

Research Paper

Synthesis of Silver Nanoparticles of Plant Extract Pistaciaatlantica and Their Antibacterial Effects on Antibiotic Resistant Strains of S. Aureus



Elaheh Moradi¹, Mobina Ahmadi², Narges Tavakoli², Fateme Nasirzadeh², Nastaran Yoosofnejad², *Jalal Mardaneh³

1. Department of Agricultural Engineering, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Razavi Khorasan Province, Iran.

2. Student in the field of experimental Sciences, Shahed Reyhaneh Al-Nabi High School in Gonabad, Gonabad, Razavi Khorasan Province, Iran.

3. Department of Microbiology, Infectious Diseases Research Center, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Razavi Khorasan Province, Iran.



Citation Moradi E, Ahmadi M, Tavakoli N, Nasirzadeh F, Yoosofnejad N, Mardaneh J. [Synthesis of Silver Nanoparticles of Plant Extract Pistaciaatlantica and Their Antibacterial Effects on Antibiotic Resistant Strains of S. Aureus (Persian)]. *Internal Medicine Today*. 2022; 28(2):244-263. <https://doi.org/10.32598/HMS.28.2.1402.5>

doi <https://doi.org/10.32598/HMS.28.2.1402.5>



Received: 30 Jul 2020

Accepted: 03 Mar 2022

Available Online: 01 Apr 2022

Keywords:

Green synthesis, Silver nanoparticles, Pistaciaatlantica, DLS, Minimum inhibitory and killing concentrations

ABSTRACT

Aims In recent years, the synthesis of nanoparticles (Ag-NPs) by plants has been done on a larger scale because it is faster and cheaper. There is also an increase in pathogenicity caused by antibiotic-resistant Staphylococcus aureus. In this study, the biosynthesis of silver nanoparticles by using an extract of mountain pistachio (Pistaciaatlantica) and its antimicrobial properties have been reported.

Methods & Materials The extract of Pistaciaatlantica as the reducing agent was used for the biosynthesis of silver nanoparticles. The formation of nanoparticles was confirmed using a spectrophotometer (UV). The resulting nanoparticles were analyzed to determine the Z-Average (d.nm) and the dispersion index (PDI) of the nanoparticles using dynamic light scattering (DLS) and its inhibitory activity and lethality (MBC) against Staphylococcus aureus (S. aureus) were investigated. The diameter of the aura of bacterial growth was also measured.

Findings The UV-Vis spectrum shows an absorption band of about 350-450 nm, which represents the biological Ag nanoparticles. Size and morphological properties of nanoparticles were performed by DLS which show that hydrodynamic diameter (Z-Average) is 1132 nm and PDI number is 0.373, indicating a uniform particle size distribution and nanoparticle stability. The inhibitory and lethal properties of Pistaciaatlantica nanoparticles on S. aureus species (PTCC 1764) are 12.5 micrograms per milliliter. Also, the diameter of the halo of bacterial growth is 12 mm which was observed at a concentration of 1000 µg/mL.

Conclusion Pistaciaatlantica bio-silver nanoparticles had good antimicrobial activity against S. aureus

* Corresponding Author:

Jalal Mardaneh, PhD.

Address: Department of Microbiology, Infectious Diseases Research Center, Faculty of Medicine, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Razavi Khorasan Province, Iran.

Tel: +98 (917) 1892158

E-mail: Jalalmardaneh@yahoo.com.

Extended Abstract

1. Introduction

Nanotechnology is the design, characterization, production, and application of materials, tools, and systems by controlling the shape and size at the nanometer scale [1]. In recent years, the convergence between nanotechnology and biology has created a new field of nanotechnology. Nanobiotechnology is the science of using microorganisms in several biochemical and biophysical processes [2]. This relatively new field focuses on the creation, commissioning, and use of nanoscale materials in advanced biotechnology [3]. Compared to microorganisms, the use of plants is more efficient due to the lack of special complex and multi-stage processes such as purification, preparation, and maintenance of culture medium [4]. Therefore, the synthesis of nanoparticles by plants is faster and cheaper in comparison to microorganisms on a larger scale [5, 6]. Attention to the production of green nanoparticles has begun a comprehensive study showing that the use of plant extracts is the most effective way to produce environmentally friendly nanoparticles [7, 8]. The plant extract contains active substances, which are responsible for reducing metal ions of synthesized nanoparticles [9]. Among the advantages of using plants in the synthesis of nanoparticles are user-friendliness, biosecurity, non-toxicity, cheapness, and having a wide variety of metabolites that are involved in ion reduction [10]. In general, the main properties of silver nanoparticles include non-toxicity, high stability, hydrophilicity, thermal resistance, non-development, and increase of resistance in microorganisms [11]. Numerous studies have shown that the antibacterial effect of silver nanoparticles depends on their size and shape [12, 13]. In a study by Espinosa et al., silver nanoparticles showed strong antibacterial properties against *Streptococcus mutans*. The results of this study showed that by reducing the size of silver nanoparticles from 100 nm to 16 nm, the minimum inhibitory concentration (MIC) is halved, which means an increase in the antibacterial properties of smaller silver nanoparticles [14].

Today, the use of plant extracts in the synthesis of metal nanoparticles, especially silver, has received more attention [15]. Different species of *Pistacia atlantica* are grown in the world. In Iran, it grows in the provinces of Ilam, Gilan, Azerbaijan, Lorestan, Kermanshah, Hamedan, Kurdistan, Markazi, Kerman, Fars, Tehran, Khorasan, and Sistan and Baluchestan. Extracted from a very light, thick, and very sticky green *Pistacia atlantica*, it has many medicinal uses and is used as a strong laxative in the treatment of

constipation and gastrointestinal disorders [16, 17]. Also, the identification of compounds, antioxidant activity, antibacterial, and fungal effects of medicinal plants is of great interest [1]. With the increasing use of common therapeutic antibiotics, we are witnessing the spread of antibiotic-resistant pathogenic microbial species. Paying attention to medicinal and native plants with antimicrobial effects can reduce the problems caused by antibiotics to some extent. Plant extracts and essential oils as important antimicrobial agents have been considered by many researchers in the fields of medicine and food in recent years. Among bacteria, the genus *Staphylococcus* belongs to the family of *Micrococcus*. These bacteria are gram-positive, immobile, spore-free, aerobic, and optional anaerobic [18-20]. *Staphylococci* have more than 20 species that are distributed in different habitats [21]. Bennett showed signs and symptoms of food poisoning by performing various tests and consuming milk contaminated with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [22]. *S. aureus* is also a causative agent of nosocomial infections and community-acquired infections, and antibiotic-resistant *S. aureus* is one of the problems in the hospital and the community [23, 24]. Studies have shown that the synthesis of green silver nanoparticles using *Pistacia atlantica* extract is less well-known. Therefore, this study aimed to synthesize green silver nanoparticles from the *Pistacia atlantica* plant against gram-positive pathogenic bacterium and optional anaerobic *S. aureus* PTCC 1764 resistant to antibiotics.

2. Materials and Methods

Chemicals

All chemicals used were prepared in high purity including silver nitrate (AgNO_3), hydrochloric acid (HCl), and sodium hydroxide (NaOH) from the company (MERCK, Germany). Twice distilled water (Samen Serum Manufacturing Company) was used for solution and washing. In this study, the *Pistacia atlantica* plant was collected from Bajestan city located in Khorasan Razavi province, and approved by a botanist.

Preparation of aqueous extract of plant

To prepare the aqueous extract, first the *Pistacia atlantica* was washed well with the skin with distilled water. It was then dried at room temperature and then peeled. Then, 100 grams of peeled *Pistacia atlantica* plant were washed 3 times with distilled water (Samen Serum Company) for one minute each time. Then, the sample was disinfected with 70% alcohol (MERCK, Germany) for 2 minutes and finally washed 3 times with distilled water for 2 minutes each time. To prepare the aqueous extract, the first 30 g of the studied plant was washed and placed

at room temperature to dry completely. This amount of *Pistacia atlantica* was then poured into an Erlenmeyer 250 mL and 100 mL of double distilled water (Samen Serum Company). The mixture was boiled for 10 minutes. The aqueous extract of *Pistacia atlantica* was filtered using filter paper (Whatman, UK with 25-micron pores), and to remove suspended particles in the extract, the sample was centrifuged by centrifuge (DIGICEN21, Spain) at 9000 rpm for 10 minutes. The extract was then refrigerated (Emerson, Iran) at 4°C for later use [25].

Synthesis of nanoparticles

Ten milliliters of the prepared *Pistacia atlantica* extract was mixed with 90 ccs of 1 mM silver nitrate solution and the solution was placed on a magnetic stirrer for 24 hours at room temperature. To observe the color changes, the absorbance of the solution was examined using a spectrophotometer (Uv-Vis) model CT-5700 made in Taiwan in the range of 700-300 nm. The solution containing the nanoparticles was centrifuged at 12,000 rpm for 15 minutes (DIGICEN21, Spain) and then the supernatant was discarded [25]. The color of the solution changes to dark brown after the nanoparticles are produced. This change is a sign of the production of silver nanoparticles. After observing the color change, the bioproduced nanoparticles were examined for better detection and characterization by other methods [15]. To reduce the number of silver ions (Ag^+) and confirm the formation of silver nanoparticles, after adding 1 mM silver nitrate solution to the extract and observing discoloration, 0.2 mL of the sample was taken and mixed with 2 mL of sterile distilled water and adsorbed. It was read by an ultraviolet-visible spectrometer at wavelengths of 700-300 nm [25].

Antibacterial effects of silver nanoparticles

The standard microbial strain of *S. aureus* PTCC 1764 was prepared by the Iran Food Science and Technology Research Institute.

Diffusion disk method

To determine the antibacterial properties of the aqueous extract of *Pistacia atlantica*, *S. aureus* lyophilized bacterium with PTCC code 1764 was first inoculated on Müller Hinton Broth (Merck, Germany), and microbial culture was incubated for 24 hours in an incubator at 37°C was placed. The above suspension was used after the vortex to prepare 0.5 McFarland. Thus, the suspension was poured into special coats of the spectrophotometer and their light absorption was determined. To produce an opacity of 0.5 McFarland, the light absorption at a wavelength of 620 nm must be 0.08-0.1, which is equivalent

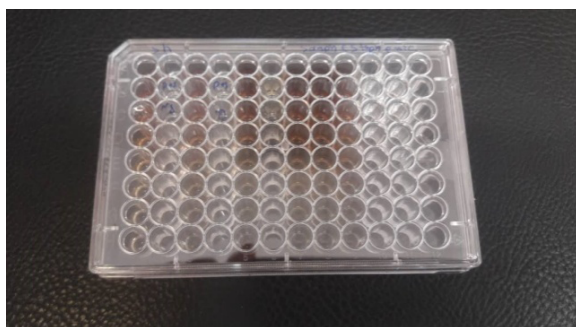
to colony units per milliliter of the bacterium. Then 100 μ L of microbial suspension was spread on the plate containing Müller Hinton agar medium and in the next step, the extract disk with a concentration of 1000 μ g/mL was placed in the plate containing culture medium. A disk containing gentamicin antibiotic (10 micrograms) made by PadtenTeb Company was used as a positive control and a disk containing a solution of deionized distilled water was used as a negative control. The plates were kept at 37°C for 24 hours and the diameter of the growth inhibition zone was measured in millimeters with a caliper and the average was recorded [26].

Determination of minimum inhibitory concentration using microdilution (MIC) method

In this study, the microdilution broth method was used to determine the minimum inhibitory concentrations. The minimum concentration at which the extract inhibits the growth of the microorganism was tested (the concentration of the last well in which no turbidity was created). Thus, the bacterial strain of *S. aureus* was prepared in Müller-Hinton medium with a turbidity of 0.5 McFarland equivalent to colony unit (per ml) and after dilution, a suspension with a concentration of colony unit (per mL) was obtained. Also, from the aqueous extract of *Pistacia atlantica* with a concentration of 100 μ g/mL, successive dilutions were prepared in broth and 100 μ L of different dilutions of the extract was poured into the microplate of 96 houses. Then, 95 μ L of broth culture medium and 5 μ L of bacterial suspension were added. This test was performed in three replications. Also, wells containing 200 μ L of broth culture medium with bacteria were considered as a positive control, and one well-containing culture medium, bacteria, and antibiotic (gentamicin) were considered a negative control. The microplates were then boiled and incubated at 37°C for 24 hours. After 24 hours, the turbidity at a wavelength of 630 nm was read with the help of CHROMATE model 4300 ELIZARIDER made in the USA and the results were recorded and then the MIC was calculated from it (Figure 1) [27, 28].

Determination of minimum bactericidal concentration (MBC)

After determining the MIC, the test for determining the MBC was performed. For this purpose and to determine the minimum lethal concentration of the extract against bacteria, clear tubes in which growth was inhibited were used for culture and 50 μ L of wells were removed and cultured in plates containing a solid Müller Hinton culture medium. These plates were incubated at 37°C for 72 hours, after which the lack of bacterial growth showed the minimum lethal concentration of the extract [29].



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 1. Image of 96 house plate microtiter used in microdilution technique

Determination of nanoparticle size and morphology

In this study, the average size and size distribution of silver nanoparticles synthesized using ZS cutacizerDYNAMIC Light Scattering, (England Malvern) was determined as the Zen 3600 model. At this stage, the heterogeneity index (PDI) is determined, which indicates the degree of homogeneity of the size of nanoparticles in the solution [30].

Results

Results of nanoparticle synthesis

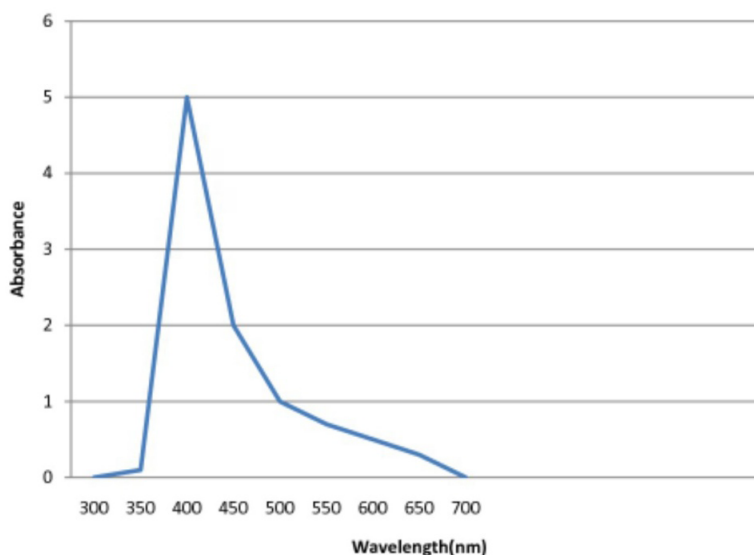
The method of green synthesis of silver nanoparticles was performed using the reduction of silver ions by Pistaciaatlantica extract. The first sign of the production of



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 2. Discoloration of pistaciaatlantica extract and silver nitrate after 2.5 hours. The color change of the reaction solution indicates the formation of silver nanoparticles.

silver nanoparticles is a change in the color of the solution. The aqueous extract of the Pistaciaatlantica plant was white in color, which began to change color after 2.5 hours after the addition of silver nitrate solution and exposure to ambient temperature indicating a high reaction rate. The dark brown color after 22 hours indicates the production of silver nanoparticles in the solution, which was consistent with the sources. The appearance of a dark brown color after a reaction with silver ions is a clear indicator of the reduction of metal ions and the formation of silver nanoparticles in the environment (Figure 2).



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 3. Spectrophotometric spectrum of solution containing silver nanoparticles produced by pistaciaatlantica extract

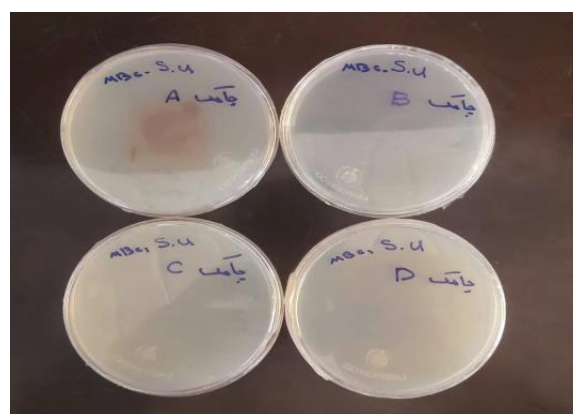


Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences
Figure 4. *S. aureus* growth aura

When discoloration is associated with sediment formation, the formed nanoparticles are large in particle size, and when discolored and sediment is not formed, the synthesized nanoparticles are very small in part and are at their best. Sediment was not formed in any of the nanoparticle solutions produced with *Pistaciaatlantica* extract which indicates the appropriate particle size of *Pistaciaatlantica* nanoparticles. The results of ultraviolet-visible spectroscopy of *Pistaciaatlantica* extract after the synthesis of silver nanoparticles showed that the maximum absorption peak of the curve is in the range of 350 to 450 nm, which indicates the synthesis of silver nanoparticles (Figure 3) [10].

Microbial tests of silver nanoparticles

The results of disk diffusion (diameter of growth inhibition zone) were measured in millimeters with a caliper and the average was recorded. As can be seen from the results, the diameter of the *S. aureus* growth inhibition zone



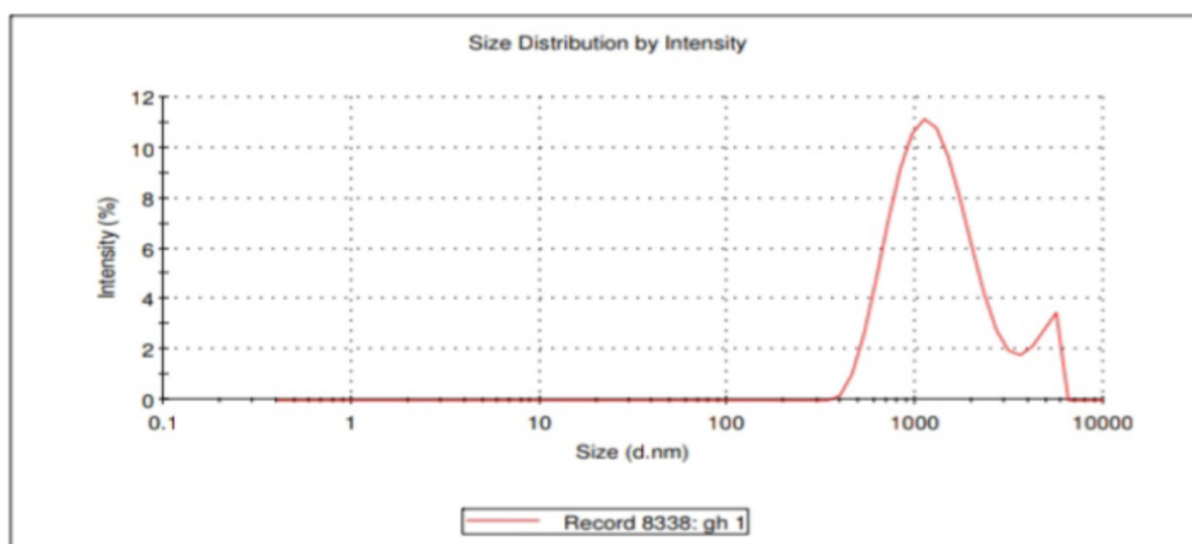
Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences
Figure 5. MBC test results

around the gentamicin antibiotic disk is 17 mm, and the diameter of the *S. aureus* growth inhibition zone around the disk impregnated with aqueous extract of nanoparticles of *Pistaciaatlantica* with a concentration of 1000 µg/mL 12 mm was observed. This means that the aqueous extract of *Pistaciaatlantica* nanoparticles can well inhibit the growth of *S. aureus* (Figure 4 and Table 1).

The minimum inhibitory concentration (MIC) and the lowest bactericidal concentration (MBC) of nanoparticles and *Pistaciaatlantica* extract were determined on *S. aureus*. As shown in Table 1, in this study, the lowest inhibitory nanoparticles and extracts for *Staphylococcus* were 12.5 µg/mL and the lowest bactericidal concentrations of nanoparticles and extracts were determined to be 12.5 µg/mL (Figure 5).

DLS analysis results

DLS is a fast, non-destructive physical method used to determine the particle size distribution in solution and



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences
Figure 6. Analyzer particle size diagram

suspension and to study the diffusion behavior of macromolecules in solution. In this study, this test was used to determine the following parameters:

Measurement of the hydrodynamic diameter of particles in suspension (Z-Average)

The results of the DLS test can be used as a complementary method for analytical studies and as a tool for the study of scattering models using the hydrodynamic radius. The diameter obtained by this method corresponds to a sphere with a transfer coefficient equivalent to the measured particle.

The transfer coefficient depends on the particle size, surface structure, concentration, and type of ions in the environment, which means that the size obtained with this method can be larger than the amount obtained by electron microscopy. The diffusion coefficient or diffusion coefficient is concentration-dependent and should be measured at different concentrations, as a standard operation, reaching infinite dilution D_0 .

D_T is important and very useful in determining other hydrodynamic parameters. For example, the hydrodynamic

radius R_h can be obtained using the well-known Stokes-Einstein equation (equation 1).

$$1. D_T = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_h}$$

R_h is the hydrodynamic radius of the particle, K_B , the Boltzmann constant, η is the viscosity of the solvent which is temperature-dependent and not related to the density and pressure of the system, and T is the absolute temperature and diffusion coefficient [31].

Determining the particle size distribution using dimensionless index (PDI)

If the PDI value is less than 0.05, the particles have an excellent uniform distribution. If the PDI value is greater than 0.7, it indicates that the sample has a very wide size distribution and is probably not suitable for the DLS method, and in general, if the size of this index is between 0.1 and 0.5, the particles have a good uniform distribution [32]. The hydrodynamic diameter size and PDI number of the sample are given in Table 2. As the DLS result shows, the hydrodynamic diameter of the nanoparticles is 1132 nm. The PDI value is 0.373, which indicates that the

Table 1. Mean diameter of stunted growth halo on *s. aureus* studied in millimeters

The Concentration of Aqueous Extract (mg/mL)		The concentration
Gentamicin	1000	
17	12/00 ±50	<i>S. aureus</i>

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Table 2. Results of mic and mbc study generated by silver extract and nanoparticles produced by green method on *s. aureus* strain

Nanoparticles Produced by Aqueous Extract of Pistacia atlantica	Test	Bacterial Strains
12/50	MIC(μg/mL)	<i>S. aureus</i>
12/50	MBC(μg/mL)	ATCC 1764

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Table 3. Results of sample dls analysis

Latitude(nm)	Reaction Temperature(°C)	Hydrodynamic Diameter(d.nm)	PDI	Sample
0.844	25	1132	0.373	Nanoparticles

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

nanoparticles are in a stable state ($PDI > 0.7 > 0.1$) and the particle size distribution is appropriate (Table 3).

Accurate measurement of nanoparticle size by zetaizer: The particle size analyzer results showed that the size of the synthesized nanoparticles is 1132 nm. The diagram shows two peaks of 1132 nm and 4707 nm (Figure 6).

The diagram shows the size distribution of nanoparticles synthesized in the optimal experiment, based on which the average of the smallest particles is 1132 nm.

Discussion

Nanosilver technology has revolutionized antibacterial materials, which are the main focus for the development of nano-silver products and have many advantages over chemicals [33]. One of the disadvantages of chemical methods for the production of nanoparticles is the low production rate and high energies during the reaction process [34]. However, in the green synthesis method, plant compounds are used without the need for surfactants, special conditions, and other stabilizing agents [35]. Therefore, in this study, silver nanoparticles were produced using aqueous extracts of the *Pistacia atlantica* plant by bioremediation method, and its antibacterial effects were investigated. The basis of the synthesis of nanoparticles is the reduction of their salt ions and the neutralization of the electric charge. In this study, this process was completed within 22 hours at room temperature indicating the high speed of this method and its need for high temperatures to form silver nanoparticles, which is similar to the results of research by Sivaraman et al. And Sathyavath et al [36, 37].

Pistacia atlantica extract with high flavonoids, alkaloids, triterpenoids, and saponins has a high potential to reduce silver nanoparticles [38]. Oxidation of functional groups such as hydroxyl, carbonyl, and aldehyde can reduce silver ions, resulting in the production of silver nanoparticles [39, 40].

In Figure 2, the discoloration observed to dark brown in *Pistacia atlantica* extract was a clear sign of the formation of reactive silver nanoparticles [41] that was quite similar to the results of Reddy and Gandhi's research [42].

As shown in Figure 3, the peak formed at a wavelength of 400 to 450 nm indicates the formation of silver nanoparticles related to the surface plasmon resonance of silver nanoparticles, which is attributed to the induction of free electrons in the nanoparticles [43]. Hydrodynamic droplet size (Z-Average) and particle size distribution

(PDI) were measured by the DLS method. The results showed that the size of nanoparticles synthesized using a zeta sizer is 1132 nanometers.

Two peaks can be seen in the diagram (Figure 6), the larger peak indicates agglomeration due to the surface load between particles. The particle size distribution was 0.3, which indicates that the nanoparticles are in a stable state ($PDI > 0.7 > 0.1$) and the particle size distribution is appropriate. As shown in the sample particle size distribution curve in Figure 6, the absence of large peaks in the sample probably indicates that the nanoparticles did not form in the bulk solution implying that the nanoparticles formed well, which is consistent with the results of the research by other researchers [44, 45].

The main mechanism of the antibacterial properties of silver nanoparticles is the release of silver ions. Some of the main mechanisms of action of silver ions are as follows: Damage to cell membranes, production of reactive oxygen species and cell attack of silver ions (or even silver nanoparticles due to membrane cavities), and further damage to ATP products and inhibition of DNA replication. In many studies, damage to the cell membrane by silver ions has been reported. These reports are mainly based on the observation of large cavities or holes in the bacterial membrane by TEM analysis. Silver ions may interact with sulfur-containing membrane proteins (eg, respiratory chain protein thiols) to cause physical damage to the membrane [46].

The presence of strong antimicrobial effects in plant products is of particular importance because today one of the major problems of medical science is the development of resistance to antibiotics in many common pathogens [47]. Growing antibiotic resistance increases the cost of health care due to the length of treatment (including hospitalization) and recovery, along with the failure of antibiotic treatment, the need to develop new antibiotic agents, the use of more serious methods, and wider control of infection to prevent the spread of antibiotic-resistant pathogens. With the advancement of nanotechnology and the creation of silver nanoparticles and the proven antimicrobial properties of these nanoparticles, their use in medicine and related sciences has increased dramatically [48].

The combination of these uses with antibiotic therapy could be an important incentive for researchers to study to find, purify, and standardize effective herbal nanoproducts (which have better selective toxicity than antibiotics) such as *Pistacia atlantica*. So far, many studies have been conducted to investigate the antimicrobial properties of *Pistacia atlantica* gum extract. Panahi et al. investigated

the effect of *Pistacia atlantica* gum essential oil on the antimicrobial and antioxidant properties of starch edible film. According to the findings of this study, *Pistacia atlantica* gum essential oil can be added to biodegradable films as a natural preservative [49]. Alizadeh et al. investigated the physical and antimicrobial properties of chitosan oral film containing *Pistacia atlantica* gum essential oil and the results of this study showed that *Pistacia atlantica* gum essential oil as a natural antimicrobial substance has a high potential for the production of antimicrobial films [50].

However, few studies on the antibacterial and antifungal properties of *Pistacia atlantica* extract, especially the effect of nanoparticles produced using the extract of this plant on the bacterium *S. aureus* have been reported. Also, due to the high abundance of *S. aureus* in food, the role of this microorganism as one of the causes of poisoning should not be ignored. Since the enterotoxins of this bacterium are resistant to heat and protease and are not destroyed in the process of heating and cooking, the high prevalence of enterotoxin genes in this study indicates the potential role of this bacterium in causing food poisoning. The increasing prevalence and resistance to other antibiotics in CA-MRSA food-isolated strains can be a serious public health problem. Therefore, serious decisions must be made to prevent food contamination and increase the level of hygiene [51].

The results of the study of MIC and MBC of this type of nanoparticle on *S. aureus* indicate that this nanoparticle has a growth inhibitory effect and a lethal effect on *S. aureus*. By examining the growth or non-growth of bacteria in the culture medium containing nanoparticles, the minimum inhibitory concentration was determined. A comparison of the antibacterial effect of biosynthesized nanoparticles with the extract shows that the antibacterial effect of biosynthesized nanoparticles with *Pistacia atlantica* extract on this bacterium is very effective. It is expected that the good antibacterial properties of the nanoparticles synthesized in this study are due to the stable state of the formed nanoparticles ($PDI > 0.7 > 0.1$) and the appropriate size distribution of the *Pistacia atlantica* nanoparticles [44].

In the present study, in the results obtained from the test of the average diameter of the stunted halo at a concentration of 1000 µg of *Pistacia atlantica* nanoparticles on *Staphylococcus*, the diameter of the stunted halo was 12 mm indicating the antimicrobial properties of this plant extract. Hamelian et al. investigated the synthesis of silver nanoparticles and their antioxidant, cytotoxicity, and antibacterial effects under in vitro conditions in *Pistacia atlantica* leaf extract mediated showing that Ag NPs pre-

vented the growth of all bacteria at 1-7 µg/mL concentrations and removed them at 3-15 µg/mL concentrations. Finally, synthesized Ag NPs revealed non-cytotoxicity, antioxidant, and antibacterial activities in a dose-dependent manner [2].

Sadeghi et al. investigated the facile green synthesis of silver nanoparticles using seed aqueous extract of *Pistacia atlantica* and its antibacterial activity. The results suggest that the synthesized Ag-NPs act as an effective antibacterial agent. It is confirmed that Ag-NPs are capable of rendering high antibacterial efficacy and hence have great potential in the preparation of used drugs against bacterial diseases [3].

In general, gram-positive bacteria are more sensitive to plant extracts and essential oils than gram-negative bacteria. Since gram-negative bacteria have an outer layer around their cell wall and act as a barrier and limit access to hydrophobic compounds, they have less sensitivity. The findings of this study were consistent with the results of other researchers [52]. Because of the availability of studied plants in Iran and the possibility of preparing it at a lower cost than other drugs and also due to the antibacterial properties of nanoparticles biosynthesized with extracts of these plants, the results of such research may be of interest to researchers, experts, and manufacturers of drugs and can be used to combat infections caused by these bacteria. Among nanoparticle production methods, the green production method is clean, cheap, low-risk, and environmentally friendly. The silver nanoparticles produced by this method have the potential to be used in industries related to human health due to the absence of hazardous chemicals. Therefore, a combination of the mentioned factors has caused the silver nanoparticles obtained by using the extract of this plant to have good inhibitory effects on *S. aureus*.

According to previous studies, it can be concluded that due to its high nutritional and medicinal properties, the *Pistacia atlantica* plant can be considered a suitable option in the production of nanoparticles by green method and its application in human health-related industries such as food hygiene and treatment. The results of this study showed that *Pistacia atlantica* extract in a short time can reduce silver ions in the form of nanoparticles with a suitable and stable particle size distribution, which has good inhibitory and lethal properties on *S. aureus*. Therefore, studying the potential of *Pistacia atlantica* extract can be a solution for its effective use and a cheap and biocompatible way to produce nanoparticles.

Suggestions: According to the results obtained in this study and the good antimicrobial effect of *Pistacia atlantica* nanoparticles on *S. aureus*, methods of reducing the particle size of *Pistacia atlantica* silver nanoparticles and their evaluation with other methods of measuring nanoparticles and their antimicrobial effect are recommended for other gram-positive bacteria to find more information and make optimal use of this unique plant.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

There were no ethical considerations to be considered in this research.

Funding

This research is a group research work of Mr. Dr. Jalal Mardane, a member of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Infectious Diseases Research Center, [Gonabad University of Medical Sciences](#), Elaha Moradi, a graduate of Master's in Food Science and Technology, and students of [Shahed Reihaneh Al-Nabi High School](#), Gonabad city, which Financial support has been provided by the honorable management of [Shahed Reihaneh Al-Nabi High School](#).

Authors' contributions

Conceptualization and methodology: Elaha Moradi; Research, data collection, writing - draft and original: all authors; data analysis: Elaha Moradi; Funding and editing of references: All authors.

Conflicts of interest

The authors of this article declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors consider it necessary to express their gratitude to the management of [Reyhaneh Al-Nabi Girls' High School](#) in Gonabad, Miss Moradi. Also, the cooperation of the esteemed director of the [Central Laboratory of the Food Science and Technology Research Institute of Khorasan Razavi](#), Dr. Faizi, and his colleagues is appreciated.

مقاله پژوهشی

سنتز نانوذرات نقره گیاه بنه و اثرات ضد باکتریایی آن بر روی سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک استافیلوکوکوس اورئوس

الهه مرادی^۱، مبینا احمدی^۲، نرگس توکلی^۳، فاطمه نصیرزاده^۳، نسترن یوسف‌نژاد^۳، *جلال مردانه^۳

۱. گروه مهندسی کشاورزی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، استان خراسان رضوی، ایران.
۲. دانش آموز رشته علوم تجربی، دبیرستان شاهد ریحانه‌النبی گناباد، استان خراسان رضوی، ایران.
۳. گروه میکروپزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، استان خراسان رضوی، ایران.

Use your device to scan and read the article online



Citation Moradi E, Ahmadi M, Tavakoli N, Nasirzadeh F, Yoosofnejad N, Mardaneh J. [Synthesis of Silver Nanoparticles of Plant Extract Pistaciaatlantica and Their Antibacterial Effects on Antibiotic Resistant Strains of S. Aureus (Persian)]. *Internal Medicine Today*. 2022; 28(2):244-263. <https://doi.org/10.32598/HMS.28.2.1402.5>

doi <https://doi.org/10.32598/HMS.28.2.1402.5>

چکیده

تاریخ دریافت: ۰۹ مرداد ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۱۲ اسفند ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۱۲ فروردین ۱۴۰۱

اهداف در سال‌های اخیر سنتز نانوذرات نقره با گیاهان به دلیل سرعت بیشتر و ارزان تر بودن در مقیاس بزرگ‌تری انجام شده است. همچنین افزایش بیماری‌زایی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود دارد. در این مطالعه، بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره بنه و خواص ضد میکروبی آن گزارش شده است.

مواد و روش‌ها از عصاره بنه به عنوان عامل کاهنده برای بیوسنتز نانوذرات نقره استفاده شد. تشکیل نانوذرات با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV) تأیید شد. نانوذرات به دست آمده برای تعیین میانگین $Z(d.nm)$ و PDI نانوذرات با استفاده از پراکندگی نور دینامیکی و فعالیت بازدارندگی (حداقل غلظت بازدارندگی) و کشندگی آن (حداقل غلظت باکتری کشی) در برابر استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد. قطر هاله رشد باکتری نیز اندازه گیری شد.

یافته‌ها طیف UV-Vis نوار جذبی در حدود ۳۵۰ تا ۴۵۰ نانومتر را نشان می‌دهد که در واقع، نشان‌دهنده نانوذرات بیولوژیکی نقره است. اندازه و خواص مورفولوژیکی نانوذرات با پراکندگی نور دینامیکی انجام شد که نشان می‌دهد قطر هیدرودینامیکی آن (Z-Average) در حدود ۱۱۳۲ نانومتر و عدد شاخص پراکندگی در حدود ۰/۳۷۳ است که این نتایج نشان‌دهنده توزیع یکنواخت اندازه ذرات و پایداری نانوذرات است. خواص بازدارندگی و کشنده نانوذرات بنه بر روی گونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC ۱۷۶۴) ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر است. همچنین قطر هاله رشد باکتری ۱۲ میلی‌متر است که در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد.

نتیجه‌گیری نانوذرات بیو نقره بنه علیه استافیلوکوکوس اورئوس فعالیت ضد میکروبی خوبی داشتند.

کلیدواژه‌ها:

سنتز سبز، نانوذرات نقره، بنه، DLS، حداقل غلظت مهاری و کشنده

* نویسنده مسئول:

دکتر جلال مردانه

نشانی: گناباد، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، گروه میکروپزشکی.

تلفن: ۱۸۹۲۱۵۸ (۹۱۷) +۹۸

پست الکترونیکی: Jalalmardaneh@yahoo.com

مقدمه

نانوتکنولوژی عبارت است از طراحی، شناسایی، تولید و کاربرد مواد، ابزارها و سیستم‌ها با کنترل شکل و اندازه در مقیاس نانومتری [۱]. در سال‌های اخیر، هم‌گرایی بین فناوری نانو و زیست‌شناسی، زمینه جدیدی از فناوری نانو ایجاد کرده است. نانوبیوتکنولوژی، علم استفاده از میکروارگانیسم‌ها در تعدادی از فرایندهای بیوشیمیایی و بیوفیزیکی است [۲]. این زمینه نسبتاً جدید بر ایجاد، راه‌اندازی و استفاده از مواد در مقیاس نانو در بیوتکنولوژی پیشرفته، تمرکز دارد [۳].

در مقایسه با میکروارگانیسم‌ها، استفاده از گیاهان به‌دلیل نبود فرایندهای پیچیده و چندمرحله‌ای خاص مانند تصفیه، تهیه و نگهداری محیط کشت کارآمدتر است [۴]؛ بنابراین سنتز نانوذرات توسط گیاهان سریع‌تر، ارزان‌تر و در مقیاس بزرگ‌تر از میکروارگانیسم‌ها است [۵، ۶]. توجه به تولید نانوذرات سبز باعث شروع مطالعه جامعی شده است که نشان می‌دهد استفاده از عصاره‌های گیاهی، مؤثرترین راه برای تولید نانوذرات دوستدار محیط‌زیست است [۷، ۸].

عصاره گیاه حاوی مواد فعالی است که مسئول کاهش یون‌های فلزی نانوذرات سنتز است [۹]. از مزایای استفاده از گیاهان در سنتز نانوذرات می‌توان به استفاده آسان، امنیت زیستی، غیرسمی و ارزان بودن و داشتن متابولیت‌های متنوعی که در کاهش یون نقش دارند، اشاره کرد [۱۰]. به‌طور کلی، خواص اصلی نانو ذرات نقره شامل سمی نبودن، پایداری بالا، آب‌دوستی، مقاومت حرارتی، عدم توسعه و افزایش مقاومت در میکروارگانیسم‌هاست [۱۱].

مطالعات متعدد نشان داده‌اند اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره به اندازه و شکل آن‌ها بستگی دارد [۱۲، ۱۳]. در مطالعه اسپینوزا و همکاران، نانوذرات نقره خواص ضدباکتریایی قوی در برابر استرپتوکوک موتانس نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد با کاهش اندازه نانوذرات نقره از ۱۰۰ نانومتر به ۱۶ نانومتر، حداقل غلظت بازدارندگی به نصف کاهش می‌یابد که به‌معنای افزایش خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره کوچک‌تر است [۱۴].

امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی در سنتز نانوذرات فلزی، به‌ویژه به نقره بیشتر توجه شده است [۱۵]. گونه‌های مختلفی از بنه در جهان رشد می‌کند. در ایران در استان‌های ایلام، گیلان، آذربایجان، لرستان، کرمانشاه، همدان، کردستان، مرکزی، کرمان، فارس، تهران، خراسان و سیستان و بلوچستان می‌روید. عصاره استخراج‌شده از پسته کوهی، سبز رنگ، بسیار سبک، غلیظ و چسبنده است که مصارف دارویی فراوانی دارد و به‌عنوان ملین قوی در درمان یبوست و اختلالات گوارشی استفاده می‌شود [۱۶، ۱۷].

همچنین شناسایی ترکیبات، فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی و اثرات ضدباکتریایی و قارچی گیاهان دارویی اهمیت زیادی دارد [۱].

افزایش استفاده از آن‌تی‌بیوتیک‌های درمانی رایج، شاهد گسترش گونه‌های میکروبی بیماری‌زای مقاوم به آن‌تی‌بیوتیک هستیم. توجه به گیاهان دارویی و بومی با اثر ضد میکروبی، می‌تواند مشکلات ناشی از آن‌تی‌بیوتیک‌ها را تا حدودی کاهش دهد. عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به‌عنوان یکی از عوامل ضد میکروبی مهم در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از پژوهشگران در زمینه‌های پزشکی، دارویی و غذایی قرار گرفته است. از بین باکتری‌ها، جنس استافیلوکوکوس^۱ از خانواده میکروکوک‌ها بسیار مهم است. این باکتری‌ها گرم مثبت، بی‌حرکت، بدون اسپور، هوازی و بی‌هوازی اختیاری هستند [۱۸-۲۰].

استافیلوکوک‌ها بیش از ۲۰ گونه دارند که در زیستگاه‌های مختلف پراکنده شدند [۲۱]. دانشمندان با انجام آزمایشات مختلف و مصرف شیر آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس، علائم و نشانه‌های مسمومیت غذایی را نشان دادند [۲۲]. استافیلوکوکوس اورئوس نیز عامل عفونت‌های بیمارستانی و عفونت‌های اکتسابی از جامعه است و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آن‌تی‌بیوتیک، یکی از مشکلات جدی بیمارستان و جامعه است [۲۳، ۲۴].

مطالعات نشان داده‌اند سنتز نانوذرات نقره سبز با استفاده از عصاره بنه^۲ کوهی کمتر شناخته شده است. بنابراین هدف از این مطالعه، سنتز نانوذرات نقره سبز از گیاه بنه کوهی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و غیرهوازی اختیاری استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC ۱۷۶۴) مقاوم به آن‌تی‌بیوتیک‌ها است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در خلوص بالا تهیه شده‌اند. نیتрат نقره^۳، اسید کلریدریک^۴ و هیدروکسید سدیم^۵ از شرکت مرک آلمان تهیه شد. برای محلول‌سازی و شست‌وشو از آب مقطر ۲ بار تقطیر شده (شرکت سرم‌سازی ثامن) استفاده شد. در این تحقیق، گیاه بنه کوهی از شهرستان بجستان در خراسان رضوی جمع‌آوری شد و گیاه‌شناس آن را تأیید کرد.

تهیه عصاره آبی گیاه بنه

برای تهیه عصاره آبی، ابتدا بنه با پوست با آب مقطر به‌خوبی شسته شد. در دمای اتاق خشک و پوست آن جدا شد. سپس ۱۰۰ گرم گیاه بنه پوست‌کنده، ۳ بار با آب مقطر (شرکت سرم‌سازی ثامن) و هر بار ۱ دقیقه شسته شد. سپس نمونه با

1. Staphylococcus aureus
2. Pistacia Atlantica
3. AgNO₃
4. HCl
5. NaOH

استفاده شد. بدین ترتیب، سوسپانسیون در لایه‌های مخصوص اسپکتروفتومتر ریخته و میزان جذب نور آن‌ها مشخص شد. برای ایجاد کدورت ۰/۵ مک فالن، جذب نور در طول موج ۶۲۰ نانومتر باید ۰/۱-۰/۰۸ باشد که معادل واحد کلنی در هر میلی‌لیتر از باکتری است. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار پخش و در مرحله بعد، دیسک عصاره با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در پلیت حاوی محیط کشت قرار داده شد. از دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) ساخت شرکت پادتن طب به‌عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی محلول آب‌مقطر دیونیزه به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. قطر ناحیه بازدارنده رشد با کولیس برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و میانگین آن ثبت شد [۲۶].

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی^۷ با روش میکرودايلوشن

در این مطالعه، از روش میکرودايلوشن براث برای تعیین حداقل غلظت مهاری استفاده شد. حداقل غلظتی که در آن عصاره از رشد میکروارگانیسم آزمایش‌شده جلوگیری می‌کند (غلظت آخرین چاهی که در آن کدورت ایجاد نشده است). بدین ترتیب، سویه باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت مولر هینتون با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند معادل واحد کلنی (در هر میلی‌لیتر) تهیه شد و پس از رقیق‌سازی، سوسپانسیونی با غلظت واحد کلنی (در هر میلی‌لیتر) به دست آمد.

همچنین از عصاره آبی گیاه بنه با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، رقت‌های متوالی در آب‌گوشت تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره در میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته شد. سپس ۹۵ میکرولیتر محیط کشت براث و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی اضافه شد. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد. همچنین چاه‌های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت براث با باکتری به‌عنوان شاهد مثبت و یک چاه حاوی محیط کشت، باکتری و آنتی‌بیوتیک (جنتامایسین) به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند. سپس میکروپلیت‌ها جوشانده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر به کمک کرومات مدل ELIZARIDER ۴۳۰۰ ساخت ایالات متحده آمریکا خوانده شد. نتایج ثبت و سپس حداقل غلظت بازدارندگی از روی آن محاسبه شد (تصویر شماره ۱) [۲۷، ۲۸].

تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی^۸

پس از تعیین حداقل غلظت بازدارندگی، آزمایش تعیین حداقل غلظت باکتری‌کش انجام شد. برای این منظور و در جهت تعیین حداقل غلظت کشنده عصاره در برابر باکتری‌ها،

الکل ۷۰ درصد از شرکت مرک آلمان، ۲ دقیقه ضدعفونی شد. در نهایت، ۳ بار با آب‌مقطر، هر بار ۲ دقیقه شست‌وشو شد. برای تهیه عصاره آبی ابتدا ۳۰ گرم از گیاه مطالعه‌شده شسته و در دمای اتاق قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. سپس این مقدار از بنه در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب ۲ بار مقطر (شرکت سرم ثامن) به آن اضافه شد. مخلوط ۱۰ دقیقه جوشانده شد. عصاره آبی گیاه بنه با استفاده از کاغذ صافی شرکت واتمن انگلستان با منافذ ۲۵ میکرونی فیلتر شد و برای حذف ذرات معلق در عصاره، نمونه با سانتریفیوژ (DIGICEN21، اسپانیا) دور ۹۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس عصاره برای استفاده بعدی در یخچال (امرسان، ایران) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۵].

ستز نانو ذرات

۱۰ میلی‌لیتر از عصاره بنه تهیه‌شده با ۹۰ سی‌سی محلول ۱ میلی‌مولار نیترات نقره مخلوط شد و محلول ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی هم‌زن مغناطیسی قرار گرفت. برای مشاهده تغییرات رنگ، جذب محلول با دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Vis) مدل CT-۵۷۰۰ ساخت تایوان در محدوده ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر بررسی شد. محلول حاوی نانو ذرات با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه ۱۵ دقیقه (DIGICEN21، اسپانیا) سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی دور ریخته شد [۲۵]. رنگ محلول پس از تولید نانو ذرات به قهوه‌ای تیره تغییر می‌کند. این تغییر نشانه تولید نانو ذرات نقره است. پس از مشاهده تغییر رنگ، نانو ذرات تولیدشده زیستی برای تشخیص و شناسایی بهتر با روش‌های دیگر بررسی شدند [۱۵].

به‌منظور کاهش تعداد یون‌های نقره (Ag^+) و تأیید تشکیل نانو ذرات نقره، پس از افزودن ۱ میلی‌مولار محلول نیترات نقره به عصاره و مشاهده تغییر رنگ، ۰/۲ میلی‌لیتر از نمونه برداشته و با ۲ میلی‌لیتر آب‌مقطر استریل مخلوط شد. جذب آن بررسی و در نهایت با طیف‌سنج مرئی فرابنفش در طول موج‌های ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر خوانده شد [۲۵].

اثرات ضدباکتریایی نانو ذرات نقره

سویه میکروبی استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (۱۷۶۴ PTCC) از مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی ایران تهیه شد.

روش انتشار دیسک^۹

برای تعیین خواص ضدباکتریایی عصاره آبی گیاه بنه، باکتری لیوفیلیزه استافیلوکوکوس اورئوس با کد PTCC ۱۷۶۴ ابتدا روی مولر هینتون براث شرکت مرک آلمان تلقیح و کشت میکروبی ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. از سوسپانسیون فوق پس از ورتکس برای تهیه مک‌فارلند ۰/۵

7. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

8. Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

6. Diffusion Disk



افق دانش

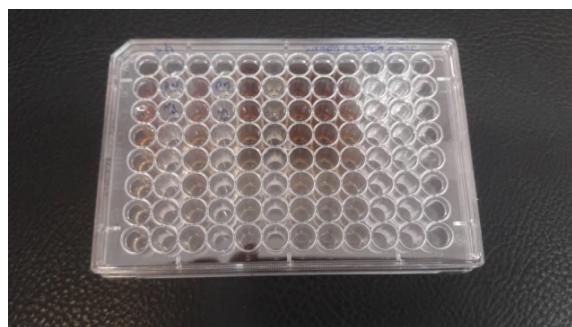
تصویر ۲. تغییر رنگ محلول واکنش نشان دهنده تشکیل نانوذرات نقره/تغییر رنگ عصاره بنه و نیترات نقره پس از ۲/۵ ساعت

یافته‌ها

سنتز نانوذرات

روش سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از احیای یون‌های نقره با عصاره بنه انجام شد. اولین نشانه تولید نانوذرات نقره، تغییر رنگ محلول است. عصاره آبی گیاه بنه، سفیدرنگ بود. پس از ۲/۵ ساعت افزودن محلول نیترات نقره و قرار گرفتن در دمای محیط، شروع به تغییر رنگ کرد که نشان دهنده سرعت واکنش بیشتری است. بعد از ۲۲ ساعت، رنگ قهوه‌ای تیره نشان دهنده تولید نانوذرات نقره در محلول است که با منابع مطابقت داشت. ظهور رنگ قهوه‌ای تیره پس از واکنش با یون‌های نقره، نشانگر بارز کاهش یون‌های فلزی و تشکیل نانوذرات نقره در محیط است (تصویر شماره ۲) [۱۰].

زمانی که تغییر رنگ با تشکیل رسوب همراه باشد، نانوذرات تشکیل شده از نظر اندازه ذرات بزرگ هستند و وقتی تغییر رنگ دادند، رسوب تشکیل نمی‌شود، نانوذرات سنتز شده تا حدی بسیار کوچک هستند و در بهترین حالت خود قرار دارند. در هیچ‌یک



افق دانش

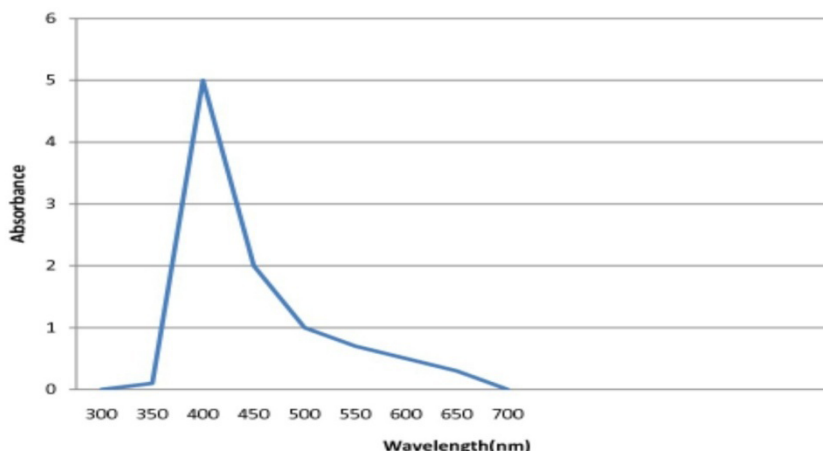
تصویر ۱. میکروتیتربلیت ۶۹ خانه‌ای استفاده شده در تکنیک میکرودایلوشن

از لوله‌های شفاف‌ی که در آن‌ها از رشد جلوگیری شده بود، برای کشت استفاده شد و ۵۰ میکرولیتر چاهک برداشته شد و در پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد مولر هینتون کشت داده شد. این صفحات ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آن، رشد نکردن باکتری حداقل غلظت کشنده عصاره را نشان داد [۲۹].

تعیین اندازه و مورفولوژی نانوذرات

در این مطالعه، میانگین اندازه و توزیع اندازه نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از ZS eutacizerDYNAMIC Light Scat- (England Malvern) Zen ۳۶۰۰ tering به‌عنوان مدل تعیین شد. در این مرحله، عدد شاخص پراکندگی^۹ تعیین می‌شود که نشان دهنده میزان همگنی اندازه نانوذرات در محلول است [۳۰].

9. Dispersion Index Number (PDI)



افق دانش

تصویر ۳. طیف اسپکترترومتری محلول حاوی نانوذرات نقره تولید شده با عصاره گیاه بنه



تصویر ۵. نتایج آزمون حداقل غلظت باکتری کشی

تصویر ۵. نتایج آزمون حداقل غلظت باکتری کشی

نتایج تجزیه و تحلیل پراکندگی نور دینامیکی^{۱۰}

پراکندگی نور دینامیکی، روش فیزیکی سریع و غیرمخرب است که برای تعیین توزیع اندازه ذرات در محلول و سوسپانسیون و برای مطالعه رفتار انتشار ماکرومولکولها در محلول استفاده می‌شود. در این مطالعه از این آزمون برای تعیین پارامترهای زیر استفاده شد:

اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیکی ذرات در حالت تعلیق (Z-Average)

نتایج آزمون پراکندگی نور دینامیکی می‌تواند به‌عنوان روش مکملی برای مطالعات تحلیلی و به‌عنوان ابزاری برای مطالعه مدل‌های پراکندگی با استفاده از شعاع هیدرودینامیکی استفاده شود. قطر به‌دست‌آمده با این روش مربوط به کره‌ای با ضریب انتقال معادل ذره اندازه‌گیری شده است.

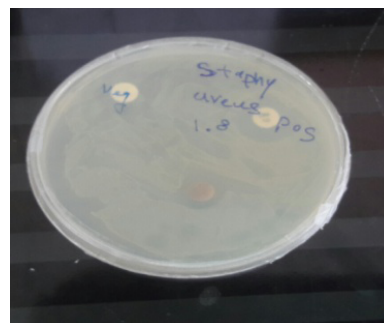
ضریب انتقال به‌اندازه ذرات، ساختار سطح، غلظت و نوع یون‌های موجود در محیط بستگی دارد، به این معنا که اندازه به‌دست‌آمده با این روش می‌تواند بزرگ‌تر از مقدار به‌دست‌آمده با میکروسکوپ الکترونی باشد. ضریب انتشار یا ضریب انتشار وابسته به غلظت است و باید در غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری شود و به‌عنوان یک عملیات استاندارد به رقت بی‌نهایت برسد. در تعیین سایر پارامترهای هیدرودینامیکی مهم و بسیار مفید است. برای مثال، شعاع هیدرودینامیکی را می‌توان با فرمول معروف استوکس-انیششتین (فرمول شماره ۱) به دست آورد.

10. Dynamic Light Scattering (DLS)

جدول ۱. میانگین قطر هاله عدم رشد بر میکروارگانیسم استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه‌شده برحسب میلی‌متر

غلظت عصاره آبی (میلی گرم بر میلی لیتر)	میکروارگانیسم
۱۰۰۰	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۲	جنتامایسین
۱۲/۰۰±۵۰	

تصویر ۴. هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس



تصویر ۴. هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس

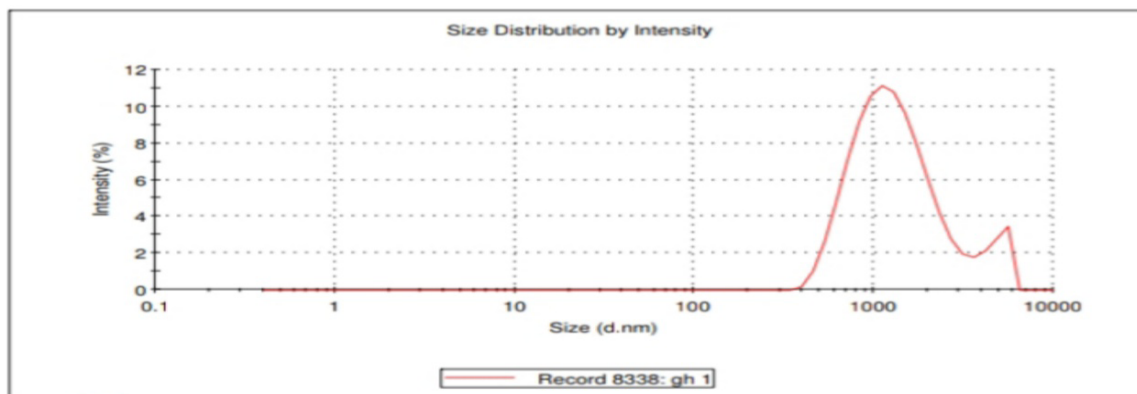
تصویر ۴. هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس

از محلول‌های نانوذراتی تولیدشده با عصاره بنه، رسوب تشکیل نشد که نشان‌دهنده اندازه ذرات مناسب نانوذرات بنه است. نتایج طیف‌سنجی مرئی فرابنفش عصاره بنه پس از سنتز نانوذرات نقره نشان داد حداکثر پیک جذب منحنی در محدوده ۳۵۰ تا ۴۵۰ نانومتر است که نشان‌دهنده سنتز نانوذرات نقره است (تصویر شماره ۳) [۱۰].

نتایج آزمون‌های میکروبی نانوذرات نقره

نتایج دیفیوژن دیسک (قطر هاله عدم رشد) با کولیس برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و میانگین ثبت شد. همان‌طور که در نتایج مشاهده می‌شود، قطر ناحیه بازدارنده رشد استافیلوکوکوس اورئوس در اطراف دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ۱۷ میلی‌متر و قطر ناحیه بازدارنده رشد استافیلوکوکوس اورئوس در اطراف دیسک با عصاره آبی نانوذرات بنه با غلظت آغشته شده است. از ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر، ۱۲ میلی‌متر مشاهده شد. این بدان معناست که عصاره آبی نانوذرات بنه می‌تواند به‌خوبی از رشد استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری کند (تصویر شماره ۴ و جدول شماره ۱).

حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری کشی نانوذرات و عصاره بنه روی استافیلوکوکوس اورئوس تعیین شد. همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، در این مطالعه کمترین نانوذرات و عصاره‌های بازدارنده برای استافیلوکوک ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین غلظت باکتری کشی نانوذرات و عصاره‌ها، ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد (تصویر شماره ۵).



افق دانش

تصویر ۶. اندازه ذرات آنالایزر، نشان دهنده توزیع اندازه نانوذرات سنتز شده در آزمایش بهینه براساس میانگین کوچک ترین ذرات ۱۱۳۲ نانومتر

بحث

فناوری نانو نقره در مواد ضدباکتریایی انقلابی ایجاد کرده که کانون اصلی توسعه محصولات نانونقره است و نسبت به مواد شیمیایی مزایای زیادی دارد [۳۳]. یکی از معایب روش های شیمیایی برای تولید نانوذرات، سرعت پایین تولید و انرژی های بالای فرایند واکنش است [۳۴]، اما در روش سنتز سبز، استفاده از ترکیبات گیاهی بدون نیاز به سورفکتانت، شرایط خاص و سایر عوامل تثبیت کننده انجام می شود [۳۵]. بنابراین در این تحقیق، نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه بنه به روش زیست پایایی تولید و اثرات ضدباکتریایی آن بررسی شد. اساس سنتز نانوذرات کاهش یون های نمک آن ها و در واقع، خنثی سازی بار الکتریکی است. در این تحقیق، این فرایند ۲۲ ساعت در دمای اتاق تکمیل شد که نشان دهنده سرعت بالای این روش و نیاز آن به دماهای بالا برای تشکیل نانوذرات نقره است که مشابه نتایج تحقیقات سیورامان و همکاران و ساتیاوات و همکاران است [۳۶].

عصاره بنه با فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، تری ترپنوئیدها و ساپونین های بالا، پتانسیل بالایی برای کاهش نانوذرات نقره دارد [۳۸]. اکسیداسیون گروه های عاملی مانند هیدروکسیل، کربونیل، آلدئید می تواند یون های نقره را کاهش دهد و در نتیجه، نانوذرات نقره تولید شود [۳۹، ۴۰].

$$1. D_r = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_h}$$

R_h شعاع هیدرودینامیکی ذره، K_B ثابت بولتزمن، η ویسکوزیته حلال است که به دما وابسته بوده و به چگالی و فشار سیستم مرتبط نیست، T دمای مطلق و ضریب نفوذ است [۳۱].

تعیین توزیع اندازه ذرات با استفاده از شاخص بدون بُعد (PDI)

اگر مقدار PDI کمتر از ۰/۵ باشد، ذرات توزیع یکنواخت عالی دارند. اگر مقدار PDI بزرگ تر از ۰/۷ باشد، نشان دهنده این است که نمونه توزیع، اندازه بسیار گسترده ای دارد و احتمالاً برای روش پراکندگی نور دینامیکی مناسب نیست و به طور کلی اگر اندازه این شاخص بین ۰/۱ تا ۰/۵ باشد، ذرات توزیع یکنواخت خوبی دارد. اندازه قطر هیدرودینامیکی و عدد PDI نمونه در جدول شماره ۲ ارائه شده است. همان طور که نتیجه پراکندگی نور دینامیکی نشان می دهد، قطر هیدرودینامیکی نانوذرات ۱۱۳۲ نانومتر است. مقدار PDI، ۰/۳۷۳ است که نشان می دهد نانوذرات در حالت پایدار هستند ($PDI > 0.7 > 0.1$) و توزیع اندازه ذرات مناسب است (جدول شماره ۳).

اندازه گیری دقیق سایز نانوذرات با زتاسایزر

نتایج تحلیل گر اندازه ذرات نشان داد اندازه نانوذرات سنتز شده ۱۱۳۲ نانومتر است. تصویر شماره ۶، دو قله ۱۱۳۲ نانومتر و ۴۷۰۷ نانومتر را نشان می دهد.

جدول ۲. نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری کشی ایجاد شده با عصاره و نانوذرات نقره تولید شده به روش سبز روی سویه استافیلوکوکوس اورئوس

سویه باکتری	آزمون	نانوذرات تولیدی با عصاره آبی بنه
استافیلوکوکوس اورئوس	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	۱۲/۵
ATCC ۱۷۶۴	MBC ($\mu\text{g/ml}$)	۱۲/۵

افق دانش

جدول ۳. نتایج تحلیل پراکندگی نور دینامیکی نمونه

نمونه	عدد شاخص پراکندگی	قطر هیدرودینامیکی (d.nm)	دمای واکنش (درجه سانتی گراد)	عرض (نانومتر)
نانوذره بنه	۰/۳۷۳	۱۱۳۲	۲۵	۰/۸۴۴

نتیجه‌گیری

هزینه مراقبت‌های بهداشتی را به دلیل طول درمان (از جمله بستری شدن در بیمارستان) و بهبود، همراه با شکست درمان آنتی‌بیوتیکی، نیاز به توسعه عوامل جدید آنتی‌بیوتیکی، استفاده از روش‌های جدی‌تر و کنترل گسترده‌تر عفونت افزایش می‌دهد. با پیشرفت فناوری نانو و ایجاد نانوذرات نقره و خواص ضد میکروبی اثبات شده این نانوذرات، برای جلوگیری از گسترش پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کاربرد دارند و استفاده از آن‌ها در پزشکی و علوم مرتبط روز به روز به طور چشمگیری افزایش یافته است [۴۸].

ترکیب این روش‌ها با آنتی‌بیوتیک درمانی می‌تواند انگیزه مهمی برای پژوهشگران برای مطالعه برای یافتن، خالص سازی و استاندارد سازی نانو محصولات گیاهی مؤثر (که سمیت انتخابی بهتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند) مانند بنه باشد. تاکنون مطالعات زیادی برای بررسی خواص ضد میکروبی عصاره صمغ بنه انجام شده است. پناهی و همکاران اثر اسانس صمغ بنه بر خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی فیلم خوراکی نشاسته را بررسی کردند. باتوجه به یافته‌های این مطالعه، اسانس صمغ بنه را می‌توان به عنوان یک نگهدارنده طبیعی به فیلم‌های زیست تخریب پذیر اضافه کرد [۴۹].

علیزاده و همکاران، خواص فیزیکی و ضد میکروبی فیلم خوراکی کیتوزان حاوی اسانس صمغ بنه را بررسی کردند و نتایج این مطالعه نشان داد اسانس صمغ بنه به عنوان یک ماده ضد میکروبی طبیعی پتانسیل بالایی برای تولید فیلم‌های ضد میکروبی دارد [۵۰]. با این حال، مطالعات اندکی درباره خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره بنه به ویژه تأثیر نانوذرات تولید شده با استفاده از عصاره این گیاه بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس توسط پژوهشگران گزارش شده است. به دلیل فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس در غذا، نقش این میکروارگانیسم را به عنوان یکی از عوامل مسمومیت نباید نادیده گرفت.

از آنجاکه انتروتوکسین‌های این باکتری در برابر حرارت و پروتئاز مقاوم هستند و در فرایند حرارت و پخت از بین نمی‌روند، شیوع بالای ژن‌های انتروتوکسین در این مطالعه نشان دهنده نقش بالقوه این باکتری در ایجاد مسمومیت غذایی است. افزایش شیوع و مقاومت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های CA-MRSA جداسازی شده از غذا می‌تواند مشکلی جدی برای سلامت عمومی باشد؛ بنابراین باید برای جلوگیری از آلودگی مواد غذایی و افزایش سطح بهداشت تصمیمات جدی اتخاذ شود [۵۱].

در تصویر شماره ۲، تغییر رنگ مشاهده شده به قهوه‌ای تیره در عصاره بنه از تشکیل نانوذرات نقره فعال، نشانه واضحی بود [۴۱] و همچنین نتایج کاملاً مشابه نتایج تحقیقات ردی و گاندی [۴۲] بود.

همان‌طور که در تصویر شماره ۳ نشان داده شد، پیک تشکیل شده در طول موج ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر نشان دهنده تشکیل نانوذرات نقره است و مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره است که به القای الکترون‌های آزاد در نانوذرات نسبت داده می‌شود [۴۳]. اندازه قطرهای هیدرودینامیکی (Z-Average) و توزیع اندازه ذرات (PDI) با روش پراکندگی نور دینامیکی اندازه گیری شد. نتایج نشان داد اندازه نانوذرات سنتز شده با استفاده از زتاسایزر ۱۱۳۲ نانومتر است.

دو قله در تصویر شماره ۶ دیده می‌شود که قله بزرگ‌تر نشان دهنده تجمع به دلیل بار سطحی بین ذرات است. توزیع اندازه ذرات ۰/۳ بود که نشان می‌دهد نانوذرات در حالت پایدار هستند ($PDI < 0.7$) و توزیع اندازه ذرات مناسب است. همان‌طور که در منحنی توزیع اندازه ذرات نمونه در تصویر شماره ۶ نشان داده شد، نبود وجود پیک‌های بزرگ در نمونه شاید نشان دهنده این است که نانوذرات در محلول حجیم تشکیل نشده‌اند. به این معنا که نانوذرات به خوبی تشکیل شده‌اند که با نتایج تحقیقات سایر پژوهشگران هم‌خوانی دارد [۴۴، ۴۵].

درواقع، سازوکار اصلی خواص ضد باکتریایی نانوذرات نقره، آزاد سازی یون‌های نقره است. برخی از سازوکارهای اصلی عمل یون‌های نقره عبارت‌اند از: آسیب به غشای سلولی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن، حمله سلولی یون‌های نقره (یا حتی نانوذرات نقره به دلیل حفره‌های غشایی)، آسیب بیشتر به محصولات ATP و مهار تکثیر DNA. در بسیاری از مطالعات، آسیب به غشای سلولی به وسیله یون‌های نقره گزارش شده است. این گزارش‌ها عمدتاً بر اساس مشاهده حفره‌ها یا سوراخ‌های بزرگ در غشای باکتری با تجزیه و تحلیل TEM انجام می‌شود. یون‌های نقره ممکن است با پروتئین‌های غشایی حاوی گوگرد (برای مثال، تیول‌های پروتئین زنجیره تنفسی) تعامل داشته باشند و باعث آسیب فیزیکی به غشا شوند [۴۶].

وجود اثرات ضد میکروبی قوی در محصولات گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا امروزه یکی از مشکلات عمده علم پزشکی، ایجاد مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در بسیاری از پاتوژن‌های رایج است [۴۷]. افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی

است. نانوذرات نقره تولید شده با این روش به دلیل استفاده نکردن از مواد شیمیایی خطرناک، قابلیت استفاده در صنایع مرتبط با سلامت انسان را دارند. پس ترکیبی از عوامل ذکر شده باعث شد که نانوذرات نقره به دست آمده با استفاده از عصاره این گیاه اثرات بازدارندگی خوبی بر استافیلوکوکوس اورئوس داشته باشد.

باتوجه به مطالعات فوق می توان نتیجه گرفت که گیاه بنه به دلیل داشتن خواص غذایی و دارویی بالا می تواند به عنوان گزینه ای مناسب در تولید نانوذرات به روش سبز و کاربرد آن در صنایع مرتبط با سلامت انسان مانند بهداشت و درمان مواد غذایی مورد توجه قرار گیرد. نتایج این تحقیق نشان داد عصاره بنه در زمان کوتاهی قادر به کاهش یون های نقره به صورت نانوذرات با توزیع اندازه ذرات مناسب و پایدار است که خاصیت بازدارندگی و کشنده خوبی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس دارد؛ بنابراین مطالعه پتانسیل عصاره بنه می تواند راه حلی برای استفاده مؤثر از آن و راهی ارزان و زیست سازگار برای تولید نانوذرات باشد.

باتوجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و اثر ضد میکروبی خوب نانوذرات بنه بر استافیلوکوکوس اورئوس، روش های کاهش اندازه نانوذرات نقره بنه و ارزیابی آن با سایر روش های اندازه گیری نانوذرات و اثر ضد میکروبی آن، توصیه می شود در مورد سایر باکتری های گرم مثبت تحقیقات بیشتری انجام شود و از این گیاه منحصر به فرد استفاده بهینه شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش، کار تحقیقاتی است که در آن ملاحظات اخلاقی وجود نداشت.

حامی مالی

این پژوهش کار گروهی جناب آقای دکتر جلال مردانه عضو گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، الهه مرادی، دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی و دانش آموزان دبیرستان شاهد ریحانه النبی شهرستان شاهد ریحانه النبی انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم پردازی، تحلیل داده ها و روش شناسی: الهه مرادی؛ تحقیق، گردآوری اطلاعات، نگارش پیش نویس و اصلی، منابع مالی و ویرایش منابع: همه نویسندگان.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت باکتری کشی این نوع نانوذره بر روی استافیلوکوکوس اورئوس نشان می دهد این نانوذره اثر بازدارندگی رشد و اثر کشنده بر استافیلوکوکوس اورئوس دارد. با بررسی رشد یا رشد نکردن باکتری ها در محیط کشت حاوی نانوذرات، حداقل غلظت بازدارنده تعیین شد. مقایسه اثر ضد باکتریایی نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره بنه نشان می دهد اثر ضد باکتریایی نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره بنه روی این باکتری بسیار مؤثر است. پیش بینی می شود خواص ضد باکتریایی خوب نانوذرات سنتز شده در این مطالعه به دلیل وضعیت پایدار نانوذرات تشکیل شده ($PDI < 0.1$) و توزیع اندازه مناسب نانوذرات بنه باشد [۴۴]. در مطالعه حاضر، در نتایج به دست آمده از آزمایش قطر متوسط هاله در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم نانوذرات بنه بر روی استافیلوکوک، قطر هاله عدم رشد ۱۲ میلی متر بود که بیانگر خاصیت ضد میکروبی عصاره این گیاه است.

املیان و همکاران، سنتز نانوذرات نقره و اثرات آنتی اکسیدانی، سمیت سلولی و ضد باکتریایی آن ها در شرایط آزمایشگاهی در عصاره برگ بنه را بررسی کردند و نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات نقره از رشد باکتری ها جلوگیری می کند. غلظت ۷ میکروگرم بر میلی لیتر و در غلظت ۳ تا ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر حذف شد. در نهایت، نانوذرات نقره سنتز شده، غیر سمیت سلولی، فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی را به روشی وابسته به دز نشان دادند [۲].

صادقی و همکاران، سنتز سبز آسان نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه بنه و فعالیت ضد باکتریایی آن را بررسی کردند. نتایج حاکی از آن بود که نانوذرات نقره سنتز شده به عنوان عامل ضد باکتری مؤثر عمل می کنند. این مطلب که نانوذرات نقره قادر به ارائه اثر ضد باکتریایی بالا هستند و از این رو، پتانسیل زیادی در تهیه داروهای استفاده شده در برابر بیماری های باکتریایی دارند، تأیید شده است.

به طور کلی باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی به عصاره ها و اسانس های گیاهی حساسیت بیشتری دارند. باتوجه به اینکه باکتری های گرم منفی در اطراف دیواره سلولی خود یک لایه بیرونی دارند و به عنوان مانع عمل کرده و دسترسی ترکیبات آب گریز را محدود می کنند؛ بنابراین از حساسیت کمتری برخوردارند. یافته های این مطالعه با نتایج سایر پژوهشگران سازگار بود [۵۲].

باتوجه به در دسترس بودن گیاهان مورد مطالعه در کشور ما و امکان تهیه آن با هزینه کمتر نسبت به سایر داروها و همچنین به دلیل خواص ضد باکتریایی نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره این گیاهان، نتایج چنین تحقیقاتی می تواند مورد توجه پژوهشگران، کارشناسان و تولید کنندگان دارو بوده و برای مبارزه با عفونت های ناشی از این باکتری ها استفاده شود. در بین روش های تولید نانوذرات، روش تولید سبز، ارزان، کم خطر و سازگار با محیط زیست

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مدیریت دبیرستان دخترانه ریحانه‌النبی شهرستان گناباد، خانم مرادی تقدیر و تشکر می‌کنند. همچنین از همکاری ریاست محترم آزمایشگاه مرکزی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی، فیضی و همکاران آن‌ها قدردانی می‌شود.

References

- [1] Ponce Del Castillo. The European and member states' approaches to regulating nanomaterials: Two levels of governance. *Nanoethics*. 2013; 7:189–99. [DOI:10.1007/s11569-013-0181-7]
- [2] Dwivedi AD, Gopal K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010; 369(1-3):27-33. [DOI:10.1016/j.colsurfa.2010.07.020]
- [3] Martin-Sanchez F, Maojo V. Biomedical informatics and the convergence of Nano-Bio-Info-Cogno (NBIC) technologies. *Yearb Med Inform*. 2009; 134-42. [PMID]
- [4] Shah M, Fawcett D, Sharma S, Tripathy SK, Poinern GEJ. Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Materials*. 2015; 8(11):7278-308. [DOI:10.3390/ma8115377] [PMID] [PMCID]
- [5] Makarov VV, Love AJ, Sinitsyna OV, Makarova SS, Yaminsky IV, Taliansky ME, et al. Green nanotechnologies: Synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae*. 2014; 6(1):35-44. [DOI:10.32607/20758251-2014-6-1-35-44] [PMID] [PMCID]
- [6] Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using *Neem* (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004; 275(2):496-502. [DOI:10.1016/j.jcis.2004.03.003] [PMID]
- [7] Singh M, Kumar M, Kalaivani R, Manikandan S, Kumaraguru AK. Metallic silver nanoparticle: A therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2013; 36(4):407-15. [DOI:10.1007/s00449-012-0797-y] [PMID]
- [8] Protima R, Rauwel E. Emerging trends in nanoparticle synthesis using plant extracts for biomedical applications. *Global Journal of Nanomedicine*. 2017; 1(3):555562. [DOI:10.19080/GJN.2017.01.555562]
- [9] Li X, Xu H, Chen ZS, Chen G. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *Journal of Nanomaterials*. 2011; 2011:1-16. [DOI:10.1155/2011/270974]
- [10] Roy N, Barik A. Green synthesis of silver nanoparticles from the unexploited weed resources. *International Journal of Nanotechnology and Applications*. 2010; 4(2):95-101. [Link]
- [11] Percival SL, Bowler PG, Dolman J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. *International Wound Journal*. 2007; 4(2):186-91. [DOI:10.1111/j.1742-481X.2007.00296.x] [PMID] [PMCID]
- [12] Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2012; 8(1):37-45. [PMID]
- [13] Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73(6):1712-20. [PMID] [PMCID]
- [14] Espinosa-Cristóbal LF, Martínez-Castañón GA, Martínez-Martínez RE, Loyola-Rodríguez JP, Patiño-Marín N, Reyes-Macías JF, et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Materials Letters*. 2009; 63(29):2603-6. [DOI:10.1016/j.matlet.2009.09.018]
- [15] Gnanadesigan M, Anand M, Ravikumar S, Maruthupandy M, Ali SM, Vijayakumar V, et al. Antibacterial potential of biosynthesised silver nanoparticles using *Avicennia marina* mangrove plant. *Applied Nanoscience*. 2012; 2:143–7. [DOI:10.1007/s13204-011-0048-6]
- [16] Jafari Kokhdan A, Zarifian A. [Floristic study of saverz mountain in kohgiluyeh and boyer-ahmad province (Persian)]. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 2016; 28(5):929-51. [Link]
- [17] Doosti B. [The comparison of antibacterial and antifungal effects of *Pistacia atlantica* gum with some inuse antibiotics (Persian)]. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 2019; 32(1):115-24. [Link]
- [18] Kiaei E, Mazandarani MA, Ghaemi E. Antibacterial activity of 7 species of medicinal plants on bacteria isolated from UTI patients in Golestan province. *Journal of Medicinal plants*. 2010; 9(34). [Link]
- [19] Nejati V, Khaneshi F. [Effect of hydro-alcoholic extract of plantago major leaf on serum level of insulin, glucose, and histology of pancreas and kidney in streptozotocin-induced diabetic rats (Persian)]. *Qom University of Medical Sciences Journal*. 2013; 7(5):14-20. [Link]
- [20] Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012; 36(4):815-36. [DOI:10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x] [PMID]
- [21] Roesch M, Perreten V, Doherr MG, Schaeren W, Schällibaum M, Blum JW. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms. *Journal of Dairy Science*. 2006; 89(3):989-97. [DOI:10.3168/jds.S0022-0302(06)72164-6]
- [22] Bennett RW, Yeterian M, Smith W, Coles CM, Sassaman M, McClure FD. *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. *Journal of Food Science*. 1986; 51(5):1337-39. [DOI:10.1111/j.1365-2621.1986.tb13117.x]
- [23] Imani Fouladi AA, Choupani A, Fallah Mehrabadi J. [Study of prevalence of Enterotoxin type B gene in *Meticillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from wound (Persian)]. *Kowsar Medical Journal*. 2011; 16(1):21-5. [Link]
- [24] Charlebois ED, Perdreau-Remington F, Kreiswirth B, Bangsberg DR, Ciccarone D, Diep BA, et al. Erratum: Origins of community strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Disease*. 2004; 39(1):47-54. [PMID]
- [25] Kannan RRR, Arumugam R, Ramya D, Manivannan, Anantharaman P. Green synthesis of silver nanoparticles using marine macroalgae *Chaetomorpha linum*. *Applied Nanoscience*. 2013; 3:229-33. [DOI:10.1007/s13204-012-0125-5]
- [26] Houshmand B, Mortazavi H, Alikhani Y, Abdolsamadi H, Ahmadi-Motemayel F, Zare-Mahmoudabadi R. [In vitro evaluation of antibacterial effect of myrtus extract with different concentrations on some oral bacteria (Persian)]. *Journal of Mashhad Dental School*. 2011; 35(2):123-30. [DOI:10.22038/JMDS.2011.970]
- [27] Kermanshah H, Hashemi Kamangar S, Arami S, Mirsalehian A, Kamalinejad M, Karimi M et al. [Comparison of antibacterial effect of hydroalcoholic extract of four plants against cariogenic microorganisms by two in vitro Methods (Persian)]. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2011; 13(6):21-9. [Link]
- [28] Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi AA. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of *Enterobacteria*: A novel biological approach. *Process Biochemistry*. 2007; 42(5):919-23. [DOI:10.1016/j.procbio.2007.02.005]

- [29] Mahmoudi R, Ehsani PA, Tajik H, Akhoundzadeh BA, Khosroshahi A. [Antimicrobial effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and *Lactobacillus casei* against *Staphylococcus aureus* in Iranian white cheese (Persian)]. *Journal of Food Research*. 2010; 3(1):147-61. [\[Link\]](#)
- [30] Ghodrat IZ, Divsalar A, Ayrian S, Saeidifar M. [Evaluation of the anticancer effects of Samarium nanoparticles synthesized by extract of ginger on HCT116 colorectal cancer cells (Persian)]. *Journal of Cell & Tissue*. 2020; 10(4):202-13. [\[Link\]](#)
- [31] Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: A practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*. 2016; 8(4):409-27. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [32] Singh LP, Bhattacharyya SK, Kumar R, Mishra G, Sharma U, Singh G, et al. Sol-Gel processing of silica nanoparticles and their applications. *Advances in Colloid and interface Science*. 2014; 214:17-37. [\[PMID\]](#)
- [33] Esmaili F, Koohestani H, Abdollah-Pour H. Characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles green synthesized using *Ziziphora clinopodioides* extract. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 2020; 14:100303. [\[DOI:10.1016/j.enmm.2020.100303\]](#)
- [34] Kavooosi S, Yaghoobi H. [Synthesis of silver nanoparticles using green method of plant extract european marjoram (*origanum majorana*) and their antibacterial effects (Persian)]. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 2017; 30(2):161-73. [\[Link\]](#)
- [35] Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*. 2013; 31(2):346-56. [\[PMID\]](#)
- [36] Sivaraman SK, Elango I, Kumar S, Santhanam V. A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds. *Current Science (00113891)*. 2009; 97(7):1055-9. [\[Link\]](#)
- [37] Sathyavathi R, Krishna MB, Rao SV, Saritha R, Rao DN. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Coriandrum sativum* leaf extract and their application in nonlinear optic. *Advanced science letters*. 2010; 3(2):138-43. [\[DOI:10.1166/asl.2010.1099\]](#)
- [38] Nikbakht MR, Soleimani Z, Moravveji SA, Esalatmanesh K. [Evaluating the effectiveness of *Pistacia atlantica* in the improvement of diabetic foot (Persian)]. *Feyz*. 2016; 20(4):347-51. [\[Link\]](#)
- [39] Talpur AD. *Mentha piperita* (Peppermint) as feed additive enhanced growth performance, survival, immune response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*. 2014; 420-421:71-8. [\[DOI:10.1016/j.aquaculture.2013.10.039\]](#)
- [40] Douglas JA, Douglas MH, Lauren DR, Martin RJ, Deo B, Follett JM, et al. Effect of plant density and depth of harvest on the production and quality of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) root harvested over 3 years. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 2004; 32(4):363-73. [\[DOI:10.1080/01140671.2004.9514317\]](#)
- [41] Jegadeeswaran P, Shivaraj R, Venkatesh R. Green synthesis of silver nanoparticles from extract of *Padina tetrastrum* leaf. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2012; 7(3):991-8. [\[Link\]](#)
- [42] Reddy GR, Gandhi NN. Environmental friendly biosynthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles by using *Senna Saima* plant leaf aqueous extract. *Int J lins Pharm Life Sci*. 2012; 2(1):186-93. [\[Link\]](#)
- [43] Zeng Q, Jiang X, Yu A, Lu GM. Growth mechanisms of silver nanoparticles: A molecular dynamics study. *Nanotechnology*. 2007; 18(3):035708. [\[PMID\]](#)
- [44] Ragheb G, Najmaddin N, Aleemardani M. [The effect of synthesis parameters on the particle size, particle size distribution and hydrodynamic diameter of silica nanoparticles via modified Stöber method (Persian)]. *Nanomaterials*. 2018; 10(34):117-28. [\[Link\]](#)
- [45] Razmi A, Nikkhah M, Bagheri A, Malekzadeh Shafaroudi S, Shams bakhsh M. [Green synthesis of spherical gold nano particle by Water cress (Persian)]. *Modares Journal of Biotechnology*. 2017; 8(1):60-70. [\[Link\]](#)
- [46] Moadi T, Ghahremanzadeh R, Yosefi M, Mohammadi F. [Synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) via four kinds of plants extract and investigation of antimicrobial activity of these nanoparticles (Persian)]. *Nashrieh Shimi va Mohandesi Shimi Iran*. 2014; 33(4):1-9. [\[Link\]](#)
- [47] Jansen WT, van der Bruggen JT, Verhoef J, Fluit AC. Bacterial resistance: A sensitive issue complexity of the challenge and containment strategy in Europe. *Drug Resistance Updates*. 2006; 9(3):123-33. [\[PMID\]](#)
- [48] Moghtader M, Salari H, Mozafari H, Farahmand A. [Evaluation the qualitative and quantitative essential oil of *Calendula officinalis* and its antibacterial effects (Persian)]. *Journal of Molecular and Cellular Research*. 2016; 29(3):331-9. [\[Link\]](#)
- [49] Panahi M, Barzegar H, Hojjati M. [Effect of *pistacia atlantica* gum oil on antimicrobial and antioxidant properties of edible starch film (Persian)]. *Innovative Food Technologies*. 2017; 5(1):77-89. [\[DOI:10.22104/jift.2017.462\]](#)
- [50] Alizadeh V, Barzegar H, Nasehi B, Samavati V. [Characterization of physical and antimicrobial properties of chitosan edible films containing *pistacia atlantica* gum essence (Persian)]. *Iranian Food Science and Technology Research*. 2017; 13(4):584 -93. [\[Link\]](#)
- [51] Hoseiny SM, Arabestani MR, Mahmoodi H, Farhangara E. [Prevalence of G, H, I, J Enterotoxin Genes and Antibacterial Susceptibility Pattern in *Staphylococcus aureus* strains Isolated from Different Foods (Persian)]. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2015; 25(123):1-10. [\[Link\]](#)
- [52] Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. [The antimicrobial effect and interaction of aqueous and ethanolic extracts of *Plantago major* on *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro (Persian)]. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*. 2017; 21(75):1-8. [\[Link\]](#)