلول نقره نیترات (۱ تا ۵) میلی‌مولار افزوده و پس از تنظیم pH بهینه، حجم نهایی محلول واکنش به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. از محلول‌های ساخته شده طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و غلظت بهینه انتخاب شد.

[1] Persian Type Culture Collection- PTCC

Archive of SID

www.SID.ir

تأثیر مدت زمان واکنش بر سنتز نانوذرات: با تنظیم شرایط بیوسنتز نانوذرات نقره در پارامترهای بهینه شده شامل (pH، میزان عصاره مصرفی و غلظت محلول نقره نیترات)، اثر زمان بر بیوسنتز نانوذرات نقره مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، محلولی با اعمال تمامی شرایط بهینه شده قبل، از لحظه ساخته شدن نمونه تا ۵ ساعت پس از آن آماده و از تمامی آن‌ها طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و زمان بهینه انتخاب شد.

- بررسی خصوصیات و ویژگی‌های نانوذرات بیوسنتز شده:

به‌منظور تأیید نتایج بدست آمده از طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی و تعیین توزیع شکل و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده با اعمال فاکتورهای موثر، توسط تکنیک‌های پراش پرتو ایکس[1] (Bruker-D8 advance) و میکروسکوپ الکترونی عبوری[2] (Zeiss-EM10C) مورد بررسی قرار گرفت.

- بررسی فعالیت ضدمیکروبی

نمونه‌های میکروبی با استفاده از محیط کشت لوریا برتانی برای باکتری‌ها و سابورد دکستروز برای قارچ‌ها و بر اساس روش‌های استاندارد احیاء گردیدند و به منظور سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲۴ ساعته هر میکروارگانیسم به صورت مجزا به لوله‌های آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر مولر هینتون براث تلقیح شد و سوسپانسیونی با کدورت معادل نیم مک فارلند آماده گردید. بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره آبی گیاه کرفس کوهی ابتدا با روش انتشار از چاهک در آگار (Agar Well Diffusion) انجام شد. بدین منظور از سوسپانسیون هر میکروب به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار برای باکتری‌ها و سابورد دکستروز آگار برای قارچ‌ها ریخته و با سواپ استریل در سه جهت به صورت انبوه کشت داده شد. سپس در سطح هر یک از پلیت‌های کشت داده شده چاهک‌هایی به قطر تقریباً ۶ میلی‌متر و به فاصله ۲ سانتی‌متری از هم ایجاد گردید و درون هر چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های آماده شده عصاره آبی با سمپلر ریخته شد. از آنتی بیوتیک‌های ضد باکتریایی آمپی سیلین و جنتامیسین و ضد قارچی کلوتریمازول به عنوان شاهد مثبت و از محلول DMSO به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. پس از اتمام کار محیط‌های کشت باکتریایی در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت و کشت‌های قارچی در انکوباتور ۲۸ درجه به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گشت و در نهایت پس از گذشت ۴۸-۲۴ ساعت، کشت‌های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفته و قطر هاله‌های تشکیل شده بر حسب میلی‌متر اندازه گیری و گزارش شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره مورد نظر، از روش رقت لوله‌ای استفاده گردید. بدین منظور از عصاره آبی آماده شده در لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث سری رقت های ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد. سپس به هر یک از لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده تلقیح گردید. یک لوله آزمایش حاوی محیط کشت و میکروب تلقیح شده ولی فاقد عصاره به عنوان شاهد مثبت و لوله آزمایش حاوی محیط کشت با رقت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره ولی فاقد باکتری به عنوان شاهد منفی نیز آماده گردید و در نهایت تمامی لوله‌های آزمایش به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه برای باکتری‌ها و دمای ۲۸ درجه برای قارچ‌ها و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انتقال داده شدند. بعد از انکوباسیون، هر لوله از نظر کدورت حاصل از رشد میکروارگانیسم بررسی و کمترین رقتی که در آن به علت اثر مهارکنندگی عصاره کدورتی ایجاد نشده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد (عزیزیان شرمه و همکاران، ۱۳۹۵).

برای بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی نانوذرات نقره سنتز شده نیز از روش‌های انتشار چاهکی و تعیین MIC استفاده شد. سری رقت‌های استفاده شده برای تعیین هاله عدم رشد در روش انتشار از چاهک ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و محلول ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نقره نیترات و آنتی بیوتیک ضد باکتریایی آمپی سیلین و جنتامیسین و آنتی بیوتیک ضد قارچی کلوتریمازول به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته

[1] X-ray diffraction

[2] Transmission Electron Microscopy

Archive of SID

www.SID.ir

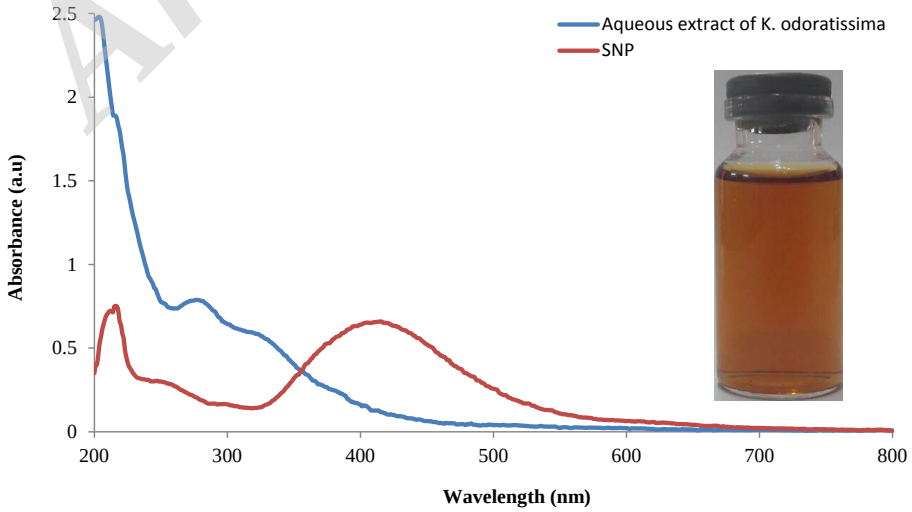
شد. برای تعیین MIC نیز برای هر باکتری و قارچ یک سری ۱۰ لوله ای با رقت های ۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذرات نقره استفاده گردید و به عنوان کنترل مثبت از لوله حاوی فقط محیط کشت همراه با میکروب تلقیح شده به کار گرفته شد و برای کنترل منفی و به منظور اطمینان از استریل بودن مراحل انجام کار و نیز سوسپانسیون نانوذرات نقره سنتز شده، درون یک لوله تنها محیط کشت و در لوله دیگری محیط کشت حاوی محلول با غلظت نیم میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات نقره اضافه گردید. سایر مراحل انجام کار همانند نحوه آماده سازی محیط‌های کشت، سویه‌های میکروبی استفاده شده و روش انجام، مشابه روش های استفاده شده در آزمایش مربوط به عصاره آبی گیاه بوده است.

یافته‌ها

- بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر سنتز نانوذرات

در سنتز اولیه نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی، عصاره بعنوان عوامل کاهنده (احیاکننده) و پایدارکننده نقش بازی می‌کند. شکل ۱ طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی و تغییر رنگ محلول حاوی نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه کرفس کوهی بدون اعمال شرایط بهینه را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۱، در طول موج ۴۰۳ نانومتر که مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره می‌باشد، عصاره فاقد پیک بوده که این مشاهده بیانگر آن است که وجود پیک در طول موج مورد نظر، بدلیل سنتز موفق و وجود نانوذرات نقره در محلول می‌باشد و عصاره هیچ گونه تداخل و مزاحمتی در طیف حاصل از نانوذرات نقره ایجاد نکرده است.

در بررسی تأثیر pH، پس از اضافه کردن ۲ میلی لیتر از عصاره به ۴ میلی لیتر از نمک نقره نیترات با غلظت ۱ میلی‌مولار، مشاهده شد که رنگ محلول به رنگ قهوه‌ای متمایل شده است (شکل ۱). که این رنگ دلیلی بر سنتز موفق این نانوذرات می‌باشد. مقدار pH محلول بدست آمده توسط دستگاه pH متر، عدد ۵/۶۳ قرائت شد. به جهت بررسی اثر فاکتور pH بر روند سنتز نانوذرات، pH های بالاتر و کمتر از مقدار اولیه مورد مطالعه قرار گرفت و از تمامی نمونه‌ها طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته شد (شکل ۲). نتایج نشان داد که در pH=۲ تغییری محسوسی در جذب ملاحظه نشده به طوری که می توان گفت، سنتز زیادی در این pH انجام نگرفته است. لیکن با افزایش تدریجی میزان pH محلول تا ۸، جذب محلول بصورت چشمگیری افزایش یافته است که دلیلی بر افزایش در مقدار سنتز نانوذرات نقره است. در pH=۸، طیفی متقارن با بیشترین مقدار جذب نسبت به مابقی pH ها، مشاهده شده است اما در pH بالاتر (pH=۱۰) افت شدید و محسوسی در مقدار جذب ملاحظه شده است. همچنین در این pH، طیف حاصل پهن‌تر نیز شده است. در نتیجه مقدار pH=۸ بعنوان pH بهینه و مناسب انتخاب شد.



شکل ۱- طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی و نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط آن

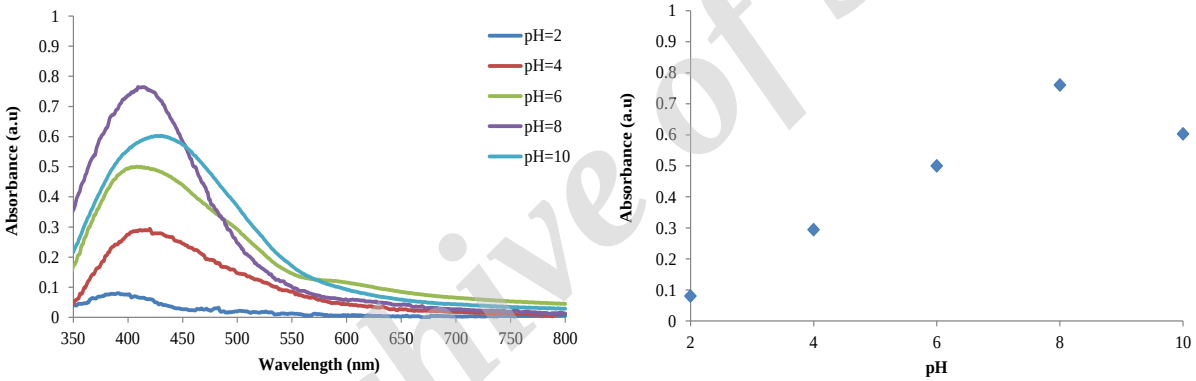
Archive of SID

www.SID.ir

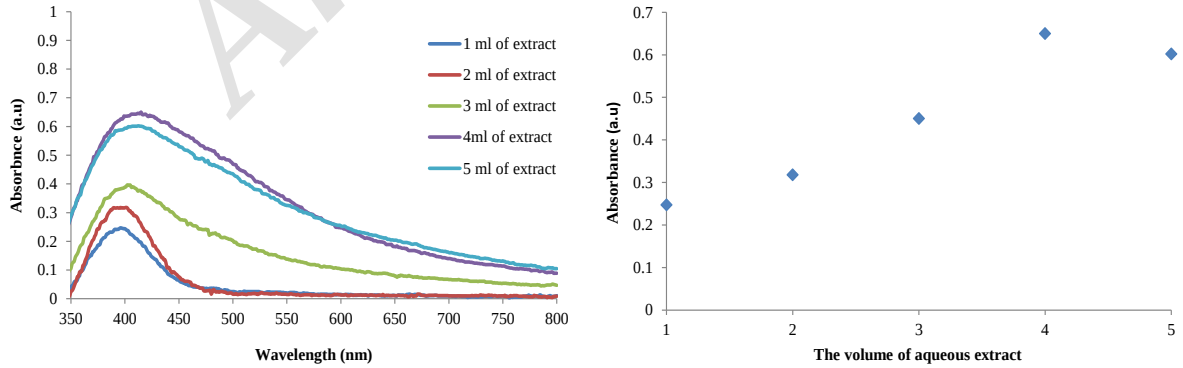
در بررسی تأثیر مقدار عصاره مصرفی بر روند سنتز نانوذرات نقره، ملاحظه شد که با افزایش میزان عصاره جذب مربوط به نانوذرات نقره افزایش قابل ملاحظه ای داشته است که این خود نشان دهنده افزایش در میزان سنتز نانوذرات با افزایش در میزان عصاره می‌باشد (شکل ۳). این افزایش تا ۴ میلی‌لیتر از عصاره ادامه دارد اما در حجم ۵ میلی‌لیتر از آن، افت زیادی در میزان جذب مشاهده شده است. در نتیجه مقدار ۴ میلی‌لیتر از عصاره بعنوان حجم بهینه و مناسب جهت سنتز این نانوذرات انتخاب شد.

تأثیر مقدار غلظت یون فلزی بر روند سنتز نانوذرات توسط شکل ۴ بخوبی نشان داده شده است. با توجه به شکل ۴، ملاحظه شد که با افزایش تدریجی در میزان غلظت یون نقره، جذب مربوط به محلول حاوی نانوذرات نقره افزایش چشمگیری داشته است. این افزایش تا غلظت ۴ میلی مولار از یون نقره ($AgNO_3$) ادامه دارد اما در غلظت ۵ میلی‌مولار، افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقدار جذب مربوط به نانوذرات دیده نشد و حتی تقریباً افت اندکی در میزان جذب مشاهده شده است. در نتیجه مقدار غلظت ۴ میلی‌مولار از نمک نقره نیترات بعنوان غلظت بهینه و مناسب انتخاب شد.

نتایج بررسی تأثیر زمان مجاورت محلول نقره نیترات با عصاره آبی گیاه بر روند واکنش نشان می‌دهند که با افزایش زمان برهمکنش میان واکنشگرها از لحظه اول، مقدار جذب افزایش می‌یابد و این افزایش در جذب تا ۹۰ دقیقه کاملاً صعودی و بصورت خط راست بوده است، اما از زمان ۹۰ دقیقه به بعد، تغییر محسوسی در مقدار این جذب مشاهده نشده است که این مشاهده، پایدار بودن نانوذرات حاصل را به اثبات می‌رساند. در نتیجه، زمان ۹۰ دقیقه بعنوان زمان بهینه و مناسب انتخاب شد (شکل ۵).



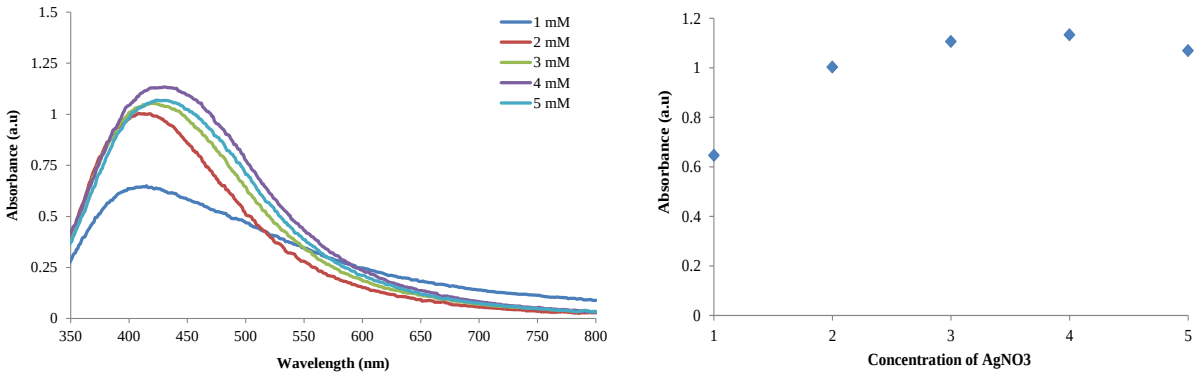
شکل ۲- طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره بیوسنتز شده و حداکثر جذب آن‌ها در pH های متفاوت (شرایط آزمایش: ۲ میلی لیتر عصاره، ٤ میلی لیتر نمک نقره نیترات با غلظت ۱ میلی مولار، متفاوت =pH، T= ۲۵°C)



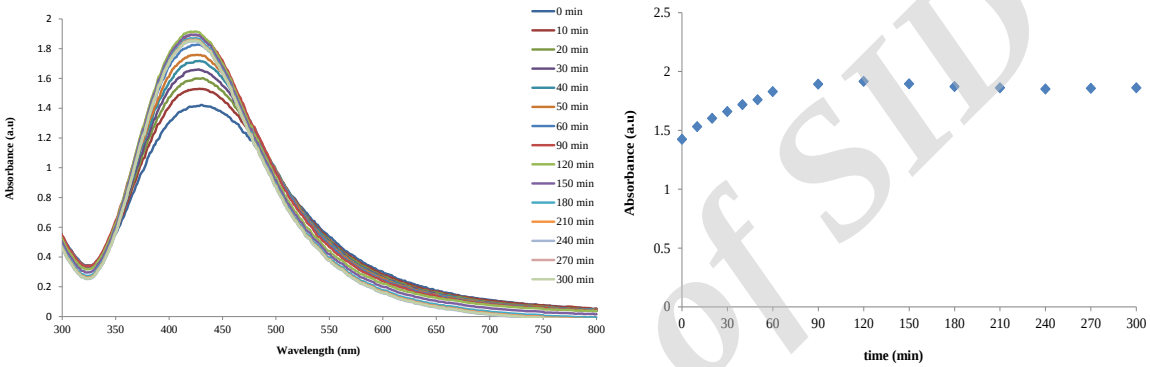
شکل ۳- طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره بیوسنتز شده و حداکثر جذب آن‌ها در حجم‌های مختلف از عصاره (شرایط آزمایش: حجم‌های متفاوت از عصاره (میلی لیتر)، ٤ میلی لیتر نمک نقره نیترات با غلظت ۱ میلی مولار، T= ۲۵°C ،pH= ۸)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ٤- طیف اسپکتروفتومتری فرابنش- مرئی نانوذرات نقره بیوسنتز شده و حداکثر جذب آن ها در غلظت های متفاوت یون نقره (شرایط آزمایش: ٤ میلی‌لیتر از عصاره، ٤ میلی لیتر نمک نقره نیترات با غلظت‌های متفاوت (میلی مولار)، pH= ٨، T= ٢٥ ° C)



شکل ٥- طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره بیوسنتز شده و حداکثر جذب آن ها در زمان های مختلف (شرایط آزمایش:٤ میلی‌لیتر از عصاره، ٤ میلی لیتر نمک نقره نیترات با غلظت ٤ میلی مولار، pH= ٨، T= ٢٥°C و زمان متفاوت)

- بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

توزیع شکل و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده توسط تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۶ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات نقره سنتز شده با اعمال تمامی شرایط بهینه شده را نشان می‌دهد. تصویر نشان می‌دهد که نانوذرات بدست آمده همگی تقریباً کروی بوده و اندازه متوسط آنها بین ۲۵-۲۰ نانومتر بوده است.

- بررسی طیف پراش پرتو ایکس (XRD)

برای بررسی بیشتر و مطالعه ساختار بلوری نانوذرات نقره سنتز شده، از آنالیز پراش پرتو ایکس استفاده شد (شکل ۷). میانگین اندازه دانه های بلوری با محاسبه پهنای 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 β، پهنای پیک‌ها در نصف ارتفاع ماکزیمم، λ، طول‌موج اشعه X برابر با ۱/۵۴ نانومتر، θ زاویه بین پرتو بازتابش و تابش و D اندازه دانه‌های بلوری می‌باشد. همانطوریکه در شکل ملاحظه می‌شود، در نواحی ۳۸/۱۳، ۴۴/۴۲، ۶۴/۴۱، ۷۷/۳۸ = 2θ نانو ذرات نقره پیک‌های واضحی وجود دارد که دلیلی بر سنتز موفق نانوذرات می‌باشد. آنالیز ساختاری نشان می‌دهد که نانوذرات نقره دارای ساختار بلوری با شاخص‌های میلر (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) در شبکه مکعبی می‌باشد. وجود قله‌های تیز در الگوها نشان‌دهنده درجه بالایی از بلورینگی برای نانوذرات می‌باشد. میانگین اندازه‌ی دانه‌های بلوری سنتز شده با محاسبه فرمول دبای- شرر ۱۹/۸۲-۲۴/۶۵ نانومتر برآورد شدند که با نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی

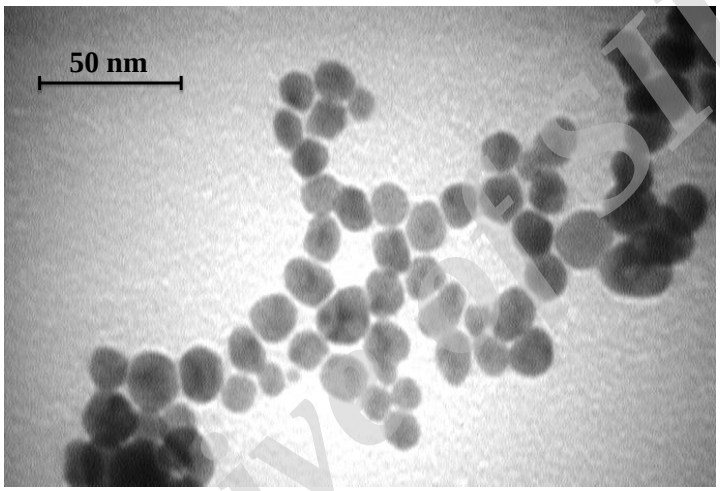
Archive of SID

www.SID.ir

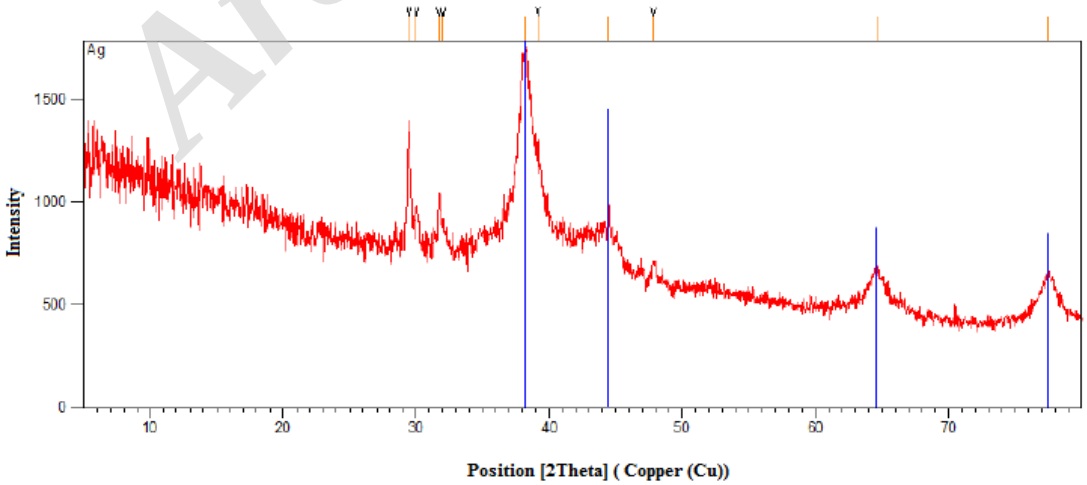
عبوری و نتایج به‌دست‌آمده از بررسی طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی کاملاً مطابقت دارد.

- بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی

نتایج بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره آبی گیاه کرفس کوهی نشان داد، عصاره اثر مهار کنندگی قابل توجه‌ای بر روی همه باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده دارد که با افزایش غلظت عصاره، این اثر مهارکنندگی بیشتر و قطر هاله عدم رشد نیز بیشتر می‌شود. نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه کرفس کوهی با روش انتشار چاهکی در جدول ۱ نشان داده شد. نتایج نشان می‌دهند که عصاره آبی بیشترین اثر بازدارندگی را علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۱۹ و ۱۷ میلی‌متر دارد. جدول ۲ نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره آبی گیاه آقطی علیه میکروب‌های منتخب به روش رقت لوله‌ای را نشان می‌دهد. بیشترین حساسیت را در بین باکتری‌های مورد آزمایش، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (MIC ۶/۲۵) و در بین قارچ ها، *آسپرژیلوس فلاووس* (MIC ۱۲/۵) و کمترین حساسیت به عصاره را باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* (MIC ۵۰) دارند.



شکل ٦- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره آبی گیاه کرفس کوهی (شرایط آزمایش:٤ میلی‌لیتر از عصاره، ٤ میلی لیتر نمک نقره نیترات با غلظت ٤ میلی مولار، pH= ٨ ،T= ٢٥°c و زمان ٩٠ دقیقه پس از سنتز)



شکل ۷- تصویر پراش پرتو ایکس نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی پس از اعمال تمامی شرایط بهینه شده

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد میکروبی در غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی با روش انتشار از چاهک (بر حسب میلی‌متر)

میکروارگانیسم‌ها	غلظت های مختلف عصاره آبی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)								
	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	٤۰۰	آمپی سیلین	جنتامیسین	کلوتریمازول	DMSO
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰	۱۱	۱۳	۱۶	۱۹	۲۷	۲۴	_	۰
باسیلوس سرئوس	۸	۱۰	۱۲	۱۵	۱۷	۲۵	۲۳	_	۰
اشرشیا کلی	۷	۸	۱۰	۱۲	۱۵	۲۴	۲۳	_	۰
سالمونلا تیفی موریوم	۵	۷	۹	۱۰	۱۲	۲۴	۲۲	_	۰
لیستریا مونوسیتوژنز	۹	۱۱	۱۲	۱۳	۱۶	۲۵	۲۳	_	۰
آسپرژیلوس فلاووس	۹	۱۰	۱۲	۱۴	۱۷	_	_	۲۸	۰
پنی سیلیوم اکسپانسوم	۷	۷	۹	۱۰	۱۲	_	_	۲۶	۰
فلاویسپس پوریورا	۸	۸	۱۱	۱۳	۱۶	–	–	۲۷	۰

جدول ۲- حداقل غلظت مهار کنندگی رشد میکروب (MIC) در غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی (بر حسب میلی‌گرم/میلی‌لیتر)

میکروارگانیسم‌ها	غلظت‌های مختلف عصاره آبی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)							
	۱/٥٦	۳/۱۲	٦/۲٥	۱۲/٥	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	+*	+	_**	-	-	-	-	-
باسیلوس سرئوس	+	+	+	+	-	-	-	-
اشرشیا کلی	+	+	+	+	+	-	-	-
سالمونلا تیفی موریوم	+	+	+	+	+	+	-	-
لیستریا مونوسیتوژنز	+	+	+	+	-	-	-	-
آسپرژیلوس فلاووس	+	+	+	_	_	-	-	-
پنی سیلیوم اکسپانسوم	+	+	+	+	+	-	-	-
فلاویسپس پوریورا	+	+	+	+	-	-	-	-

* توانایی رشد میکروارگانیسم در حضور غلظت مشخص عصاره

** عدم توانایی رشد میکروارگانیسم در حضور غلظت مشخص عصاره

- بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره آبی برگ گیاه کرفس کوهی

نتایج تست‌های ضد میکروبی مربوط به نانوذرات نقره بیوسنتز شده با روش‌های انتشار چاهکی و تعیین MIC به ترتیب در جداول ۳ و ۴ ارائه شده است. نانوذرات سنتز شده اثر میکروب کشی قابل توجه‌ای بر روی نمونه‌های مورد آزمایش نشان دادند، بطوریکه حتی در غلظت‌های خیلی کم نیز از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها جلوگیری کردند و این در حالی است که عصاره آبی گیاه در غلظت‌های استفاده شده مربوط به نانوذرات، فاقد هر گونه اثر ضد میکروبی بوده و همچنین اثر ضد میکروبی یون نقره نیز در مقایسه با نانوذرات نقره بسیار کمتر بوده است. نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات نقره بیشترین تأثیر را روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (قطر هاله ۲۴ میلی متر و µg/ml ۳/۱۲ MIC) و قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (قطر هاله ۲۱ میلی‌متر و µg/ml ۶/۲۵ MIC) داشته و کمترین تأثیر را روی باکتری *اشرشیا کلی* (قطر هاله ۱۸ میلی‌متر و و µg/ml ۲۵ MIC) داشته است.

بحث

نانوتکنولوژی به ساختن مواد در سطح اتمی، برای بدست آوردن خصوصیات منحصر به فرد آن‌ها می‌پردازد که این خصوصیات می‌توانند برای کاربردهای مطلوب مناسب باشند. نانوتکنولوژی می‌تواند بسیاری از مشکلات زیست پزشکی را حل نموده و سبب تحول در زمینه سلامت و داروسازی شود. گیاه کرفس کوهی یکی از گیاهان دارویی، خودرو و بومی در استان سیستان و بلوچستان می‌باشد که

Archive of SID

www.SID.ir

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

میکروارگانیسم‌ها	غلظت های مختلف نانوذرات نقره (میکروگرم بر میلی‌لیتر)									
	۱۰	۲۰	٤٠	٦٠	۱۰۰	محلول نمک نقره (۵۰ µg/ml)	آمپی سیلین (۵۰ µg/ml)	جنتامیسین (۵۰ µg/ml)	کلوتریمازول (۵۰ µg/ml)
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۱	۱۳	۱۵	۱۸	۲۴	۷	۲۸	۲۶	_
باسیلوس سرئوس	۹	۱۱	۱۳	۱۶	۲۱	۹	۲۷	۲۵	_
اشرشیا کلی	۰	۹	۱۳	۱۶	۱۸	۱۲	۲۶	۲۴	_
سالمونلا تیفی موریوم	۱۰	۱۳	۱۵	۱۶	۱۹	۱۱	۲۶	۲۵	_
لیستریا مونوسیتوژنز	۱۲	۱۴	۱۶	۱۹	۲۲	۱۰	۲۴	۲۳	–
آسپرژیلوس فلاووس	۱۰	۱۲	۱۵	۱۸	۲۱	۱۱	_	_	۲۷
پنی سیلیوم اکسپانسوم	۸	۹	۱۲	۱۵	۱۹	۹	_	_	۲۵
فلاویسپس پوریورا	۹	۱۱	۱۴	۱۷	۲۰	۱۰	_	_	۲۶

جدول٤ – حداقل غلظت مهار کننده رشد میکروب (MIC) در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (بر حسب میکروگرم/میلی‌لیتر)

میکرو ارگانیسم‌ها	غلظت های مختلف نانوذرات نقره (میکروگرم بر میلی‌لیتر)									
	۰/۷۸	۱/٥٦	۳/۱۲	٦/۲٥	۱۲/٥	۲٥	٥٠	۱۰۰	۲۰۰	٤۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	+*	+	−**	–	–	–	–	–	–	–
باسیلوس سرئوس	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
اشرشیا کلی	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
سالمونلا تیفی موریوم	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
لیستریا مونوسیتوژنز	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
آسپرژیلوس فلاووس	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
پنی سیلیوم اکسپانسوم	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
فلاویسپس پوریورا	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–

* توانایی رشد میکروارگانیسم در حضور غلظت مشخص نانوذرات

** عدم توانایی رشد میکروارگانیسم در حضور غلظت مشخص نانوذرات

به وفور در منطقه تفتان در این استان یافت می‌شود. در بیوسنتز نانوذرات فلزی بر پایه احیای زیستی، عصاره گیاه به‌عنوان احیاءکننده و پایدارکننده استفاده می‌شود. پژوهش‌های متعددی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای برگ این گیاه را گزارش کرده اند (Ahmadi *et al.*, 2007; Miraj *et al.*, 2016). بنابراین مطالعه پتانسیل عصاره گیاه کرفس کوهی می‌تواند راهکاری برای استفاده موثر از آن و روشی ارزان و زیست سازگار برای تولید نانوذرات باشد. بررسی انجام شده در این تحقیق نشان داد که عصاره پتانسیل بالایی برای تولید نانوذرات نقره دارد. تولید نانوذرات به این روش به صورت یک مرحله‌ای و مقرون به صرفه بوده در زمان بسیار کم، فرایند تکمیل می‌شود. تغییر در رنگ محلول از شفاف به قهوه‌ای و هم چنین افزایش میزان جذب محلول به دلیل احیاء یون نقره و تجمع آن‌ها به صورت نانوذرات نقره می‌باشد. فاکتورها و پارامترهای متفاوتی بر روند سنتز نانوذرات موثر هستند. در بررسی‌های فاکتورهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره، pH یکی از مهمترین فاکتورهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره می‌باشد (Waghmar *et al.*, 2014). پیش از این 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 نداشته و تنها اندازه آن‌ها را به میزان زیادی تحت تأثیر قرار می‌دهد (Gardea-Torresdey *et al.*, 1999; Armendariz *et al.*, 2004). در بررسی تأثیر فاکتور pH، مطالعات نشان می‌دهد که در pH های خیلی بالاتر از مقدار بهینه شده، یون‌های نقره هیدرولیز می‌شوند و موجب بوجود آمدن گونه‌های پایدار هیدروکسیدهای یون نقره می‌شود و در انتها از ورود این یون‌ها به واکنش احیای زیستی ممانعت می‌شود (Supraja *et al.*, 2013). همچنین در بعضی از مواقع

Archive of SID

www.SID.ir

طیف‌های جذبی در pH های بالاتر پهن می‌شود و حالت شارپ خود را از دست می‌دهد که این می‌تواند بدلیل تولید نانوذرات بزرگتر در pH های بالاتر باشد. پهن شدن طیف‌ها در اثر افزایش اندازه نانوذرات، پیش از این گزارش شده است(Shenya *et al.*, 2011). بدین دلیل اسیدیته ۸ بعنوان بهینه pH انتخاب شد. در سنتز زیستی نانوذرات توسط گیاهان، گیاه نقش کاهندگی یون‌های فلزی و همچنین تثبیت کردن این نانوذرات (پایدار سازی) را ایفا می‌کند (Philip, 2010). گیاه کرفس کوهی نیز دارای ترکیبات طبیعی فراوانی چون ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، فنل‌ها، فلاونوئیدها و... می‌باشد (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2013)، که این ترکیبات در احیای یون‌های فلزی و تبدیل آن‌ها به اتم‌های فلزی در مقیاس نانو و پایدار کردن نانوذرات سنتز شده نقش مهمی دارند. مطالعات نشان می‌دهند که، در غلظت‌های کمتر از میزان بهینه عامل احیاء کننده و پایدار کننده، عمل احیاء کنندگی و پایدار سازی نانوذرات بصورت کامل اتفاق نیافتاده و نانوذرات به میزان کمتر و با اندازه درشت تری به دست می‌آید. همچنین با افزودن مقدار بیشتر از میزان بهینه، ذرات پایدار کننده به دور خود بیشتر تجمع کرده که این عمل موجب می‌گردد پایدارسازی بطور کامل انجام نشده و ذرات با اندازه درشت تری بدست آید. با بی ثبات شدن نانوذرات، از جمعیت نانوذرات پایدار در محیط کم شده و جذب کاهش خواهد یافت. پژوهش‌ها حاکی از آن است که با افزایش در اندازه نانوذرات، میزان جذب کاهش یافته و متقابلاً با افزایش در توزیع ذرات، پهنای طیف‌ها افزایش می‌یاب (فروغی راد و خطیب زاده، ۱۳۹۴ ; Dubeya *et al.*, 2010) در نتیجه میزان ۴ میلی‌لیتر از عصاره بعنوان حجم مناسب برای احیای یون‌های نقره انتخاب شد. پژوهش‌های متعددی تأثیر غلظت یون فلزی بر سنتز نانوذرات را اثبات کرده اند. مطالعات نشان می‌دهد با افزایش غلظت یون فلز، جذب مشاهده شده نیز افزایش می‌یابد که این پدیده بدین علت است که با افزایش مقدار یون فلز، یون‌های بیشتری احیاء شده و نتیجتاً نانوذرات بیشتری تولید خواهد شد (Dwivedi & Gopol, 2010). اما کاهش بیش از حد یا افزایش نامحسوس در مقدار جذب مربوط به نانوذرات در اثر افزایش بیش از اندازه غلظت یون نقره، می‌تواند بدلیل چسبندگی نانوذرات و سنتز نانوذراتی با اندازه بزرگ‌تر باشد (Mock *et al.*, 2002). با توجه به دلایل ذکر شده غلظت ۴ میلی‌مولاری از یون نقره بعنوان غلظت مناسب انتخاب شد. زمان نیز همانند فاکتورهای مورد بحث، تأثیر بسزایی در سنتز و پایدار بودن نانوذرات دارد (Praveen Kumar *et al.*, 2007)، بطوریکه در واکنش های این چنینی، اگر سنتز کامل انجام نشده باشد، با گذشت زمان تولید نانوذرات بیشتر خواهد بود. همچنین عامل زمان، مهمترین فاکتور برای اثبات پایداری نانوذرات سنتز شده می‌باشد. بگونه‌ای که اگر با گذشت زمان، افزایش قابل توجه‌ای در میزان جذب نانوذرات نقره ملاحظه نشود، می‌توان اینگونه استنباط کرد که نانوذرات حاصل با گذر زمان کاملاً پایدار هستند. با توجه به دلایل عنوان شده، واکنش احیای یون های نقره توسط عصاره آبی کرفس کوهی در ۹۰ دقیقه کامل شده است.

مقاومت روز افزون باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به آنتی بیوتیک‌های متداول موجود در بازار و شیوع بیماری‌های عفونی که جهت درمان نیاز به آن داروها دارند و نیز توانایی بالقوه برخی از گیاهان جهت تولید مواد ضد میکروبی باعث گرایش محققان به جایگزینی گیاهان دارویی با آنتی بیوتیک‌ها شده است (کاشانی و همکاران، ۱۳۹۵). گزارشات حکایت از آن دارد که ترکیبات ترپنی و فنولی موجود در اسانس و عصاره گیاهان، با گروه‌های آمین و هیدروکسیل‌آمین غشا میکروارگانیسم‌ها (باکتری و قارچ) پیوند شده و با تخریب ساختار دیواره و رهاسازی لیپیدها به داخل سیتوپلاسم، سبب نفوذپذیری بیشتر سلول باکتری و قارچ و در نتیجه مرگ آن می‌شوند (چلبیان و همکاران، ۱۳۸۲). تحقیقات گسترده‌ای بر روی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی بر روی میکروارگانیم‌های مختلف انجام شده است (Taheri *et al.*, 2013). تفاوت حساسیت میکروارگانسم‌های متفاوت به مواد ضدمیکروب به علت ساختار متفاوت میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. همچنین غلظت‌های متفاوت عصاره نیز در میزان اثر مهارکنندگی موثر است که در مطالعات متعددی به آن اشاره شده است که با افزایش میزان غلظت عصاره، اثرات ضدمیکروبی گیاه و هاله عدم رشد نیز افزایش می‌یابد (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۹۰). نتایج بررسی اثرات ضدمیکروبی این مطالعه (اثر عصاره آبی گیاه کرفس کوهی) نشان داد که، عصاره اثر مهار کنندگی قابل توجه‌ای بر روی همه باکتری‌ها و

Archive of SID

www.SID.ir

قارچ‌ها دارد که با افزایش غلظت عصاره این اثر مهارکنندگی بیشتر و قطر هاله عدم رشد نیز بیشتر می‌شود. نتایج نشان می‌دهند که عصاره آبی بیشترین اثر بازدارندگی را علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۱۹ و ۱۷ میلی‌متر دارد. بیشترین حساسیت را در بین باکتری‌های مورد آزمایش، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (MIC ۶/۲۵) و در بین قارچ ها، *آسپرژیلوس فلاووس* (MIC ۱۲/۵) و کمترین حساسیت به عصاره را باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* (MIC ۵۰) دارند. همچنین با افزایش بیماری‌های غذایی، همراه با مشکلات اجتماعی و اقتصادی حاصل و پیشرفت مقاومت آن‌ها به آنتی بیوتیک‌های مختلف، محققین و داروسازان و صنایع وابسته به مواد غذایی را به سمت استفاده از نانوتکنولوژی سوق داده است (Mahendra *et al.*, 2009). تحقیقات نشان داده است که اندازه نانوذرات در اثر ضدمیکروبی آن‌ها بسیار تاثیرگذار است و هرچه این اندازه کوچکتر باشد، اثر ضدمیکروبی بیشتری از خود نشان می‌دهد به علاوه نوع باکتری نیز در حساسیت به نانوذرات موثر است (Clara *et al.*, 2011). تاکنون مطالعات متعددی جهت تعیین مکانیسم اثر نانوذرات بر روی میکروارگانیسم‌ها انجام گرفته است. نتایج تست‌های ضد میکروبی مربوط به نانوذرات نقره سنتز شده مربوط به این مطالعه نشان داد که نانوذرات سنتز شده اثر میکروب کشی قابل توجه‌ای بر روی نمونه‌های مورد آزمایش نشان دادند، بطوریکه حتی در غلظت‌های خیلی کم نیز از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها جلوگیری کردند و این در حالی است که عصاره آبی گیاه در غلظت‌های استفاده شده مربوط به نانوذرات، فاقد هر گونه اثر ضد میکروبی بوده و همچنین اثر ضدمیکروبی یون نقره نیز در مقایسه با نانوذرات نقره بسیار کمتر بوده است. نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات نقره بیشترین تأثیر را روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (قطر هاله ۲۴ میلی متر و µg/ml ۳/۱۲ MIC) و قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (قطر هاله ۲۱ میلی‌متر و µg/ml ۶/۲۵ MIC) داشته و کمترین تاثیر را روی باکتری *اشرشیا کلی* (قطر هاله ۱۸ میلی متر و و ۲۵µg/ml MIC) داشته است. به عبارت دیگر، *اشرشیا کلی* در مقایسه به *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاومت بیشتری نسبت به حضور نانوذرات نقره نشان داده است. دلیل مقاومت بیشتر *اشرشیا کلی* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* تفاوت بین ساختار غشا باکتری‌های مورد نظر می‌باشد و تفاوت در ضخامت پپتیدوگلیکان آن‌ها است (Kim *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2000). نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج بسیاری از مطالعات مشابه، مطابقت داشته است (رضایی و کرمانشاهی، ۱۳۹۴؛ Monteiro *et al.*, 2009) پژوهش‌های بسیاری، مبتنی بر واکنش‌های احتمالی بین نانوذرات با ماکرومولکول‌های موجودات زنده نشان می‌دهد که اختلاف بین بار منفی میکروارگانیسم و بار مثبت نانوذرات فلزی، بصورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذرات عمل کرده و باعث اتصال نانوذرات به سطح سلول شده و در نتیجه می‌تواند باعث مرگ سلول شود (Chaloupka *et al.*, 2010). در پی آزاد سازی تدریجی یون‌های نقره، این یون ها می توانند به گروه های دهنده الکترون مانند گوگرد، اکسیژن و نیتروژن در مولکول‌های زیستی موجود در میکرورگانیسم‌ها متصل شوند (اسدی اسدآبادی و همکاران، ۱۳۹۲). همچنین تشکیل کلونی، رشد سلول باکتری و تشکیل ماتریکس‌های فیلم زیستی فشرده میکروبی باعث ایجاد عفونت می‌شوند و نانوذرات از تشکیل این عامل‌های دفاعی میکروب‌ها در برابر سامانه ایمنی سلول میزبان جلوگیری می‌کنند (Cho *et al.*, 2005). مطالعات مختلفی درمورد اثرات ضدمیکروبی نانوذرات فلزی خصوصاً نانوذرات نقره صورت گرفته است. چو و همکاران در سال ۲۰۰۵ اعلام کردند که غلظت ppm ۱۰ و ۵ به ترتیب برای *استافیلوکوکس اورئوس* و *اشرشیا کلی* کمترین علظت بازدارندگی است اما غلظت ppm ۵۰ برای *استافیلوکوکس اورئوس* و ppm ۱۰۰ برای *اشرشیا کلی*، کشته است (Cho *et al.*, 2005). در مطالعه انجام شده بر روی فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره بر روی باکتری *اشرشیا کلی* ، یافته‌ها نشان داد که این فعالیت وابسته به غلظت نانوذرات بوده‌است (محصلی و پورسیدی، ۱۳۹۴). در مطالعه دیگر، نشان داده شد که اثرات نانوذرات نقره بر روی *اشرشیا کلی* بیشتر از *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد (Morambio-Jones & Hoek, 2010). در مطالعاتی دیگر با بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره روی باکتری‌های مختلف مانند *E.coli*، *P.aeroginosa* و *S.aureus* مشاهده شد که هرچند فعالیت نانوذرات وابسته به غلظت است ولی برای

Archive of SID
www.SID.ir

باکتری‌های گرم منفی به نسبت گرم مثبت این اثر چشمگیرتر بوده است (Gardea-Torresdey *et al.*, 2003; Kamal *et al.*, 2010; Dwivedi & Gopol, 2010). در واقع تفاوت پاسخ باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به نانوذرات نقره، به تفاوت موجود در ساختار دیواره سلولی آنها مربوط می‌باشد، بطوریکه باکتری‌های گرم منفی دیواره سلولی نازکتر و با استحکام کمتر داشته و نیز وجود لایه‌ای از لیپو پلی ساکارید در سطح بیرونی شان که سرشار از بارهای منفی است برهمکنش بین نانوذرات نقره که دارای بار مثبت ضعیف می‌باشند را با این سلول‌های باکتریایی تسهیل می‌کند. اتصال نانوذرات به سطح سلول ابتدا دیواره را سوراخ و سپس با ورود نانوذره به داخل سلول باکتری و ایجاد تداخل در مسیرهای مختلف متابولیکی و تولیدمثل در نهایت منجر به مرگ باکتری می‌شود (قربانی و همکاران، ۱۳۹۴). قابل ذکر است که غلظت نانوذره، اندازه و شکل نانوذره، سوش میکروبی و روش تولید نانوذره بر اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره موثر است (رضایی و کرمانشاهی، ۱۳۹۴؛Sondi & Salopek-Sondi, 2004). بگونه‌ای که طبق یافته های برخی از پژوهشگران، نانوذرات نقره با اندازه ۱۰-۱ نانومتر در صورتی که به یکدیگر نچسبیده باشند، دارای بیشترین اثر ضدمیکروبی است (Fernandez *et al.*, 2009) در مطالعه‌ای دیگر، نشان داده شد که باکتری‌های *استافیلوکوکس اورئوس* و *لیستریا منوسایتوژنز* حساسیت بیشتری نسبت به نانوذرات نقره در مقابل *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس* نشان دهد است (رضایی و کرمانشاهی، ۱۳۹۴). همچنین ثابت شده است که، نانوذرات نقره می‌توانند از آلودگی میکروبی مواد غذایی که رطوبت بالا دارند تا حدودی جلوگیری کنند (تدین و همکاران، ۱۳۹۵). اینکوروناتو و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی سیستم بسته بندی ضدمیکروبی حاوی نانوذرات نقره، نشان دادند که وجود این نانوذرات موجب افزایش ماندگاری این پنیرها شده است (Incoronato *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای دیگر که بر روی تاثیر بسته‌بندی با فیلم‌های نانویی بر کیفیت نان انجام شد، نتایج نشان داد که با افزایش درصد نانوذرات نقره تا ۲٪، شمارش کپک‌ها نسبت به نمونه شاهد با کاهش چشمگیری مواجه شده است و کمترین شمارش میکروبی مربوط به این غلظت از نانوذرات نقره بوده است (ستاری نجف آبادی، ۱۳۸۸). در پژوهشی دیگر، با قرار دادن لایه‌های نازکی از نقره روی سطوح رزین‌های سیلیکونی، فولاد ضد زنگ و کاغذ که همگی از نوع قابل استفاده جهت مواد غذایی بودند و بررسی اثر ضدمیکروبی آن روی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*، نشان داده شد که، شمار باکتری‌ها در حضور نانوذرات نقره پس از ۶ ساعت شروع به کاهش کرد و بعد از ۱۲ ساعت رشد باکتری ها کاملا متوقف (اسماعیل زاده و همکاران، ۱۳۹۱). همچنین مشاهده شده است که نانوذرات نقره آغشته شده به فیلم نگهداری مواد غذایی با غلظت ppm ۶/۶۹ دارای اثر مهارکنندگی خوبی علیه میکروارگانیسم‌های *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کاندیدا آلبیکنس* بوده است. اما در غلظت‌های بالاتر از آن با آنکه اثر ضدمیکروبی بیشتر شده بود، لیکن ویژگی‌های مکانیکی فیلم تضعیف شده بود (Jokar *et al.*, 2012). پدهای جاذب معمولا در بسته‌بندی‌های خرده فروشی جهت جذب آب و مایعات خارج شده از موادغذایی استفاده می‌شوند. این پدها به حفظ ظاهر تازه‌ی غذا کمک می‌کند. اما حتی زمانی که مایعات به چدهای جاذب جذب می‌شوند نیز احتمال رشد باکتری‌های بیماری‌زا عامل فساد وجود دارد. سلولز که جزئی از این پدها است می واند بعنوان حاملی برای نانوذرات نقره باشد (He *et al.*, 2003). مطالعات گسترده‌ای در خصوص استفاده از پدهای آغشته به نانوذرات نقره جهت حفظ و ماندگاری مواد غذایی صورت گرفته است (Fernandez *et al.*, 2010). البته گزارشاتی نیز مبنی بر استفاده از سایر نانوذرات جهت ارتقا کیفیت و سلامتی مواد غذای و از بین بردن پاتوژن‌های بیماری‌زا با منشا غذایی گزارش شده است (رضازاد باری و همکاران، ۱۳۹۳). علاوه بر مواد غذایی، استفاده از نانوذرات نقره جهت کاهش بار میکروبی آب آشامیدنی نیز بررسی شده است (Hadipour *et al.*, 2013).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات دیگر نشان می‌دهد که خواص ضدمیکروبی نانوذرات نقره برای گونه‌های متفاوت باکتریایی و قارچ‌های مورد مطالعه متفاوت و منحصر به فرد است. مقاومت نسبی برخی از گونه‌ها می‌تواند به خاطر ساختار غشای مقاوم در برابر

Archive of SID

www.SID.ir

خاصیت ضدمیکروبی نقره باشد. به همین خاطر باید غلظت نانوذرات نقره به کار برده شده در پوشش‌های نانویی (تا حداکثر مجاز اعلام شده توسط اتحادیه اروپا) با توجه به میزان مقاومت گونه‌های بیماری‌زا در برابر نقره تعیین گردد تا بار میکروبی مواد غذایی پس از گذشت بازه زمانی مورد نظر از حد مجاز تجاوز نکند. نانوذرات دارای نسبت سطح به حجم بسیار زیادی هستند و در مورد نقره به طور خاص، این افزایش سطح باعث شده که یک گرم نانوذرات نقره برای کشتن باکتری‌های صد مترمربع از یک سطح کافی باشد. سنتز نانوذرات نقره به روش زیستی موجب حصول نانوذراتی با حداقل اندازه و تاثیر گذاری و کارایی بهتر آن‌ها می‌شود. در نتیجه ویژگی نانوذرات نقره از لحاظ شکل و اندازه باعث شده که این نانوذرات بتوانند با تخریب غشاء فعالیت ضدمیکروبی بالایی از خود نشان دهند و مجموعه این خصوصیات باعث کاربرد فراوان نانوذرات نقره در پزشکی و بهداشت مانند ضد عفونی کردن آب‌های آشامیدنی، استفاده در فیلترهای کربنی و از بین بردن میکروب‌های هوا می‌شود. همچنین این نانوذرات امروزه می‌توانند به عنوان پوشش‌های ضدمیکروب در تجهیزات پزشکی و نیز تولید ژل های ضدمیکروب در درمان سوختگی‌ها و در صنعت مهم غذایی در فیلترهای ضدعفونی کننده موادغذایی، پوشش‌ها و بسته‌بندی موادغذایی و پاکسازی خطوط تولید موادغذایی استفاده شوند.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل اجرای طرح پژوهشی شماره ۹۵۴۵۸ می‌باشد که با حمایت‌های مالی و معنوی باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی صورت گرفته است که بدین وسیله سپاسگزاری می‌شود. همچنین پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند، مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به معاونت محترم پژوهشی و ریاست محترم باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان در جهت اجرا و اتمام این پژوهش اعلام نمایند.

منابع

ابراهیمی، ا.، خیامی، م. و نجاتی، و. (۱۳۹۰). مقایسه اثر ضد میکروبی اجزای مختلف بلوط ایرانی بر علیه باکتری *اشرشیاکلی*. فصلنامه افق دانش، جلد ۱۷، شماره ۴، صفحات ۱۷-۱۱.

ابراهیمی اصل، س. و زارعی، ا. (۱۳۹۴). سنتز و شناسایی نانو زیست کامپوزیت ضد میکروبی نقره /کیتوسان به روش شیمیایی برای استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی. مجله میکروب شناسی مواد غذایی، دوره ۲، شماره ۲، صفحات ۳۱-۲۱.

اسدی اسد آبادی، م.، خسروی دارانی، ک.، مرتضوی، ع.، حاج سید جوادی، ن.، آزاد نیا، ا.، کیانی هرچگانی، ا. و احمدی، ن. (۱۳۹۲). اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره تولید شده به روش احیای شیمیایی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی*. فصلنامه علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، جلد ۸، شماره ۴، صفحات ۹۲-۸۳.

اسماعیل زاده، ح.، خاکسار، ر.، سنگ پور، پ.، خانلرخانی، ع. و کریمی، ن. (۱۳۹۱). نسل جدید بسته بندی فعال مواد غذایی بر پایه‌ی نانوذرات: مرورب بر سازوکار و خواص ضدمیکروبی نانوذرات نقره. فصلنامه علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، **جلد ۷**، شماره ۵، صفحات ۸۴۴-۸۳۷.

پیرو موسوی، س. ف.، حیدری نسب، ا.، هاشمی پور رفسنجانی، ح. و رجبعلی پور چشمه گز، ع. ا. (۱۳۹۲). بررسی اثر فیلم‌های حاوی نانو ذرات نقره بر زمان ماندگاری رطب مضافتی. مجله علوم غذایی و تغذیه، جلد ۱۰، شماره ۴، صفحات ۷۲-۶۵.

تدین، ر.، میرزایی، س.، رحیمی، م. و سالاری، ح. (۱۳۹۵). بررسی تاثیر نانو ذرات نقره بر ماندگاری میوه پرتقال *Citrus Sinensis*. مجله پژوهش‌های گیاهی، دوره ۲۹، شماره ۲، صفحات ۳۲۷-۳۱۹.

چلبیان، ف.، نوروزی، ح. و موسوی، س. س. (۱۳۸۲). بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس هفت گونه گیاهی از تیره‌های مختلف بر روی برخی از باکتری‌های بیماری‌زا. فصلنامه گیاهان دارویی، جلد ۳، شماره ۷، صفحات ۴۲-۳۷.

رضازاد باری، ل.، رضازاد باری، م.، قاسم نژاد، م. و علیزاده خالد آباد، م. (۱۳۹۳). اثر نانوذرات تیتانیوم دی اکسید در ویژگی های انبار مانی و کنترل پوسیدگی پس از برداشت سه رقم انگور تازه خوری (سفید بی دانه، قزل اوزوم و ریش بابا). نشریه پژوهش های صنایع غذایی، جلد ۲۴، شماره ۳، صفحات ۳۲۴-۳۱۵.

رضایی، پ. و کرمانشاهی، ر. ک. (۱۳۹۴). بررسی تاثیر خواص ضدمیکروبی نانوذرات نقره، تیتانیوم دی اکسید بر دو

Archive of SID
www.SID.ir

گونه باکتری بیماری زا با منشا غذایی. مجله زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس، دوره ۶، شماره ۲، صفحات ۱۰-۱.

زندی ناوگران، خ. ب.، ناصری، ل. و اسمعیلی، م. (۱۳۹۳). تاثیر مواد بسته بندی محتوی نانوذرات نقره و سیلیکات رس بر ویژگی های کیفی پس از برداشت میوه گیلاس رقم سیاه مشهد. نشریه پژوهش های صنایع غذایی، جلد ۲۴، شماره ۱، صفحات ۱۰۲-۸۹.

ستاری نجف آبادی، م.، مینایی، س.، عزیزی، م. ح.، افشاری، ح. (۱۳۸۸). تاثیر بسته بندی با فیلم های نانویی بر ویژگی های ارگانولپتیکی و میکروبی نان. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، دوره ۴، شماره ۴، صفحات ۷۴-۶۵.

سلمان پور احمدی، ح. ع.، منوچهری، ح. و صفری، ر. (۱۳۹۴). بررسی تاثیر نانوذره کیتوزان و عصاره آویشن شیرازی نانوکپسوله شده در فساد میکروبی فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) تلقیح شده با لیستریا منوسایتوژنز (*Listeria monocytogenese*). نشریه شیلات (مجله منابع طبیعی ایران)، دوره ۶۸، شماره ۴، صفحات ۵۸۷-۵۷۷.

شکر فروش، س. ش.، رضوی روحانی، س. م.، کریم، گ.، کیانی، س. م. م.، رکنی، ن. و عباس والی، م. (۱۳۹۱). بررسی مطالعات انجام شده در زمیه آلودگی مواد غذایی با منشا دامی به باکتری های بیماری زا در ایران: بخش سوم: غذاهای دریایی. نشریه بهداشت مواد غذایی، دوره ۲، شماره ۴، صفحات ۳۲-۱۵.

عزیزیان شرمه، ا.، ولی زاده، ج.، نوروزی فر، م. و قاسمی، ع. (۱۳۹۵). بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از عصاره آبی گیاه آقطی. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دوره ۲۴، شماره ۵، صفحات ۱۰۸-۹۲.

فروغی راد، س. و خطیب زاده، م. (۱۳۹۴). تهیه سبز نانوذره های نقره مورد استفاده در جوهرهای رسانا به روش سونوشیمیایی. نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، دوره ۳۴، شماره ۱، صفحات ۹-۱.

قربانی، پ.، حمیدی علمداری، د.، نامور، ف. و یغمایی، پ. (۱۳۹۴). بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی نانو ذره نقره تولید شده از عصاره آبی میوه سماق به روش سبز. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دوره ۲۳، شماره ۷، صفحات ۱۸۹-۱۸۱.

کاشانی، ه.، طباطبایی یزدی، ف.، مرتضوی، س. ع. و شهیدی، ف. (۱۳۹۵). بررسی مقایسه ای اثر عصاره های میوه درخت کاج و آنتی بیوتیک های انتخابی بر تعدادی از میکروارگانیسم های شاخص عفونت و مسمومیت غذایی در شرایط آزمایشگاهی. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۱۳، شماره ۶۰، صفحات ۵۹-۴۹.

محصلی، ط. و پورسیدی، ش. (۱۳۹۴). سنتزسبز و تعیین مشخصات نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی بذر گیاه کنجد. نشریه زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس، دوره ۶، شماره ۱، صفحات ۲۰-۱۰.

Ahmadi, F., Kdivar, M. & Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of Kelussia odortissmia Mozaff. in model and food systems. Food Chemistry, 105(1), 57-64.

Armendariz, V., Herrera, I., Peralta-Videa, J. R. & Jose-Yacaman, M. (2004). Troiani H, Santiago P, et al. Size Controlled Gold Nanoparticle Formation by Avena Sativa Biomass: Use of Plants in Nanobiotechnology. Journal of Nanoparticle Research, 6(4), 377-385.

Aubourg, S. P., Piñeiro, C., Gallardo, J. M. & Barros-Velazquez, J. (2005). Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (Psetta maxima). Food Chemistry, 90(3), 445-452.

Banerjee, S. (2006). Inhibition of mackerel (Scomber scombrus) muscle lipoxygenase by green tea polyphenols. Food Research International, 39(4), 486-491.

Bosetti, M., Masse, A., Tobin, E. & Cannas, M. (2002). Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. Biomaterials, 23(3), 887-892.

Cao, Y. C., Jin, R. & Mirkin, C. A. (2002). Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. Science, 297(5586), 1536-1540.

Chaloupka, K., Malam, Y. & Seifalian, A. M. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. Trends Biotechnol, 28 (11), 580-588.

Cho, K. H., Park, J. E., Osaka, T. & Park, S. G. (2005). The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochim Acta, 51(5), 956-960.

Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M. & Hofmann, T. (2008). Nanoparticles: Structure, Properties, Preparation and Behavior in Environmental Media. Ecotoxicology, 17(5), 326-343.

Chung, N. & Chu, P. (2010). Effect of nano-packing on preservation quality of fresh strawberry (Fragaria ananassa L) during storage. Food Chemistry, 110,16248-1625.

Archive of SID

www.SID.ir

Clara, S., Donatella, D. & Sossio, C. (2011). Food packaging based on polymer nanomaterials. Progress in Polymer Science, 36(12), 1766-1782.

Ding, C. K., Chachin, K., Ueda, Y. & Imahori, Y. (1998). Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(10), 4144 - 4149.

Dubeya, Sh. P., Lahtinen, M. & Sillanpaa, M. (2010). Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. Process Biochemistry, 45(7), 1065–1071.

Dwivedi, A. G. & Gopol, K. (2010). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using Chenopodium album leaf extract, Colloids and Sufraces A: Physucochem Engineering Aspects, 369(1-3), 27-33.

Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y. & Chi, Y. (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. Food Chemistry, 115(1), 66-70.

Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. O., Cui, F. Z., Kim, T. N. & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Journal of Biomedical Material Research, 52(4), 662-668.

Fernández, A., Soriano, E., López-Carballo, G., Picouet, P., Lloret, E., Gavara, R. & Hernandez-Munoz, P. (2009). Preservation of aseptic conditions in absorbent pads by using silver nanotechnology. Food Research International, 42(8),1105-1112.

Fernández, A., Picouet, P. & Loret, E. (2010). Cellulose-silver nanoparticle hybrid materials to control spoilage-related microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon. International Journal of Food Microbial, 142(1-2), 222-228.

Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. & Sawaidis, I. N. (2010). Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. Food Microbiology, 27(1), 115-112.

Furno, F., Morley, K. S., Wong, B., Sharp, B. L., Arnold, P. L., Howdle, S. M., Bayston, R., Brown, P. D., Winship, P. D., Reid, H. J. (2004). Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? Journal of Antimicrob Chemotherap, 54(6), 1019–1024.

Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J, Gamez, G., Dokken, K., Tehuacanero, S. & José-Yacamán, M. (1999). Gold Nanoparticles Obtained by Bio-Precipitation from Gold (III) Solutions. Journal of Nanoparticle Research, 1(3), 397-404.

Gardea-Torresdey, J.L, Gomez, E., Peralta-Videa, J. R., Parsons, J. G., Troiani, H. & Jose-Yacaman, M. (2003). Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. Langmuir, 19(4), 1357-1361.

Ghasemi Pirbalouti, A., Setayesh, M., Siahpoosh, A. & Mashayekhi, H. (2013). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoids contents of three herbs used as condiments and additives in pickles products. Herba Polonica, 59(3), 51-62.

Govindaraju, K., Tamilselvan, S., Kiruthiga, V. & Singaravelu, G. (2010). Biogenic silver nanopar ticles by Solanum torvum and their promising antimicrobial activity. Journal of Biopesticides, 3(1), 394–399.

He, J., Kunitake, T. & Nakao, A. (2003). Facile in situ synthesis of noble metal nanoparticles in porous cellulose fibers. Chemistry of Materials, 15(23), 4401-4406.

Heidarpour, F., Wan Ab Karim Ghani, W. A., Fakhru'lRazi, A., Sobri, S., Heydarpour, V., Zargar, M. & Mozafari, M. R. (2013). Complete removal of pathogenic bacteria from drinking water using nano silver-coated cylindrical polypropylene filters. Clean Technologies and Environmental Policy, 13(3), 499-507.

Incoronato, A. L., Conte, A., Buonocore, G. G. & Del Nobile, M. A. (2011). Agar hydrogel with silver nanoparticles to prolong the shelf life of Fior di Latte cheese. Journal of Dairy Science, 94(4), 1697-1704.

Jokar, M., Abdul Rahman, R., Ibrahim, N. A., Abdullah, L. Ch. & Tan, Ch. P. (2012). Melt Production and Antimicrobial Efficiency of Low-Density Polyethylene (LDPE)-Silver Nanocomposite Film. Food and Bioprocess Technology, 5(2), 719-728.

Kamal, S. S., Sahoo, P. K., Vimala. J., Premkumar, M., Ram, S. & Durai, L. (2010). A novel green chemical route for synthesis of silver nanoparticles using Camellia sinensis. Acta Chimica Slovenica, 57(4), 808-812.

Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwanq, C. Y., Kim, Y. K., Lee, Y. S., Jeonq, D. H. & Cho M. H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomed, 3(1), 95-101.

Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., Muthumary, J. & Srinivasan, K. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 79(3), 594-598.

Archive of SID

www.SID.ir

Mahendra, R., Alka, Y. & Aniket, G. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances, 27(1), 76-83.

Marambio-Jones, C. & Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. Journal of Nanoparticle Research, 12(5),1531-1551.

Miraj, S., Jivad, N. & Kiani, S. (2016). A review of chemical components and pharmacological effects of Kelussia odoratissima Mozaff. Der Pharmacia Lettre, 8(1), 140-147.

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(15), 6755-6759.

Monteiro, D. R., Gorup, L. F., Takamiya, A. S., Ruvollo-Fiho, A. C., Carmago, E. R. & Barbosa, D. B. (2009). The growing importance of materials that prevent microbial adhesion. International Journal of Antimicrobial Agents, 34(2), 103-110.

Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. & Hosseini, S. M. H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry, 120 (1), 193-198.

Özogul, F., Polat, A. & Özogul, Y. (2004). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). Food Chemistry, 85(1), 49-57.

Özyurt, G., Kuley, E., Özkütük, S. & Özogul, F. (2009). Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (Mullus barbatus) and goldband goatfish (Upeneus moluccensis) during storage in ice. Food Chemistry, 114(2), 505-510.

Panacek, A., Kvitek, L., Prucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V. K., Nevecna, T. & Zboril, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. The Journal of Physical Chemistry B, 110 (33), 16248-1653.

Philip, D. (2010). Green synthesis of gold and silver nanoparticles using Hibiscus rosasinensis. Physica E, 42(5), 1417–1424.

Qiuhui, Hu., Yong, F., Yanting, Y., Ning, M. A. & Liyan, Z. (2011). Effect of nanocomposite-based packaging on postharvest quality of ethylene-treated kiwifruit (Actinidia deliciosa) during cold storage. Food Research International, 44(6), 1589-1596.

Ravichandran, V., Vasanthi, S., Shalini, S., Ali Shah, S. A. & Harish, R. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Atrocarpus altilis* leaf extract and the study of their antimicrobial and antioxidant activity. Materials Letters, 180, 264-267.

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(1), 254–262.

Sondi, I. & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interf Sci, 275(1), 177-182.

Stobie. N., Duffy, B., McCormack, D. E., Colreavy, J., Hidalgo, M., McHale, P. & Hinder, S. J. (2008). Prevention of Staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol–gel coating. Biomaterials, 29(8), 963–969.

Supraja, S., Mohammed Ali, S., Chakravarthy, N., Jayaprakash Priya, A., Sagadevan, E., Kasinathan, M. K. Sindhu, S. & Arumugam, P. (2013). Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Cynodon Dactylon Leaf Extract. International Journal of ChemTech Research, 5 (1), 271-277.

Taheri, A., Seyfan , A., Jalalinezhad , S. & Nasery, F. (2013). Antibacterial effect of myrtus communishydro-alcoholic extract on pathogenic bacteria. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences, 15(6), 19-24.

Wang, Y., He, X., Wang, K., Zhang, X. & Tan, W. (2009). Barbated Skull cup herb extract-mediated biosynthesis of gold nanoparticles and its primary application in electrochemistry. Colloids and surfaces B, Bio interfaces, 73 (1), 75-79.

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

Yang, F. M., Li, H. M., Li, F., Xin, Z. H., Zhao, L. Y., Zheng, Y. H. & Hu, Q. H. (2010). Effect of nano-packing on preservation quality of fresh strawberry (Fragaria ananassa Duch. cv Fengxiang) during storage at 4 degrees c. J Food Sci, 75(3), 236-240.

Zarei, M., Jamnejad, A. & Khajehali, E. (2014). Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. Jundishapur Journal of Microbiol, 7(1), 1-11.

Archive of SID

www.SID.ir