



بهینه سازی و مشخصه یابی سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه پنیرباد *Withania coagulans* (Stocks) Dunal و مطالعه فعالیت ضد میکروبی آنها

محرم ولیزاده

استادیار، عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران
m.valizadeh@anrs.usb.ac.ir

امید عزیزیان شرمه *

کارشناس ارشد فیتوشیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
omid_azizian@yahoo.com

علی قاسمی

مربی، عضو هیأت علمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
qasemi.ali9@gmail.com

مژگان طاهری زاده

کارشناس ارشد فیتوشیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
m_taherizade66@yahoo.com

چکیده

نانوذرات نقره به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی در زمینه های مختلف از جمله پزشکی، صنعت و صنایع غذایی کاربرد وسیعی دارد. در سال های اخیر استفاده از روش های زیستی بدلیل ساده بودن، کم هزینه بودن، داشتن راندمان بالا، غیر سمی و سازگار با محیط زیست بودن، توجه ویژه ای را نسبت به سایر روش ها به خود اختصاص داده است. مطالعه حاضر اولین گزارش سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی ساقه گیاه پنیرباد می باشد. به منظور آماده نمودن عصاره، ۱ گرم از پودر گیاه در ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. پس از آماده نمودن عصاره، ۲ میلی لیتر از آن به ۴ میلی لیتر از نمک نیترات نقره ($AgNO_3$) با غلظت ۱ میلی مولار افزوده شد. مشاهده شد که پس از احیای یون های نقره (I) توسط عصاره، رنگ محلول به رنگ قهوه ای تغییر رنگ داده است. به منظور بدست آمدن نانوذرات با شکل و اندازه یکنواخت، فاکتورهای موثر بر سنتز نانوذرات، مانند pH محیط واکنش، حجم عصاره، غلظت نمک نیترات نقره، دما و زمان واکنش مورد بررسی قرار گرفتند و با استفاده از اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی بهینه شدند. نانوذرات نقره حداکثر جذب را در ۴۰۵ نانومتر نشان دادند. برای مشخصه یابی نانوذرات از تکنیک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده شد. مشخص شد که نانوذرات سنتز شده کروی شکل اند و میانگین اندازه آنها بین ۹۶۵-۱۵/۴۴ نانومتر است. در انتها خواص ضد میکروبی نانوذرات بر روی پنج گونه باکتری و دو گونه قارچ بیماری زا با روش انتشار چاهکی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد، نانوذرات نقره فعالیت ضد میکروبی خوبی علیه میکروارگانیزم های مورد استفاده داشتند.

واژگان کلیدی: سنتز زیستی، نانوذرات نقره، گیاه پنیرباد، میکروسکوپ الکترونی عبوری

مقدمه

نانوتکنولوژی، فناوری جذاب و به سرعت در حال پیشرفتی است که به ما امکان می دهد در ساخت ابزارها، مواد و ساختارها، آنها را در سطح مولکولی و اتمی دستکاری کرده و بتوانیم در مقیاس نانو (۱۰۰-۱ نانومتر) درک بهتری از پدیده ها و کارایی خواص مواد داشته باشیم (Ahmad et al, 2003). بطور اساسی، ویژگی های مربوط به نسبت بین سطح و حجم ماده در مقیاس نانومتریک تغییرات چشمگیری از خود نشان می دهند (عشیری و صفری، ۱۳۹۲). نانوذرات فلزی بخاطر خصوصیات جالب توجه الکتریکی، اپتیکی، شیمیایی و مغناطیسی که از خود نشان داده اند، مورد بررسی های فراوان قرار گرفته اند (فرید و بتوندی، ۱۳۹۱). در این بین، نانوذرات نقره علاوه بر داشتن خصوصیات ذکر شده، به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی در زمینه های مختلف از جمله پزشکی، صنعت و صنایع غذایی کاربرد وسیعی دارد (Albrecht et al, 2007). اثرات ضد باکتری نانوذرات نقره از نقره بسیار بیشتر بوده و این امر به علت نسبت بالای سطح به حجم در نانوذرات نقره است که موجب بالا رفتن تاثیر نانوذرات نقره بر روی باکتریها می شود (Kaviya et al, 2011). با این که مکانیسم اثر نانو ذرات نقره بر روی میکروب ها کاملاً مشخص نشده است اما در مورد باکتری ها، احتمال می رود که یون های نقره باعث ایجاد آسیب هایی در غشای سلولی باکتری ها می گردند (Marambio-Jones and Hoek, 2010). روش های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی را می توان روش های اصلی سنتز نانوذرات نام برد (Nanda et al, 2009). روش های شیمیایی متداول نیز شامل احیای شیمیایی (Valodkar et al, 2011)، احیا به روش سونو شیمی (Ziarati et al, 2013) و استفاده از پرتو مایکروویو (Zhu et al, 2004) می باشند. در اکثر روش های احیای شیمیایی، از یک عامل کاهنده شیمیایی (مانند سدیم بور هیدرید) برای کاهش یون های فلزی و تثبیت کننده (مانند پلی وینیل پیرولیدون) برای کنترل رشد ذرات و جلوگیری از تجمع استفاده می شود (رمضانی و همکاران، ۱۳۹۱). از روش های فیزیکی می توان به استفاده از لیزر (Lee et al, 2001) و تابش الکترون (Bogle et al, 2006) اشاره نمود. با توسعه و گسترش علوم مرتبط با فناوری نانو و روش های مبتنی بر تولید نانوذرات، نگرانی برای آلودگی محیط زیست و تولید محصولات جانبی خطرناک، دوچندان شده است (Supraja et al, 2013). در سال های اخیر استفاده از روش های بیولوژیکی مانند استفاده از قارچ ها (Gajbhiye et al, 2009)، باکتری ها (Shahverdi et al 2007)، توده زیستی و عصاره گیاهان (Shankar et al, 2002) بدلیل ساده بودن، کم هزینه بودن، داشتن راندمان بالا، غیر سمی و سازگار با محیط زیست بودن، توجه ویژه ای را نسبت به سایر روش ها به خود اختصاص داده است (محصلی و پورسیدی، ۱۳۹۴). استفاده از عصاره گیاهان علاوه بر دلایل گفته شده بدلیل دسترسی آسان، کامل بودن واکنش، کم بودن زمان واکنش، تولید نانوذرات با اشکال مختلف و یکنواخت و همگن بودن اندازه ذرات، بیشترین اهمیت را به خود اختصاص داده است (عشیری و صفری، ۱۳۹۲). گیاهان به علت داشتن ترکیبات ثانویه ای چون ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و تریپنی و دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی به واسطه یک فرایند بیولوژیکی برای سنتز نانوذرات بسیار سودمند هستند (محصلی و پورسیدی، ۱۳۹۴). پژوهشگران زیادی، سنتز نانوذرات نقره با استفاده از گیاه را گزارش کرده اند.

Gardea et al, () و همکاران برای اولین تولید نانوذرات نقره را توسط گیاهان گزارش کرده اند (Gardea-Torresdey 2003). Furno نیز سنتز نانوذرات نقره با استفاده از برگ گیاه *Cinnammum canphora* در اندازه های بین ۵۵-۸۰ نانومتر را گزارش کرده است (Furno et al, 2004). همچنین گیاهان *Camellia* و *Chenopodium album* و *sinensis* توانستند یون های نقره را در اندازه های به ترتیب ۶-۲ و ۲۰ نانومتر کاهش دهند (Dwivedi and Gopal, 2010 and Kaylan kamal et al, 2010). همچنین تولید نانوذرات نقره با استفاده از عصاره های *Tanacetum vulgare* (Dubey et al, 2010)، *Hibiscus rosa sinensis* (Vijayaraghavan et al, 2011)، *Emblica officinalis* (Ankamwar et al, 2005) *Aleo vera* (Chandran et al, 2006) و *Glycyrrhiza glabra* (Dinesh et al, 2012) نیز گزارش شده است.

گیاه دارویی پنیر باد با نام علمی *Whithania coagulans* متعلق به خانواده *Solanaceae*، گیاهیست پایا، درختچه ای، با بوته هایی به ارتفاع ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی متر که بصورت خودرو در سراسر پاکستان و همچنین جنوب غربی هند و



افغانستان می روید. در ایران پراکنش این گیاه محدود به منطقه بلوچستان در استان سیستان و بلوچستان است و عمدتاً در رویشگاه های طبیعی شهرستان های سراوان و خاش رشد می کند (ولیزاده و همکاران، ۱۳۹۴). مطالعه حاضر به بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی ساقه این گیاه و تاثیر این نانوذرات بر روی چند گونه باکتری و قارچ بیماری زای انسانی می پردازد. فاکتورهای های موثر بر سنتز نانوذرات نظیر: pH واکنش، میزان عصاره، غلظت یون نقره (I)، دما و زمان واکنش جهت بدست آوردن نانوذراتی یکنواخت تر و با اندازه کوچکتر مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بهینه کردن آنان از تکنیک اسپکترومتری فرابنفش-مرئی و برای مشخصه یابی از تکنیک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده شد.

بخش تجربی

مواد شیمیایی و میکروارگانیسم ها

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در مطالعه حاضر، با خلوص بالا تهیه شدند. نمک نترات نقره ($AgNO_3$)، هیدرو کلریدریک اسید (HCl) و سدیم هیدروکسید (NaOH) از شرکت مرک و باکتری های استفاده شده (استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی موریوم، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا) و قارچ های مورد استفاده (آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران^۲ تهیه شدند. برای محلول سازی و شستشو از آب دوبار تقطیر استفاده شد.

دستگاهها

طیف های جذبی فرابنفش-مرئی، توسط دستگاه طیف سنجی Jenway مدل ۶۷۱۵ ثبت شدند. pH واکنش با استفاده از دستگاه pH متر مدل pH lab 827 اندازه گیری شد. تمامی اندازه گیری های وزنی از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم مدل Kern و برای کلیه جداسازی ها، از سانتریفیوژ Sigma مدل 3-30k و اولتراسونیک مدل DSA 100 استفاده شد. در انتها بوسیله ی دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری، مدل Zeiss-EM10C-80 KV، اندازه و شکل نانوذرات سنتز شده بدست آمد.

روش کار

آماده سازی عصاره

گیاه دارویی پنیرباد با نام علمی *Whithania coagulans*، یکی از گیاهان دارویی و خودرو در جنوب شرق ایران می باشد (شکل ۱). در این مطالعه، گیاه مورد نظر از باغ بوتانیک مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی دانشگاه سیستان و بلوچستان جمع آوری و پس از جدا کردن ساقه ی آن ها، به آزمایشگاه منتقل شد. پس از شستشوی کامل و حذف بقایای خاک و خشک کردن در دمای آزمایشگاه و به دور از نور، نمونه ها کاملاً پودر شدند. ۱ گرم از پودر بدست آمده با ۱۰۰ میلی لیتر از آب دوبار تقطیر، برای مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به هم زده و حرارت داده شد. پس از سرد شدن مخلوط حاصل در محیط آزمایشگاه، عمل صاف کردن توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ انجام و برای حذف ذرات معلق در محلول، نمونه به مدت ۲۰ دقیقه بوسیله دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد. عصاره بدست آمده، برای استفاده های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

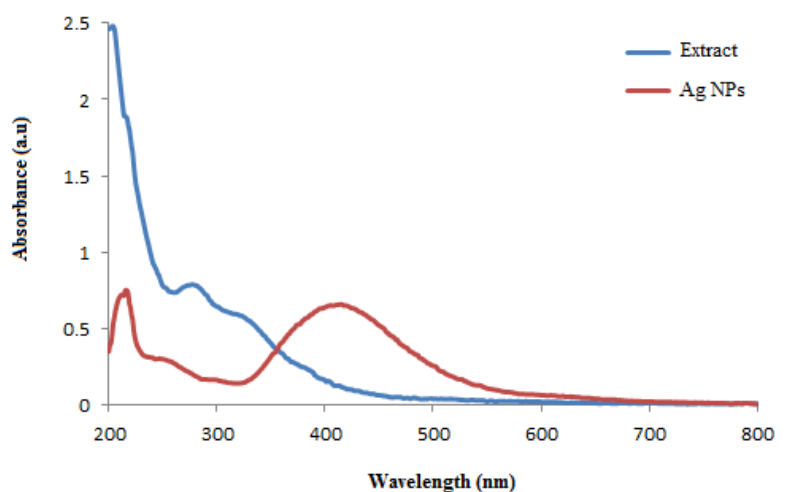


شکل ۱: گیاه پنیر باد (*Whithania coagulans*)

ساختن محلول استوک نیترات نقره و سنتز نانوذرات نقره
ابتدا محلول ۱ میلی مولاری نیترات نقره ساخته شد. پس از ساختن محلول نیترات نقره، مقدار ۴ میلی لیتر از آن به ۲ میلی لیتر از عصاره گیاه اضافه شد. ملاحظه شد که با اضافه نمودن عصاره به محلول نیترات نقره، رنگ محلول به رنگ قهوه ای تغییر رنگ داده که این مشاهده نشان دهنده سنتز موفق نانوذرات نقره می باشد. از محلول مورد نظر طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی گرفته شد (شکل ۲). نانوذرات نقره سنتز شده بیشترین جذب را در طول موج ۴۰۵ نانومتر نشان داده است که مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره می باشد (شکل ۳). سپس فاکتورهای موثر بر سنتز نانوذرات نقره نظیر: مقدار pH محلول واکنش، حجم عصاره مورد استفاده، غلظت نمک نقره (I)، دمای و زمان انجام واکنش جهت بدست آوردن نانوذراتی با شکل یکنواخت تر و اندازه کوچکتر مورد مطالعه قرار گرفت.



شکل ۲: محلول قهوه ای رنگ نانوذرات نقره سنتز شده



شکل ۳: طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی عصاره آبی گیاه پنیرباد و محلول حاوی نانوذرات نقره

بهینه سازی فاکتورهای موثر بر سنتز نانوذرات

بهینه سازی pH واکنش

برای بهینه نمودن مقدار pH محلول واکنش، پنج سری محلول حاوی ۲ میلی لیتر عصاره و ۴ میلی لیتر محلول نمک نقره (I) با غلظت ۱ میلی مولار با pH های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ آماده و از هر یک از نمونه ها بصورت مجزا طیف های جذبی توسط اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و pH بهینه انتخاب شد. برای تنظیم pH محلول از یکی از دو محلول سدیم هیدروکسید و یا هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۱ مولار استفاده شد.

بهینه سازی مقدار حجم عصاره

برای بهینه نمودن مقدار عصاره‌ی مورد استفاده برای احیای یون نقره، مقادیر ۱ تا ۵ میلی لیتر از عصاره به ۴ میلی لیتر نمک نقره (I) با غلظت ۱ میلی مولار اضافه و pH واکنش برابر pH بهینه تنظیم شد. از کلیه محلول ها بصورت جداگانه، طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و در انتها حجم بهینه عصاره مورد استفاده، انتخاب شد.

بهینه سازی غلظت نمک نیترات نقره

برای مطالعه تأثیر غلظت یون فلزی در سنتز نانوذرات و بهینه نمودن آن، مقدار ۴ میلی لیتر عصاره به ۴ میلی لیتر از غلظت-های مختلف محلول نقره نیترات (۴ تا ۵/۰ تا ۴) میلی مولار اضافه و pH واکنش به ۸ رسانده شد. از محلول‌های آماده شده طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و غلظت بهینه انتخاب شد.

بهینه سازی دمای واکنش

برای بهینه ساختن دمای واکنش و مطالعه تأثیر آن در روند سنتز نانوذرات نقره، شش سری محلول با شرایط بهینه ی قبل و بصورت جداگانه در دماهای کمتر و بیشتر از دمای محیط آزمایشگاه (۱۰، ۲۵، ۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی گراد) ساخته و از تمامی نمونه ها بصورت مجزا طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی گرفته و دمای بهینه انتخاب شد.

بهینه سازی زمان واکنش

جهت بهینه نمودن زمان واکنش، محلول هایی با در نظر گرفتن تمامی شرایط بهینه شده ی پیشین، در زمان های مختلف (۱ تا ۷ ساعت بعد از زمان سنتز) آماده و طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی آنها گرفته و زمان بهینه انتخاب شد.

مشخصه یابی نانوذرات نقره

به منظور تأیید نتایج بدست آمده از طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی و بدست آمدن اندازه و شکل نانوذرات نقره، نمونه ی ساخته شده بوسیله ی تکنیک میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد بررسی قرار گرفت.

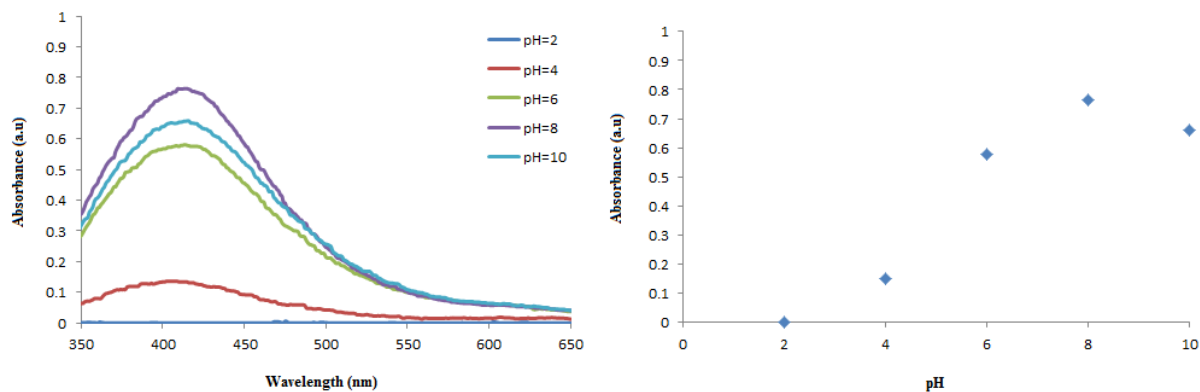
بررسی فعالیت ضد میکروبی

جهت بررسی اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی نانوذرات نقره سنتز شده از روش انتشار چاهکی (Well Diffusion Method) استفاده شد. ابتدا هر یک از باکتری ها روی محیط کشت لوریا برتانی آگار (LB) کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد از کلنی های باکتریایی سطح محیط کشت برداشته شد و به صورت مجزا برای هر باکتری به لوله های آزمایش حاوی ۳ میلی لیتر نرمال سالین استریل تلقیح شد و از آن سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ cfu/ml) آماده گردید. اندازه گیری هاله عدم رشد در محیط کشت مولر هینتون آگار انجام شد و به این منظور از سوسپانسیون هر باکتری به طور مجزا به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته و با سوپ استریل در سه جهت به صورت انبوه کشت داده شد. در بررسی اثرات ضد قارچی از محیط کشت سابورد دکستروز (آگار و براث) و انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و مدت انکوباسیون ۴۸ ساعت استفاده شد. سپس در هر یک از پلیت های کشت داده شده ۴ چاهک با شعاع تقریباً ۶ میلی متر ایجاد شد و درون هر چاهک مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر محلول مورد آزمایش با سمپلر ریخته شد. در هر یک از پلیت های باکتریایی، در یک چاهک محلول آبی نمک نیترات نقره، در یکی نانوذرات نقره تولید شده و در دو چاهک دیگر محلول های آنتی بیوتیکی آمپی سیلین و جنتامایسین (به عنوان کنترل مثبت) ریخته شد ولی در پلیت های مربوط به قارچ ها به جای این دو آنتی بیوتیک از محلول آنتی بیوتیک ضد قارچی کلوتریمازول استفاده شد. سپس پلیت های کشت داده شده در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت برای باکتری ها و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت برای قارچ ها انکوبه شدند و در نهایت قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شد.

نتایج و بحث

تاثیر pH واکنش

قبل از این مطالعاتی بر روی تاثیر pH بر چگونگی تشکیل نانوذرات انجام شده است. گزارش ها حاکی از آن است که pH واکنش تاثیر قابل ملاحظه ای بر روی شکل نانوذرات ندارد و فقط اندازه آنها را به میزان قابل توجه ای تحت تاثیر قرار می دهد (Gardea-Torresdey et al, 1999 and Armendariz et al, 2004). پس از مخلوط کردن ۲ میلی لیتر عصاره و ۴ میلی لیتر از نمک نیترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار، مشاهده شد که رنگ محلول به رنگ قهوه ای متمایل شده است که این رنگ دلیلی بر سنتز موفق این نانوذرات می باشد. مقدار pH محلول حاصل توسط دستگاه pH متر، عدد ۴/۷۸ اندازه گیری شد. به منظور مطالعه بر روی تاثیر فاکتور مهم pH بر سنتز نانوذرات، پنج سری محلول در pH های بالاتر و کمتر از مقدار اولیه (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰) آماده و تمامی محلول ها به صورت جداگانه طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته شد. (شکل ۴)

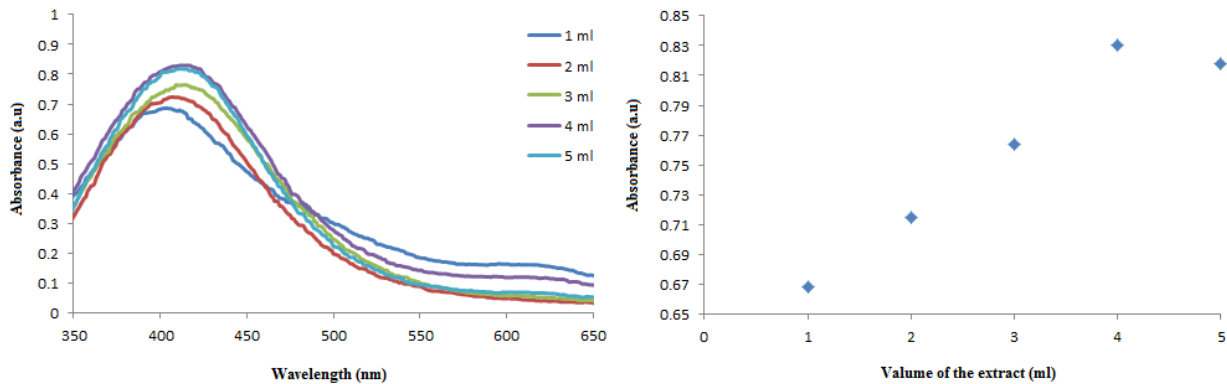


شکل ۴: طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره و روند تغییر در میزان جذب آنها در pH های متفاوت

شکل ۴ نشان می دهد که در pH=۲ تغییر در جذب ملاحظه نشده به طوری که می توان گفت، سنتزی در این pH انجام نگرفته است. لیکن با افزایش تدریجی میزان pH محلول تا ۸، جذب محلول بصورت چشمگیری افزایش یافته است که مربوط به افزایش در مقدار سنتز نانوذرات نقره است. در pH=۸، پیک شارپ و متقارنی مشاهده می شود. اما در pH بالاتر (pH=۱۰) افت شدیدی در میزان جذب ملاحظه شده که می توان اینگونه ادعا نمود که یون های نقره در اسیدیته مورد نظر هیدرولیز شده، به گونه ای که موجب بوجود آمدن گونه های پایدار هیدروکسیدهای یون نقره می شود و در انتها از ورود این یون ها به واکنش احیای زیستی ممانعت می شود (Gardea-Torresdey et al, 1999). پهن شدن طیف های جذبی در pH های بیشتر، بدین علت است که در اسیدیته های بالاتر نانوذراتی با اندازه بزرگتر (به علت اتصال ذرات ریز تر به هم) به وجود خواهد آمد که این اتفاق موجب پهن شدن تقریبی طیف ها می شود. پهن شدن طیف ها در اثر افزایش اندازه نانوذرات، پیش از این گزارش شده است (Shenya et al, 2011). در نتیجه مقدار pH=۸ بعنوان pH بهینه انتخاب شد.

تاثیر میزان عصاره مورد استفاده

در سنتز زیستی نانوذرات توسط گیاهان، گیاه نقش احیاء کردن یون های فلزی و همچنین تثبیت کردن این نانوذرات را ایفا می کند (Philip 2010). گیاه پنیرباد نیز دارای ترکیبات طبیعی فراوانی چون ترکیبات آنتی اکسیدانی، فنل ها، فلاونوئیدی و... است (بیگمی و همکاران، ۱۳۹۲) (Salwaan et al, 2012)، که تمامی این ترکیبات در احیای یون های فلزی و تبدیل آن ها به اتم های فلزی در ابعاد نانومتریک و پایدار کردن نانوذرات سنتز شده نقش مهمی دارند. برای بهینه ساختن میزان عصاره ی مصرفی، مقادیر ۰/۵ تا ۴ میلی لیتر از عصاره به ۴ میلی لیتر محلول نیترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار اضافه و pH واکنش برابر ۸ تنظیم شد. از کلیه ی محلول های آماده شده، بصورت جداگانه طیف اسپکتروفوتومتری فرابنفش-مرئی گرفته شد (شکل ۵).

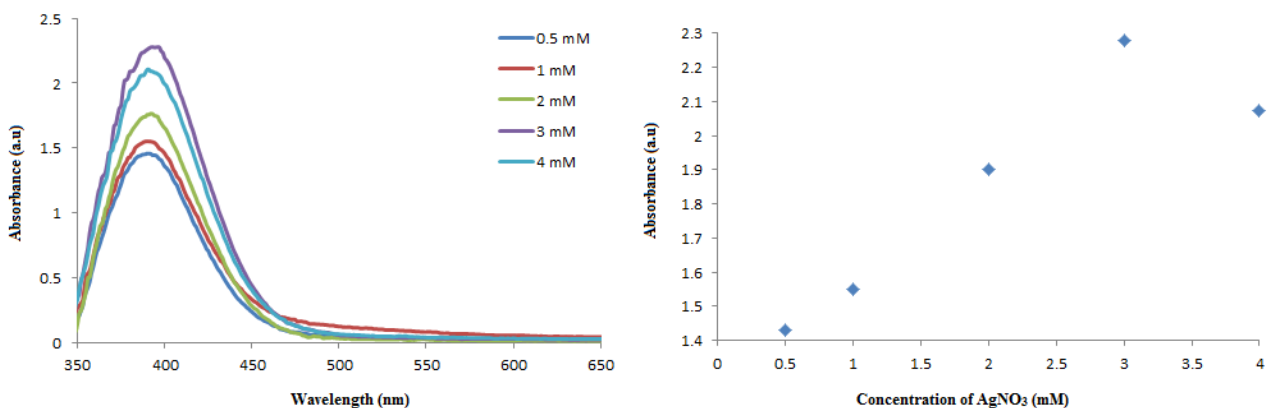


شکل ۵: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره و روند تغییر در میزان جذب آنها در حجم های متفاوت از عصاره

مشاهده شد که با افزایش مقدار عصاره، میزان جذب مربوط به نانوذرات نقره افزایش قابل ملاحظه ای داشته است. با افزایش میزان عصاره، ترکیبات ثانویه موجود در محلول افزایش یافته و نانوذرات بیشتری سنتز می شود و متعاقباً جذب نیز افزایش می یابد (Prabha Dubeya et al, 2010). در غلظت های کمتر از مقدار بهینه، عمل احیاء کردن یون های فلزی و پایدار ساختن نانوذرات سنتز شده بصورت کامل اتفاق نمی افتد و نانوذرات به مقدار کمتر و با اندازه درشت تری تولید می شود. همچنین با اضافه کردن مقدار بیشتر از میزان بهینه، ذرات پایدار کننده به دور خود بیشتر جمع می شوند که این عمل سبب این می شود که پایدارسازی کاملاً انجام نشده و نانوذراتی با اندازه درشت تر سنتز شود (فروغی راد و خطیب ی زاده، ۱۳۹۴).

تاثیر غلظت نمک نقره

مطالعات نشان می دهد با افزایش غلظت یون فلز، جذب مشاهده شده نیز افزایش می یابد که این پدیده بدین علت است که با افزایش مقدار یون فلز، یون های بیشتری احیاء شده و نتیجتاً نانوذرات بیشتری تولید خواهد شد (Dwivedi and Gopal, 2010). جهت بررسی تاثیر غلظت نمک نقره بر روی سنتز نانوذرات نقره، محلول هایی با غلظت های کمتر و بیشتر از ۱ میلی مولار (۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴) ساخته و به تمامی آنها ۴ میلی لیتر از عصاره افزوده و از همه ی آنها بصورت مجزا طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته شد (شکل ۶).

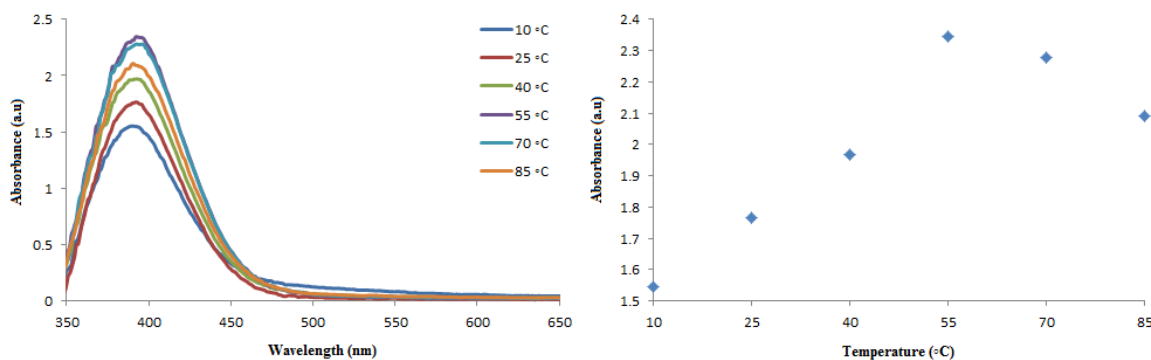


شکل ۶: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره و روند تغییر در میزان جذب آنها در غلظت های متفاوت از نقره

با توجه به شکل ۶، ملاحظه شد که با افزایش تدریجی در میزان غلظت یون نقره، جذب مربوط به نانوذرات نقره افزایش چشمگیری داشته است. این افزایش تا غلظت ۳ میلی مولار ادامه دارد اما در غلظت بیشتر از آن (۴ میلی مولار)، کاهش قابل ملاحظه ای در مقدار جذب مربوط به نانوذرات دیده شد. کاهش جذب نانوذرات در اثر افزایش مقدار غلظت یون فلزی بدلیل چسبندگی نانوذرات و سنتز نانوذراتی با اندازه بزرگتر پیش از این گزارش شده است (Mock et al, 2002). در نتیجه مقدار غلظت ۳ میلی مولار از نمک نیترات نقره بعنوان غلظت بهینه انتخاب شد.

تاثیر دما

پژوهش های متعددی تاثیر دما بر میزان جذب و اندازه نانوذرات سنتز شده را گزارش کرده اند. مشاهدات نشان می دهد که با افزایش دمای محیط واکنش، مقدار جذب خوانده شده افزایش یافته، اما اندازه نانوذرات کاهش خواهد یافت (Rai et al, 2006 and Wiley et al, 2006). افزایش دما، احتمال و سرعت برخورد مولکول های احیاء کننده و تثبیت کننده با یون های فلزی را افزایش می دهد به صورتی که بلافاصله پس از عمل احیاء و تثبیت، فرصتی برای اتصال نانوذرات سنتز شده به یکدیگر و تولید نانوذرات با اندازه درشت تر وجود نخواهد داشت (Kaviya et al, 2011). در مطالعه حاضر مشاهده شد که نانوذرات نقره در دمای اتاق نیز به راحتی قابلیت سنتز را داشتند. لیکن، به منظور دست یافتن به نانوذراتی مطلوب تر، تاثیر دمای واکنش نیز بررسی و در انتها دمای بهینه انتخاب شد. ابتدا محلول های مورد نظر بر اساس تمامی شرایط بهینه شده پیشین، بصورت مجزا در دمای کمتر از دمای محیط (۱۰ درجه سانتی گراد)، دمای محیط (۲۵ درجه سانتی گراد) و بیشتر از آن (۴۰، ۵۵، ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی گراد) ساخته و از همه ی نمونه ها بصورت جداگانه طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی گرفته شد (شکل ۷).



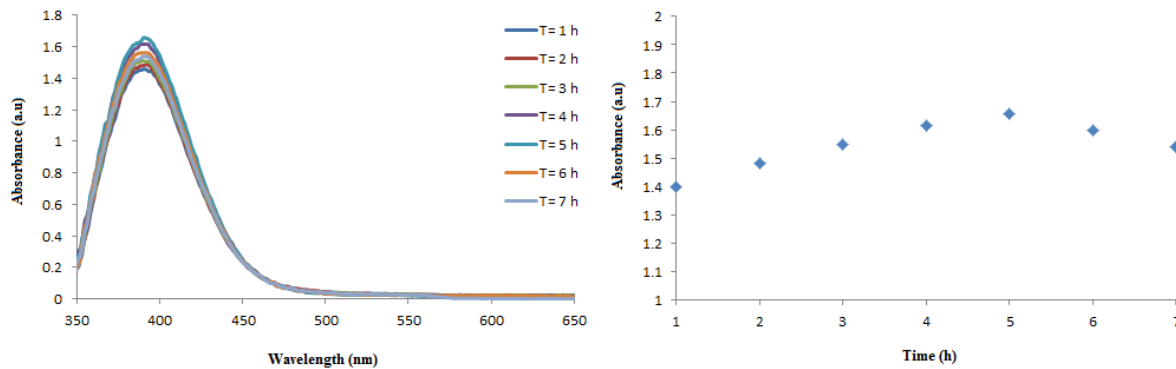
شکل ۷: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره و روند تغییر در میزان جذب آنها در دماهای متفاوت

مشاهده شد که با افزایش تدریجی دما، میزان جذب بصورت محسوسی افزایش یافته است. اما این روند افزایش تا دمای ۵۵ درجه سانتی گراد بوده و در دماهای بعد از آن، کاهش قابل توجهی در جذب دیده شده است که این مشاهده می تواند بدلیل تجزیه و یا از بین رفتن تمامی و یا بخشی از ترکیبات احیاء کننده و پایدار کننده در عصاره گیاه باشد. مطالعات پیشین، تخریب ترکیبات موجود در گیاه در اثر افزایش بیش از حد دما را گزارش کرده اند (بصیری، ۱۳۹۰). در نتیجه با افزایش بیش از حد دما، سنتز نانوذرات کاهش خواهد یافت. لذا دمای ۵۵ درجه سانتی گراد بعنوان دمای مطلوب انتخاب شد.

تاثیر زمان واکنش

زمان نیز همانند فاکتورهای پیشین، تاثیر بسزایی در سنتز و پایدار بودن نانوذرات دارد (Praveen Komar et al, 2011). نتایج این مطالعه نشان می دهند که با افزایش زمان برهمکنش میان واکنشگرها، مقدار جذب اندکی افزایش می یابد، اما از

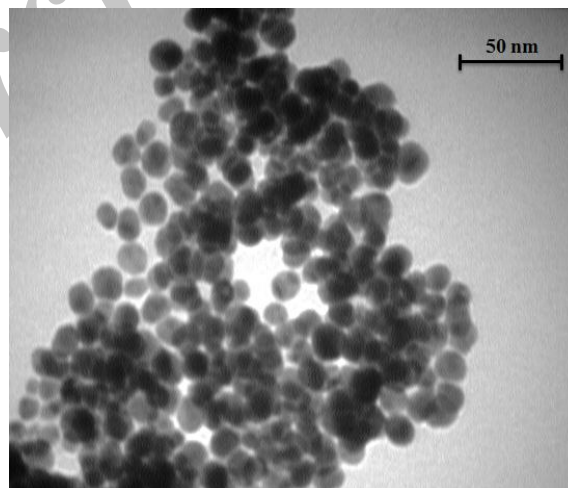
زمان ۵ ساعت به بعد، مقدار این جذب کمی کاهش داشته است. کاهش در میزان جذب بدلیل چسبیدن نانوذرات ریز تر به یکدیگر و تولید نانوذرات درشت تر پیش ازین در روش های این چنینی گزارش شده است (ذاکری و فصیحی، ۱۳۹۰). بطور کلی تغییر در روند جذب نشان می دهد که تغییرات جذب بیش از حد زیاد نبوده که این مشاهده، پایدار بودن نانوذرات حاصل را ثابت می کند. در نتیجه، زمان ۵ ساعت بعنوان زمان بهینه انتخاب شد.



شکل ۷: طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی نانوذرات نقره و روند تغییر در میزان جذب آنها در زمان های متفاوت

بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری

شکل و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده توسط تکنیک تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۸ تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات نقره سنتز شده با اعمال کلیه ی شرایط بهینه و انتخاب شده پیشین را نشان می دهد. تصویر نشان می دهد که نانوذرات سنتز شده همگی تقریباً کروی بوده و اندازه متوسط آنها بین ۹/۴۴-۱۵/۶۵ نانومتر می باشد.



شکل ۸: تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره ی آبی گیاه پنیرباد

بررسی فعالیت ضد میکروبی

نتایج بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی، تاثیر مناسب نانوذرات تولید شده را بر روی همه باکتری ها و قارچ های مورد آزمایش نشان داد (جدول ۱)، به طوری که تاثیر ضد میکروبی نانوذرات نقره به صورت قابل توجهی بیشتر از محلول آبی نمک

نیترات نقره می باشد. همچنین نتایج نشان داد قارچ ها حساسیت نسبتاً بیشتری به محلول نیترات نقره و نانوذرات نقره تولید شده در مقایسه با باکتری های مورد آزمایش دارند و در بین باکتری ها تاثیر ضد میکروبی نانوذرات بیشتر از محلول آبی نمک نیترات نقره بوده است.

جدول ۱: نتایج بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی نانوذرات نقره و آنتی بیوتیک های منتخب

قطر هاله عدم رشد بر حسب میلیمتر					باکتری و قارچ های مورد استفاده
کلوتریمازول	جنتامایسین	آمپی سیلین	نانوذرات نقره تولید شده	محلول نیترات نقره	
-	۳۰	۲۸	۱۹	۱۴	استافیلوکوکوس اورئوس
-	۲۹	۳۰	۱۷	۱۲	باسیلوس سرئوس
-	۳۱	۲۹	۱۵	۱۱	سالمونلا تیفی موریوم
-	۲۶	۲۷	۲۰	۱۲	سودوموناس آئروژینوزا
-	۳۱	۲۹	۱۹	۱۵	کلبسیلا پنومونیه
۳۳	-	-	۲۳	۱۵	آسپرژیلوس نایجر
۳۱	-	-	۲۱	۱۴	کاندیدا آلبیکنس

یکی از کاربرد های مهم نانوذرات نقره در پزشکی، کاربرد آنها به عنوان مواد ضد میکروبی است. در مورد مکانیسم اثر نانو ذرات مطالعات زیادی صورت گرفته است. وجود اختلاف بار بین نانو ذره (با بار مثبت) و مولکول های سطحی یا داخل سلولی میکروب (با بار منفی) سبب اتصال نانو ذره به مولکول های زیستی می شود، که در این بین اثر نانو ذرات با اتصال به پروتئین های غشایی که در انتقال مواد نقش دارند و نیز اتصال به پروتئین های آنزیمی و اکسید کردن گروه های فعال آنها مثل تیول اهمیت بیشتری داشته و می تواند در نهایت منجر به مرگ میکروب شود (Lin and Xing, 2007). در این مطالعه مشخص شد که در میزان تاثیر نانوذرات بر روی باکتری ها و قارچ های موردآزمایش، تفاوت زیادی وجود ندارد. نتایج Jain و همکارانش در بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره تولید شده به وسیله گیاه پاپایا بر روی باکتری های /شرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مشابه با نتایج تحقیق حاضر است. آنها اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره را بر روی هر دو باکتری گرم مثبت و منفی یکسان ارزیابی کردند و این اثر را به تاثیر نانوذرات نقره بر روی دیواره و غشای باکتریها نسبت دادند (Jain et al, 2009). بسیاری از منابع نشان داده اند که اثر مرگبار نانوذرات نقره به دلیل عمل همزمان بر روی دیواره، توانایی نفوذ به غشاء سیتوپلاسمی و اثر بر زنجیره تنفس سلولی، RNA و DNA می باشد که این ساختارها در باکتریهای گرم مثبت و منفی یکسان است. بنابراین خواص ضد باکتریایی نانوذرات نقره برای هر دو گروه از باکتری ها تا حدودی یکسان می باشد (Klasen, 2000). در مطالعه ای دیگر هومبرتو و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مکزیک اثر مهاری نانو ذرات نقره را بر روی باکتری هایی که مقاومت های دارویی زیادی از خود نشان می دهند (باکتری های سودوموناس آئروژینوزا، /شرشیاکلی مقاوم به آمپی سیلین، استرپتوکوکوس پایونز مقاوم به اریترومایسین) بررسی نمودند و مشاهده کردند که نانوذرات نقره اثر باکتریوستاتیک قابل ملاحظه ای بر روی این باکتری ها دارند (Lara et al, 2010). هم چنین مورونس و همکاران، اثرات آنتی باکتریال نانو ذرات نقره علیه باکتری های گرم منفی /شرشیاکلی، ویبریو کلرا، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی را ثابت نمودند و اظهار داشتند که نانو ذرات نقره به سطح غشای سلول باکتری متصل می شوند و پس از آن به درون باکتری نفوذ نموده و با رها سازی یون ها، خاصیت آنتی میکروبی خود را نشان می دهند. تاکنون اثرات ضد قارچی نانوذرات نقره

چندان مطالعه نشده است اما در مطالعه حاضر، نتایج نشان داد که این ذرات حتی در مورد قارچ ها اثرات نسبتاً مخرب تری از باکتری ها دارا می باشند.

نتیجه گیری

در این مطالعه نانوذرات نقره با روش زیستی و دوستدار محیط زیست و بدون استفاده از هرگونه مواد شیمیایی خطرناک تولید شده است. استفاده از ظرفیت بالای گیاهان ما را به دست یافتن به نانوذراتی با پایداری خیلی بیشتر از روش های شیمیایی می رساند. نانوذرات سنتز شده توسط گیاهان دارویی می تواند در موارد متنوعی از جمله انتقال داروها در بدن استفاده شود. پژوهش حاضر اولین گزارش سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه دارویی پنیرباد بوده است. یکی از محدودیت ها در اکثر روش های سنتز نانوذرات، پراکنش زیاد نانوذرات در دامنه وسیع از اندازه ها در ابعاد نانومتریکی می باشد. این محدودیت بزرگ را می توان با روش های مختلف از قبیل، تغییرات pH، حجم عصاره گیاهی، غلظت های مختلف محلول نمکی، دما و مدت زمان، رفع کرد و دامنه تغییرات اندازه نانوذرات را کاهش داد و به یک شرایط بهینه و مناسب دست پیدا کرد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که مطلوبترین شرایط برای سنتز نانوذرات نقره بوسیله گیاه پنیر باد در $pH=8$ ، حجم ۴ میلی لیتر از عصاره گیاه، غلظت ۳ میلی مولار از نمک نیترات نقره، دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و در زمان ۵ ساعت می باشد. آنالیز مربوط به طیف های اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی و تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان دادند که نانوذرات سنتز شده کروی شکل اند و میانگین اندازه آن ها بین ۹/۶۵-۱۵/۴۴ نانومتر می باشد. همچنین نتایج مربوط به اثر ضد میکروبی نانوذرات نشان دادند، که نانوذرات تولید شده حساسیت خوبی در مقابل تمامی باکتری ها و قارچ های مورد استفاده داشته اند.

تشکر و قدردانی

پژوهشگران بر خود لازم می دانند مراتب سپاس خود را از همکاران محترم آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی مجتمع آموزش عالی سراوان و آزمایشگاه تحصیلات تکمیلی فیتوشیمی دانشگاه سیستان و بلوچستان اعلام نمایند. همچنین از مهندس مجتبی حسین پور مسئول محترم آزمایشگاه نانوتکنولوژی دانشگاه خواجه نصیرالدین طوسی جهت تصویر برداری میکروسکوپ الکترونی عبوری تقدیر و تشکر بعمل می آید.

منابع

- بصری، شادی. بررسی اثر دما و سرعت جریان هوا در خشک کن بر میزان و کیفیت اسانس استحصالی از آویشن، مجله پژوهشی علوم و فناوری غذایی، ۱۳۹۰، (۳) ۴: ۷۳-۸۲
- بیگمی، مریم، قدس روحانی، محسن، محمدی فر، محمدمین، هاشمی، هاشمی، ولی زاده، محرم، قناتی، کیاندرخت. بررسی ویژگی های بافتی و حسی پنیر سفید فرآپالایش شده ی تولیدی با پروتئاز گیاه پنیرباد (ویتانیا کواگولانس) در مقایسه با مایه پنیر قارچی، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱۳۹۲، (۸) ۱: ۲۵۳-۲۶۲
- ذاکری، مهدی، فصیحی، جواد. تولید نانوذرات طلا با استفاده از توده زیستی گندم و بررسی پارامترهای موثر، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، ۱۳۹۰، (۳۰) ۲: ۴۱-۳۵
- رضائی، فاطمه، کاظمی، بهرام، جبالی، علی. سنتز بیولوژیک نانوذره نقره، مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی، ۱۳۹۱، (۳) ۹: ۱۰۷-۱۱۱
- عشیری، سمیرا؛ صفری، جواد؛ تهیه نانوذرات طلا و نقره در بسترهای گیاهی و کاربرد آنها، ماهنامه فناوری نانو، (۱) ۱۸۶: ۱۵-۱۲ (۱۳۹۲)
- فرید، منصور، بتوندی، محمدرضا. ساخت نانوذرات نقره و کنترل اندازه آنها، مجله پژوهش فیزیک ایران، جلد ۱۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱



فروغی راد، سخر، خطیب زاده، مرضیه. تهیه سبز نانوذره های نقره مورد استفاده در جوهر های رسانا به روش سونوشیمیایی، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، ۱۳۹۴، ۳۴ (۱)، ۹-۱
محصلی، طاهر، پورسیدی، شهرام. سنتز سبز و تعیین مشخصات نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی بذر گیاه کنجد، زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۹۴، ۶ (۱)، ۶-۱
ولی زاده، محرم، باقری، عبدالرضا، ولی زاده، جعفر، میرجلیلی، محمدحسین، مشتاقی، نسرين. بررسی فیتوشیمیایی گیاه چند منظوره پنبیراد *Withania coagulans (Stocks) Dunal* در رویشگاه های طبیعی استان سیستان و بلوچستان، نشریه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۱۳۹۴، جلد ۳۱، شماره ۳، ۴۰۶-۴۱۷

- Ahmad, A., S. Senapati., M.I. Khan., R. Kumar, and R.Ramani., Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycets, *Rhodococcus species*, *Nanotechnology*. 2003, 14, 824-828.
- Albrecht MA, Evans CW, Raston CL. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chem*, 2007, 8, 417-32.
- Dwivedi, A. G., Gopoi, K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract, *Colloids and Surfaces A: Physicochem Engineering Aspects*, 2010, 360, 27-33.
- Ankamwar, B., Damle, C., Ahmad, A., Sastry, M. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using *Emblica officinalis* fruit extract, their phase transfer and transmetallation in an organic solution. *J Nanosci Nanotechnol*, 2005, 5, 1665-1671.
- Armendariz, V., Herrera, I., Peralta-Videa, J. R., Jose-Yacaman, M. Size Controlled Gold Nanoparticle Formation by *Avena Sativa* Biomass: Use of Plants in Nanobiotechnology. *Journal of Nanoparticle Research*, 2004, 6, 377-382.
- Bogle, K. A., Dhole, S.D., Bhoraskar, V. N. Silver Nanoparticles: Synthesis and Size Control by Electron Irradiation, *Nanotechnology*, 2006, 17, 3204-3225.
- Chandran, S. P., Chaudhary. M., Pasricha, R., Ahmad, A., Sastry, M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract. *Biotechnol Prog*, 2006, 22, 577-83.
- Dinesh, S., Karthikeyan, S., Arumugam, P. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Glycyrrhiza glabra* root extract. *Archives of Applied Science Research*, 2012, 4 (1), 178-187.
- Furno, F., Morley, K. S., Wong, B., Sharp, B. L., Howdle, S. M. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection, *J Antimicrob. Chemother*. 2004, 54, 1019-1024.
- Gajbhiye, M., Kesharwani, J., Ingle, A., Gade, A., Rai, M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomed NBM*, 2009, 5, 382-6.
- Gardea-Torresdey, J. L., Parsons, J. G., Dokken, K., Peralta-Videa, J., Troiani, H. E., Santiago, P., Jose-Yacaman., M. Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles, *Langmuir*, 2003, 19, 1357-1361.
- Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gamez, G., Dokken, K., Tehuacanero, S., Jose-Yacaman, M. Gold Nanoparticles Obtained by Bio-Precipitation from Gold (III) Solutions. *Journal of Nanoparticle Research*, 1999, 1, 397.
- Jain, D., Daima, K. H., Kachhwaha, S., Kothari, S. L. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities. *Dig J Nanomat Biostruct*, 2009, 4, 723-27.
- Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., Muthumary, J., Srinivasan, K. Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2011, 79, 594-98.
- Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Polyalthia longifolia* Leaf Extract along with D-Sorbitol: Study of Antibacterial Activity, *Journal of Nanotechnology*, 2010, 2011, 1-5.
- Klasen, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. early uses. *Burns*, 2000, 26, 117-30.
- Lee, I., Han, S. W., Kim, K. Simultaneous Preparation of SERS-Active Metal Colloids and Plates by Laser Ablation, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2001, 32, 947-952.
- Lin, D. H., Xing, B. S. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of Seed Germination and Root Growth, *Environmental Pollution*, 2007, 150, 243-250.
- Lara, H. H., Ayala-Núñez N. V., Ixtapan Turrent, L. C., Rodríguez Padilla, C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(4), 615-21.



- Marambio-Jones, C., Hoek, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, 12(5), 1531-51.
- Mock, J. J., Barbic, M., Smith, D. R., Schultz, D. A., Schultz, S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles, *The Journal of Chemical Physics*, 2002, 116, 6755-6759.
- Nanda, A., Saravanam, M., Hil, M. P. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE, *Nanomedicine*, 2009, 5, 452-456.
- Philip, D. Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosasinensis*, *Physica E*, 2010, 42, 1417-1424.
- Prabha Dubeya, Sh., Lahtinen, M., Sillanpaa, M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles, *Process Biochemistry*, 2010, 45, 1065-1071.
- Praveen Kumar, k., Willi Paul, Chandra P. Sharma,. Green synthesis of gold nanoparticles with *Zingiber officinale* extract: Characterization and blood compatibility, *Process Biochemistry*, 2011, 46, 2007-2013.
- Rai, A., Singh, A., Ahmad, A., Sastry, M. Role of halide ions and temperature on the morphology of biologically synthesized gold nanotriangles. *Langmuir*, 2006, 22 (2), 736-741.
- Supraja, S., Chakravarthy, N., Sagadevan, K. Green Synthesis of Silver Nanoparticles from *Cynodon Dactylon* Leaf Extract", *J Chem Tech Research*, 2013, 5 (1), 271-277.
- Shahverdi, A. R., Minaeian, S., Shahverdi, H. R., Jamalifar, H., Nohi, A. A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of *Enterobacteria*: a novel biological approach. *Proc Biochem*, 2007, 42, 919-23.
- Shankar, S. S., Rai, A., Ahmad, A., Sastry, M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core Ag shell nanoparticles using *Neem (Azadirachta indica)* leaf broth. *J Colloid Interface Sci*, 2002, 275, 496-502.
- Kamal , Sarika Srinivas Kalyan, Prasanta Humar Sahoo, Johnson Vimala, Manda Premkumar, Shankar Ram, Loganathan Durai. A novel green chemical route for synthesis of silver nanoparticles using *Camellia sinensis*, *Acta Chim. Slov*, 2010, 57, 808-812.
- Dubey Shashi Prabha, Manu Lahtinen, Mika Sillanpaa. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles, *Process Biochemistry*, 2010, 45, 1065-1071.
- Shenya, D. S., Mathewa, J., Philip, D. 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*, 2011, 79, 254-262.
- Valodkar, M., Modi, S. h., Pal, A., Thakore, S. Synthesis and Anti Bacterial Activity of Cu, Ag and Cu-Ag Alloy Nanoparticles: A Green Approach, *Materials Research Bulletin*, 2011, 384-389.
- Vijayaraghavana, K., Mahadevana, A., Sathishkumara, M., Pavagadhia, S., Balasubramaniana, R. Biosynthesis of Au(0) from Au(III) via biosorption and bioreduction using brown marine alga *Turbinaria conoides*, *Chemical Engineering Journal*, 2011, 167, 223-227.
- Wiley, B. J., Im, S. H., Li, Z. Y., McLellan, J., Siekkinen, A., Xia, Y. Maneuvering the surface plasmon resonance of silver nanostructures through shape-controlled synthesis, *Journal of Physical Chemistry B*, 2006, 110 (32), 15666-15675.
- Ziarati, A., Safaei-Ghomi, J., Rohani, S. Sonochemically Synthesis of Pyrazolones Using Reusable Catalyst CuI Nanoparticles that was Prepared by Sonication, *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, 20, 1069-1075.
- Zhu, H.T., Zhang, C.Y., Yin, Y.Sh. Rapid Synthesis of Copper Nanoparticles by Sodium Hypophosphite Reduction in Ethylene Glycol under Microwave Irradiation, *Journal of Crystal Growth*, 2004, 722-728.