



# سنتز زیستی نانوذرات نقره با استفاده از بذر در حال جوانه زنی تحت تیمار سرمایی گیاهان *Trifolium resupinatum* و *Trigonella foenum-graecum* بررسی خاصیت ضد میکروبی آنها

مریم قنادنیا<sup>\*</sup>، سیده جمیله موسوی<sup>۲</sup>

۱- گروه مهندسی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی، قزوین، ایران  
۲- گروه مهندسی علوم باغبانی (فضای سبز)، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی، قزوین، ایران

**چکیده:** سنتز زیستی نانوذرات در سال های اخیر به دلیل زیست سازگاری بیشتر و عدم آلودگی محیط زیست نسبت به سایر روش ها توجه بسیاری از محققین را جلب نموده است. وجود پوششی از مولکول های زیستی بر این نانوذرات امکان کارایی و سازگاری بیشتر آنها در علوم پزشکی، داروسازی و صنایعی مانند نساجی و تهیه مواد بهداشتی و آرایشی را بیشتر می کند. در این پژوهش نانوذرات نقره (Ag NPs) با عصاره ترشخی حاصل از جوانه زنی بذور گیاهان شنبليله و شبدر تیمار شده با سرما بیوسنتز و خاصیت ضد میکروبی آنها برای نخستین بار بررسی شد. برای تأیید تشکیل نانوذرات و بررسی ویژگی های آنها از دستگاه های طیف سنجی UV-Vis، XRD، FESEM و DLS استفاده شد. گروه های عاملی موثر در فرآیند، توسط FTIR تشخیص داده شده و جهت بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات بیوسنتزی از روش انتشار دیسک استفاده شد. نتایج مشخص کرد که تیمار سرمایی، نانوذرات کوچکتر و چند وجهی با ویژگی ضد میکروبی بیشتری تولید می کند. میانگین قطر نانوذرات بیوسنتز شده توسط عصاره ی بذر تیمار شده با سرمای شبدر از همه کوچکتر (۹/۲۵ nm) و ویژگی ضدباکتریایی آن با قطر مهار کنندگی ۱۰/۸۳ mm از همه بیشتر بود.

**واژگان کلیدی:** سنتز زیستی، نانوذرات نقره، جوانه زنی بذر، تیمار سرمایی، خاصیت ضد میکروبی.

\* [ghannadnia@eng.ikiu.ac.ir](mailto:ghannadnia@eng.ikiu.ac.ir)

آلودگی محیط زیست می شوند [۲]. در این روش از مواد بی خطر برای محیط زیست مانند عصاره های گیاهی [۳]، باکتری ها [۴]، قارچ ها [۵] و آنزیم ها [۶] جهت بیوسنتز نانوذرات استفاده می شود. اگرچه مکانیسم دقیق بیوسنتز نانوذرات در روش های زیستی به خوبی شناخته نشده است، اما بسیاری از پژوهش های اخیر نشان دهنده اهمیت ترکیبات فعال زیستی در موجودات زنده و

## ۱- مقدمه

بیونانوفناوری شاخه ای جدید از علم نانوفناوری است که با استفاده از سیستم های زیستی، ذراتی در ابعاد نانو تولید می کند. روش عمده و رایج جهت تولید نانومواد، استفاده از روش های فیزیکی و شیمیایی [۱] است که روش هایی بسیار پرهزینه بوده و سبب

Microplate reader، پراش پرتوی ایکس (Philips-pw1730) (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (Hitachi S-4160) (FESEM) و طیفسنجی فروسرخ (FTIR) (Bruker tensor27 spectrophotometer) و دستگاه پراش نور پویا (DLS), (Malvern-Zetasizer (Nno-z 590) استفاده شد.

## ۲-۲- تهیه عصاره ترشحاتی از بذرها گیاهی

هرکدام از بذرها پس از پاک سازی با نسبت ۸ گرم در ۱۰۰ سی سی آب مقطر به مدت ۱۴ ساعت در دو تیمار دمایی (الف) آزمایشگاه ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ )، تحت عنوان شاهد و ب) یخچال ( $2^\circ\text{C}$ )  $\pm 10$ )، تحت عنوان تیمار خیسانده شدند. سپس، عصاره‌های حاصل با کاغذ صافی از بذرها جداسازی شدند.

## ۲-۳- بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره‌ی بذرها

هرکدام از عصاره‌های متفاوت به شکل جداگانه با محلول نیترات نقره‌ی یک میلی مولار به نسبت مساوی مخلوط و pH آن‌ها در سه محدوده‌ی ۲، ۷ و ۹/۵ با محلول‌های اسیدنیتریک و یا محلول آمونیاک تنظیم شد.

## ۲-۴- بررسی تغییر رنگ محلول‌های حاصل از بیوسنتز نانوذرات نقره

پس از تنظیم pH‌های متفاوت برای مخلوط عصاره‌ی بذر و محلول نیترات نقره‌ی ۱ میلی مولار، تغییر رنگ‌هایی در محلول‌ها در زمان‌های متفاوت ایجاد شد که نشانه‌ای از تشکیل نانوذرات نقره بود.

## ۲-۵- اندازه‌گیری مقدار جذب نوری طیفسنجی نانوذرات بیوسنتز شده

از هر یک از محلول‌های بیوسنتز شده نانوذرات نقره نمونه برداری شده و با دستگاه Microplate reader در طول موج‌های ۳۰۰ الی ۷۰۰ نانومتر در زمان‌های متفاوت ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه پس از آغاز واکنش، مقدار جذب اندازه‌گیری شده و منحنی‌های جذب با

به‌ویژه در گیاهان ترکیباتی مانند انواع فنل‌ها، پروتئین‌ها، فلاونوئیدها، تریپن‌ها در این مکانیسم بوده است. نانوذرات زیستی دارای پوششی از ترکیبات زیستی بر روی خود هستند که در بیوسنتز و ثبات آن‌ها نقش داشته [۷، ۸] و هم به دلیل زیست سازگاری بیشتر نسبت به انواع فیزیکی و شیمیایی در پزشکی، داروسازی، مواد آرایشی - بهداشتی کاربرد بیشتری یافته‌اند [۹]. در میان نانوذرات فلزی، نانوذرات نقره به دلیل ویژگی‌های خاص و استفاده از آن‌ها در صنایع داروسازی، کشاورزی، سمیت زدایی از آب، فیلتر هوا، منسوجات صنعتی و همچنین، کاتالیست در واکنش‌های اکسیداسیونی، مورد توجه خاصی قرار گرفته است [۱۰-۱۳]. اگرچه مطالعات زیادی در رابطه با بیوسنتز خارج سلولی نانوذرات نقره توسط گیاهان انجام شده [۱۴، ۱۵] اما پژوهشات بسیار کمی در این رابطه با استفاده از ترشحات گیاهان زنده انجام شده است [۱۶، ۱۷]. در ادامه، پژوهش پیشین ما در رابطه با بیوسنتز نانوذرات نقره توسط گیاهان تحت تیمار با عوامل متفاوت [۱۸] و براساس بررسی‌های انجام شده، در رابطه با بیوسنتز نانوذرات نقره با ترشحات بذرها تیمار شده در گیاهان گزارشی منتشر نشده است. هدف از این پژوهش، بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از بذر گیاه شنبلیله *Trigonella foenum-graecum* و شبدر *Trifolium resupinatum* از خانواده پروانه‌واران (Papilionaceae) تحت تأثیر تیمار سرمایی و اسیدیته‌ی محیط بوده است. ویژگی‌های نانوذرات بیوسنتز شده با دستگاه‌های متفاوت و خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها توسط روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد و تجهیزات

بذر گیاهان شنبلیله و شبدر در شهر قزوین خریداری شدند. مواد مورد نیاز شامل نیترات نقره، اسیدنیتریک، محلول آمونیاک و محیط کشت LB (Luria Broth) تولیدی شرکت مرک استفاده شدند.

باکتری‌های (*Escherichia coli* (PTCC: 1276) و (*Bacillus Subtilis* (PTCC: 1156) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. برای تعیین مشخصات و ویژگی‌های نانوذرات تولید شده از دستگاه‌های (Biotek آمریکا)

استفاده از نرم افزار Excel رسم شد تا مقدار جذب محلول مشخص و سنتز نانوذرات تأیید شود.

## ۶-۲- تعیین گروه‌های عاملی احتمالی مؤثر در بیوسنتز و ثبات نانوذرات نقره‌ی بیوسنتز شده

عصاره‌ی ترش‌خی هر تیمار به شکل عصاره‌ی خالص حاصل از بذر و محلول بیوسنتز شده‌ی نانوذرات نقره، در دمای آزمایشگاه خشک و پودر حاصل جمع‌آوری شد. پودرهای حاصل به نسبت ۱ به ۱۰۰ با پتاسیم برماید مخلوط شده و قرص‌های حاصل از آن‌ها با دستگاه FTIR مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه‌ی ترکیبات موجود در عصاره‌ی خالص حاصل از بذر و عصاره‌ی بیوسنتزی آن، نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شدند.

## ۷-۲- تعیین ماهیت نانوذرات نقره‌ی بیوسنتز شده با دستگاه XRD

از پودرهای نانوذرات بیوسنتز شده، با استفاده از دستگاه XRD برای تشخیص نانوذرات نقره استفاده شد. نمودارها توسط نرم‌افزار XPert HighScore رسم شدند.

## ۸-۲- بررسی شکل و اندازه‌ی نانوذرات بیوسنتز شده‌ی نقره با دستگاه FESEM

به این منظور، لایه‌ای نازک از نانوذرات نقره‌ی بیوسنتز شده روی صفحه‌ی مخصوص خشک و با طلا پوشش‌دار شده و در خلأ قرار گرفت. پس از آماده‌سازی، نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی FESEM مشاهده و شکل و اندازه‌ی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

## ۹-۲- بررسی میانگین اندازه نانوذرات نقره بیوسنتزی با روش پراش نور پویا (DLS)<sup>۱</sup>

میانگین اندازه قطر نانو ذرات نقره بیوسنتزی برای هر تیمار به شکل جداگانه با روش پراش نور پویا اندازه گیری شد.

## ۱۰-۲- آزمون ضد میکروبی نانوذرات نقره‌ی بیوسنتز شده

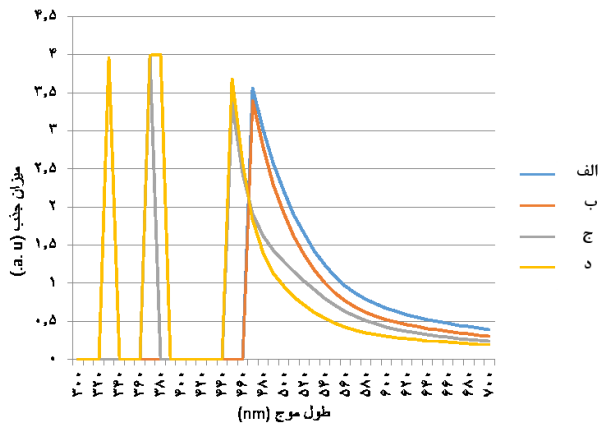
ابتدا باکتری‌های *E. coli* و *B. Subtilis* به شکل جداگانه بر روی محیط کشت جامد LB کشت و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. از تک کلون‌های حاصل شده در محیط کشت مایع LB با شرایط ذکر شده بر روی اینکوباتور شیکر، محلول‌های مایع میکروبی به دست آمد. ۰/۳ سی سی از محیط کشت باکتری‌های مایع بر پتری دیش‌های حاوی محیط کشت جامد LB پخش شده و پس از استقرار یکسان، دیسک‌های کاغذی آغشته به محلول نانوذرات نقره در تیمارهای متفاوت، آب مقطر استریل و محلول نیترات نقره (شاهد) با فاصله بر روی محیط‌های کشت قرارداد شدند. ظروف باکتری در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۳ ساعت نگهداری شده و مشاهدات ثبت شدند.

## ۳- نتایج و بحث

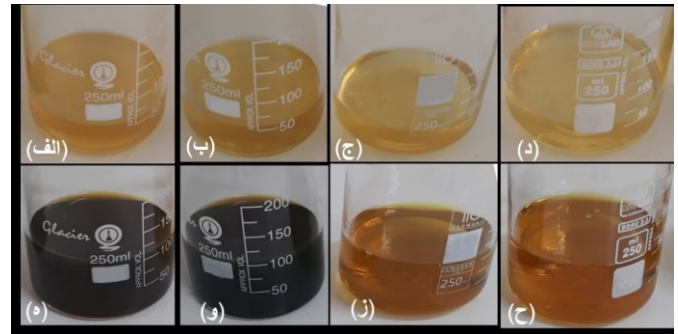
روش‌های متعدد شیمیایی و زیستی جهت سنتز نانوذرات نقره مورد استفاده قرار گرفته که اخیراً استفاده از گیاهان جهت این موضوع توجه بیشتر پژوهشگران را جلب کرده است [۲۰-۱۹] که سنتز نانوذرات نقره توسط عصاره گیاه آلوورا پس از ۲۴ ساعت [۲۱] و همچنین، سنتز نانوذرات نقره توسط عصاره برگ گیاه *Acalypha indica* با سرعت زیاد و پس از ۳۰ دقیقه از آن جمله است [۲۲] در این پژوهش نیز تغییر رنگ در اغلب نمونه‌های بیوسنتزی پس از ۲۰ دقیقه مشاهده شد ولی در اسیدیتی‌ی معادل ۷ بیشترین تغییر رنگ قابل مشاهده بود. محلول زرد و شفاف عصاره‌ی خالص بذرها پس از بیوسنتز، در شبدر به رنگ قرمز ارغوانی و در شنبلیله به رنگ زرد نارنجی تغییر پیدا کرد. به شکل کلی، رنگ عصاره‌ها (خالص و بیوسنتز شده) در دمای آزمایشگاه نسبت به دمای یخچال از شدت بیشتری برخوردار بود که در واقع جذب آب بیشتر و مقدار ترشحات بیشتر بذر در دمای معمولی را نشان داد (شکل ۱). تغییر رنگ محلول بیوسنتز شده نسبت به عصاره‌ی خالص، به علت تحریک رزونانس پلاسمون سطحی (SPR)<sup>۲</sup> است [۲۲] که نقش مهمی در تأیید تشکیل نانوذرات دارد [۲۳]. اثبات بیوسنتز نانوذرات در مراحل اولیه با استفاده از تغییر رنگ، روشی ساده است که اکثر پژوهشگران از آن استفاده می‌کنند [۲۴-۲۵].

<sup>2</sup> Surface plasmon resonance

<sup>1</sup> Dynamic light scattering



شکل ۲- مقایسه‌ی نمودارهای جذب اسپکتروفوتومتری نانوذرات بیوسنتز شده ۲۰ دقیقه پس از آغاز واکنش. الف) عصاره‌ی تیمار شبدر، ب) عصاره‌ی شاهد شبدر، ج) عصاره‌ی تیمار شنبلیله، د) عصاره‌ی شاهد شنبلیله.



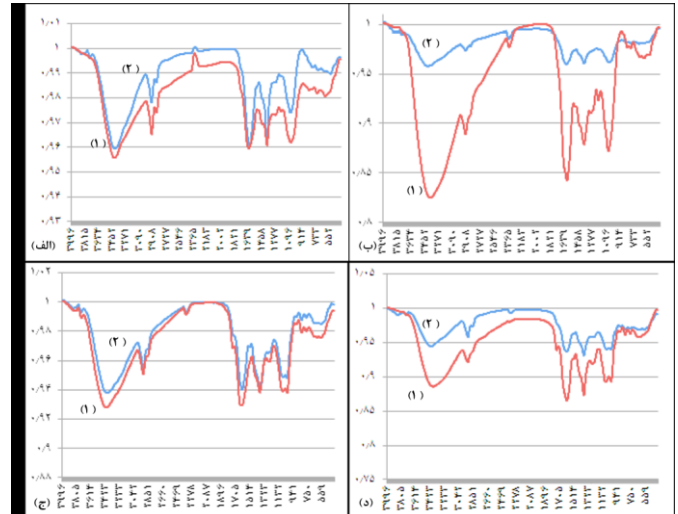
شکل ۳- تغییر رنگ عصاره‌ی بذرهای گیاهان شبدر و شنبلیله ۲۰ دقیقه پس از آغاز واکنش بیوسنتزی نانوذرات نقره. الف) عصاره‌ی شاهد شبدر، ب) عصاره‌ی تیمار شبدر، ج) عصاره‌ی شاهد شنبلیله، د) عصاره‌ی تیمار شنبلیله، ه) تغییر رنگ هر یک از عصاره‌های خالص پس از واکنش با نیترات نقره‌ی ۱ میلی مولار.

نتایج حاصل از آنالیز FTIR برای تشخیص گروه‌های شیمیایی احتمالی شرکت کننده در فرآیند، در شکل (۳) نشان داده شده است. تغییرات جزئی و جابه‌جایی در پیک‌های جذبی هر گروه عاملی در عصاره‌ی خالص بذر و عصاره‌ی نانوذرات بیوسنتزی آن، شرکت آن عامل شیمیایی در بیوسنتز و پایداری نانوذرات نقره را نشان می‌دهد [۳۰]. وجود پنوارهای قوی در محدوده  $cm^{-1}$  ۳۶۵۰ - ۳۲۰۰ نشان‌دهنده‌ی گروه عاملی OH است که در فنل‌ها و الکل‌ها وجود دارد [۳۱]. نوارهایی در محدوده  $cm^{-1}$  ۳۰۰۰ - ۲۸۰۰ نشانه‌ی وجود آلکان‌ها در ترکیبات لیپیدی است [۳۲]. وجود نوارهایی هرچند کوچک در گستره‌ی  $cm^{-1}$  ۲۵۰۰ - ۲۰۰۰ نشان‌دهنده‌ی گروه‌های شیمیایی  $C\equiv N$  و  $C\equiv C$  است که می‌توانند در ترکیبات سیانیدی و نیتریلی وجود داشته باشند. وجود نوار در گستره‌های  $cm^{-1}$  ۱۷۰۰ - ۱۵۰۰ می‌تواند نشانه‌ی وجود گروه  $COO^-$  باشد. وجود نوار در محدوده‌ی  $cm^{-1}$  ۸۰۰ - ۶۰۰ می‌تواند نشان‌دهنده‌ی گروه شیمیایی  $CH=$  در ترکیبات ترپنی است [۳۳].

نتایج حاصل از بررسی‌های طیف‌سنجی، حداکثر شدت جذب را در طول موج‌های ۴۴۰-۴۸۰ nm نشان داد (شکل ۲) که تأیید کننده‌ی وجود نانوذرات نقره است زیرا در این محدوده تشدید پلاسمون سطحی نانوذرات نقره انجام می‌شود که در پژوهش‌های مربوط به گیاهان *Leptadenia reticulata*, *Allium cepa* و *Murraya koenigii* مشاهده شده است [۲۶-۲۸]. الگوی SPR ویژگی‌های نانوذرات فلزی به اندازه ذرات، مولکول‌های تثبیت کننده یا ذرات جذب سطحی شده و ثبات الکتریکی محیط ارتباط دارد. وجود یک باند در مراحل اولیه سنتز نشان دهنده نانوذرات کروی شکل بوده و با ادامه زمان بیوسنتز ممکن است چندین باند SPR تشکیل شود که نشان دهنده شکل‌های متفاوت از ذرات است [۲۲]. عامل زمان نیز در بیوسنتز و ثبات نانوذرات موثر بوده و پس از تکمیل فرایند، نانوذرات بیشتری سنتز نخواهند شد. مقدار جذب با طیف‌سنجی پس از ۲۰ دقیقه افزایش قابل توجهی نشان نداده و ثبات نانوذرات بیوسنتزی پس از آن را تأیید کرد [۲۹].

*Letadenia purpurea* [۳۷]، *Erythrina indica* [۳۶] و *reticulata* [۲۶] به دست آمده مطابقت نشان داد.

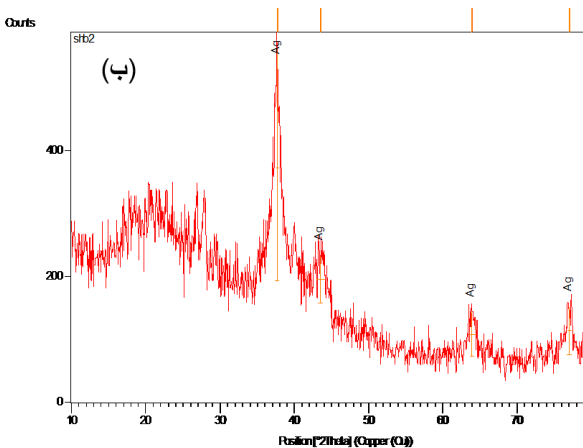
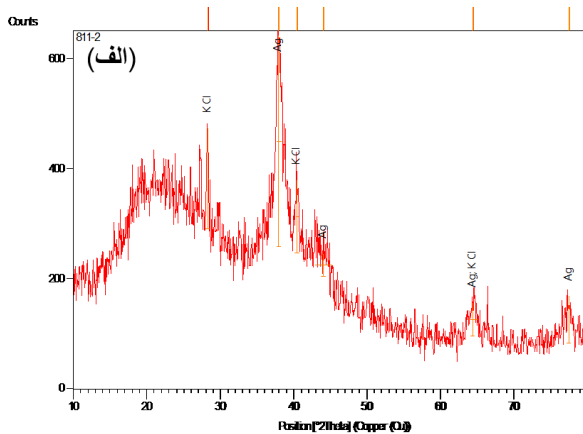
نتایج پراش پرتوی X در شکل ۴ نشان داده شده است. طیف XRD مربوط به نمونه‌ها نشان دهنده حضور کریستال‌های نانوذرات نقره سنتز شده به کمک عصاره ترش‌چی از بذور است. نانوذرات نقره پروفایل پراشی مشابه داشته و پیک‌های XRD در  $2\theta$  تقریباً برابر با  $37/8^\circ$ ،  $44/8^\circ$  و  $76/9^\circ$  قابل تشخیص بوده و صفحه‌ی کریستالوگرافی  $311$  -  $200$  -  $111$  کریستالی مکعبی شکل را به ترتیب مشخص می‌کند. این نتایج ساختار کریستالی نانوذرات نقره‌ی بیوسنتز شده را تأیید کرد که با نتایج حاصل از گیاه مریم‌گلی مطابقت نشان داد [۱۱].



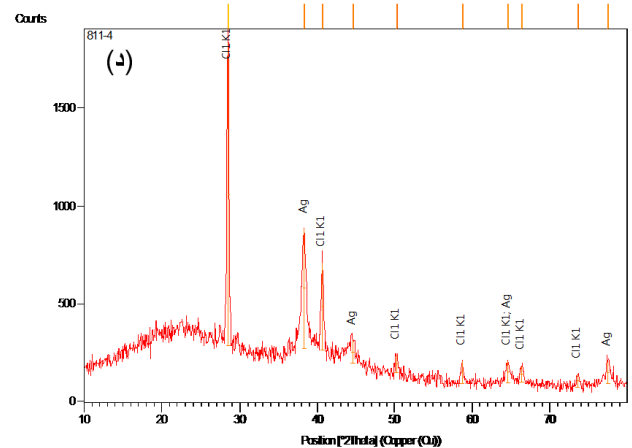
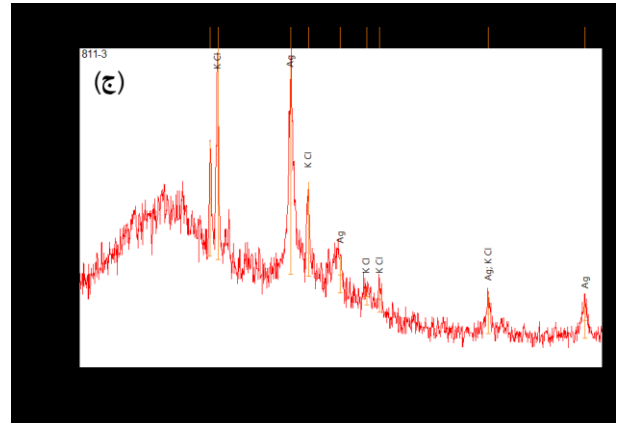
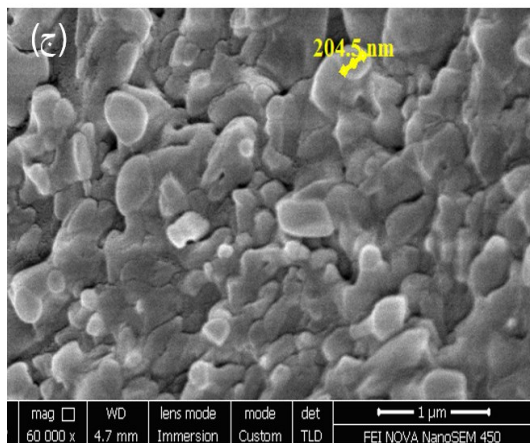
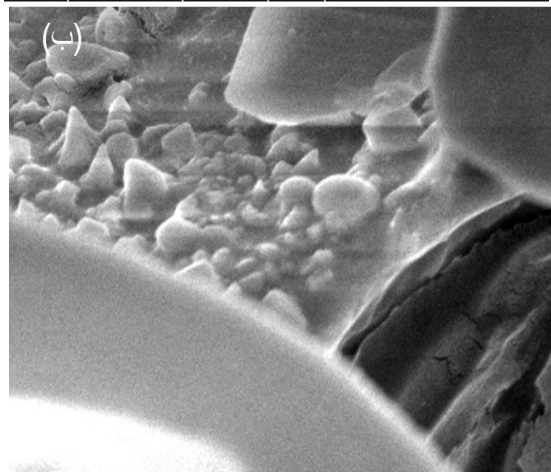
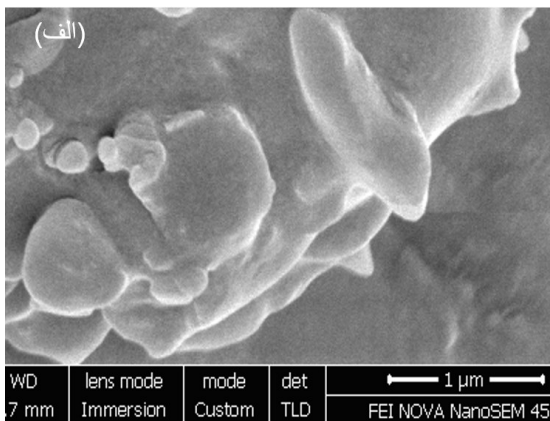
شکل ۳- مقایسه‌ی پیک‌ها در نمودارهای FTIR. عصاره‌ی شاهد شبدرد، (ب) عصاره‌ی تیمار شبدرد، (ج) عصاره‌ی شاهد شنبلیله، (د) عصاره‌ی تیمار شنبلیله، (۱): عصاره‌ی خالص، (۲): عصاره‌ی بیوسنتزی نانوذرات نقره؛ محور افقی نمودارها طول موج ( $\text{cm}^{-1}$ ) و محور عمودی درصد عبور نور را نشان می‌دهد.

ریشه‌ی گیاهان ترکیباتی را به محیط ریشه ترشح می‌کنند که این موضوع در گیاهان خانواده‌ی پروانه‌واران به دلیل هم‌زیستی باکتریایی به شکل ویژه‌تر قابل مشاهده است. از جمله این ترکیبات می‌توان به اسیدهای آمینه و آمیدهای محلول، قندهای احیا کننده اشاره کرد. ریشه‌ها جهت جذب بهتر آهن ترکیبات اسیدی مانند کافتیک اسید و پروتون ( $\text{H}^+$ ) به محیط آزاد کرده و با اسیدی شدن محیط، احیاء  $\text{Fe}^{3+}$  به  $\text{Fe}^{2+}$  را تسهیل کرده و در جذب آن نقش مهمی دارند [۳۴]. ترکیبات فنلی، متابولیت‌های ثانویه، ترکیبات فرار مانند ترپنوئیدها نیز از ریشه‌ها ترشح شده و ترکیباتی با وزن مولکولی زیاد مانند ترکیبات موسیلاژی که به ویژه از انتهای ریشه ترشح می‌شوند و پروتئین‌هایی مانند لکتین‌ها نیز از ریشه‌ی گیاهان ترشح می‌شوند [۳۵]. بر اساس نتایج این پژوهش، این ترکیبات می‌توانند نقش مهمی را در احیای یون‌های فلزی، سنتز نانوذرات فلزی و تثبیت آن‌ها داشته باشند.

نتایج پژوهش‌های بالا، در تأیید نتایج حاصل از آنالیز FTIR در این پژوهش است. وجود گروه‌های عاملی مانند  $\text{OH}^-$  و  $\text{COO}^-$  که می‌توانند از ترکیبات ترش‌چی ریشه مانند فنل و پروتئین‌ها آزاد شوند، نقش مهمی را در احیای نانوذرات فلزی و تثبیت آن‌ها دارند [۳۶]. نتایج حاصل از FTIR در این پژوهش، با نتایجی که در رابطه با عصاره بخش‌های متفاوت گیاهانی مانند *Tephrosia*

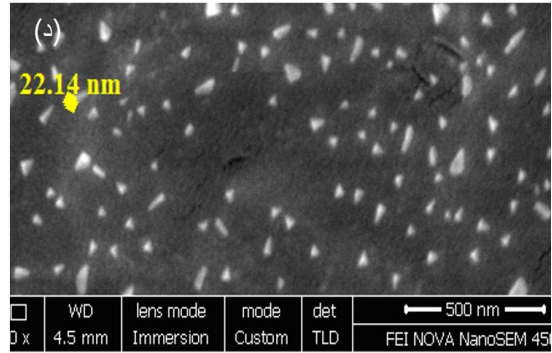
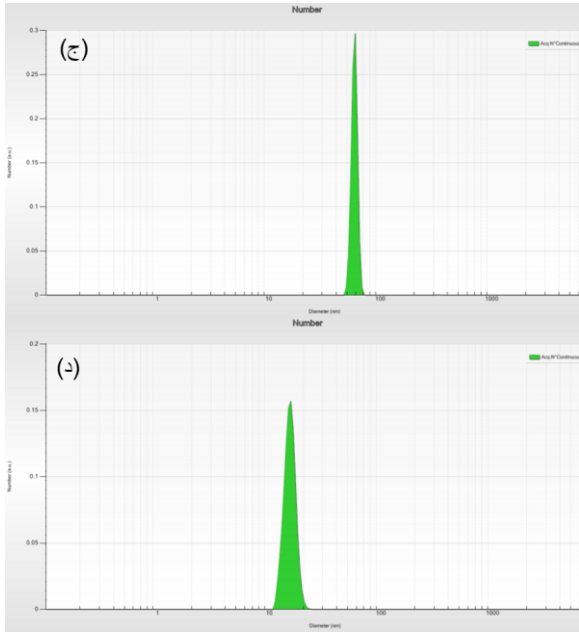


نقره بیوستنز شده با عصاره‌ی تیمار شیدر از همه کمتر (۹/۲۵ نانومتر) و عصاره‌ی شاهد شنبلیله از همه بیشتر (۵۸/۲۲ نانومتر) بود. میانگین قطر نانوذرات نقره بیوستنز شده با عصاره‌ی شاهد شیدر ۱۲/۳۱ نانومتر و برای عصاره‌ی تیمار شنبلیله ۱۵/۲ نانومتر بود.



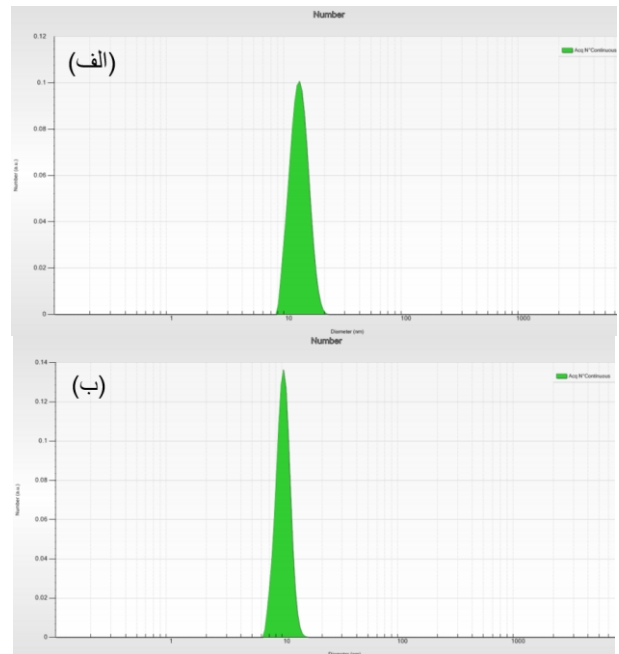
شکل ۴- آنالیز XRD نانوذرات نقره‌ی بیوستنز شده، (الف) عصاره‌ی شاهد شیدر، (ب) عصاره‌ی تیمار شیدر، (ج) عصاره‌ی شاهد شنبلیله، (د) عصاره‌ی تیمار شنبلیله.

بسیاری از پژوهش‌های انجام شده تاکنون بیوستنز نانوذرات نقره با شکل و اندازه‌های متفاوت را نشان داده است که می‌توان به پژوهش‌های انجام شده در این رابطه با استفاده از گیاه مریم گلی [۱۱]، *Andrographis paniculata* [۹]، *Cinnamon zeylanicum* [۱۰] و بادرنجبویه [۱۸] اشاره کرد. ریخت‌شناسی و اندازه تقریبی نانوذرات بیوستنزی حاصل از این پژوهش در تصاویر FESEM (شکل ۵) نشان داده شده است. نانوذرات بیوستنز شده با عصاره‌ی بذرهای شاهد بیشتر کروی و بیضوی شکل و دارای سطوح تیز کمتر بوده (شکل ۵- الف و ج)، در حالی که نانوذرات بیوستنزی با عصاره‌ی بذرهای تیمار شده بیشتر به شکل مثلثی و با سطوح تیز دیده شدند (شکل ۵- ب و د). مقایسه ابعاد نانوذرات با شاخص‌های موجود در هر تصویر FESEM مشخص کننده بیوستنز نانوذراتی با ابعاد کمتر از ۱۰۰ نانومتر در هر تیمار است. میانگین اندازه قطر نانوذرات نقره بیوستنز شده با DLS در شکل ۶ نشان داده شده است. میانگین قطر نانوذرات



شکل ۵- تصاویر FESEM از نانوذرات نقره‌ی بیوستتز شده. الف) عصاره‌ی شاهد شبدر، ب) عصاره‌ی تیمار شبدر، ج) عصاره‌ی شاهد شنبلیله، د) عصاره‌ی تیمار شنبلیله.

شکل ۶- میانگین قطر نانو ذرات بیوستتز شده توسط تیمارهای متفاوت. الف) عصاره‌ی شاهد شبدر، ب) عصاره‌ی تیمار شبدر، ج) عصاره‌ی شاهد شنبلیله، د) عصاره‌ی تیمار شنبلیله.



ویژگی ضدباکتریایی نانو ذرات بیوستتز شده توسط عصاره گیاهان زیادی مانند *Andographis paniculata* [۹]، *Cinnamon* [۱۰] و *zeylanicum* [۱۰] و زیتون [۱۴] گزارش شده است. نتایج این پژوهش نیز اثرات ضدباکتریایی نانو ذرات بیوستتز شده توسط عصاره ترش‌حی از بذور گیاهان شنبلیله و شبدر در حال جوانه زنی را نشان داد. نتایج میانگین اندازه‌ی قطر هاله‌ی مهارکنندگی (۳ تکرار) نانوذرات بیوستتز شده توسط عصاره‌ی بذرها در ۲ تیمار متفاوت دمایی (آزمایشگاه و یخچال)، در جدول ۱ نشان داده شده است. بیشترین خاصیت ضد میکروبی مربوط به نانوذرات نقره‌ی بیوستتز شده با عصاره‌ی بذر شبدر تیمار (۱۰/۸۳ mm) بر ضد باکتری *E. coli* بود که نتایج DLS میانگین قطر این نانوذرات را از همه کوچکتر نشان داده بود (۹/۲۵ nm). در درجه بعدی ویژگی ضدباکتریایی نانوذرات نقره بیوستتزی با عصاره‌ی تیمار شنبلیله با قطر هاله ۱۰/۷۶ mm بود که میانگین قطر نانوذرات بیوستتزی در این تیمار (۱۵/۲ nm) نیز کوچک تر از دو تیمار شاهد بود.

در مجموع، عصاره‌های با تیمار سرمایی، نانوذرات با ویژگی ضد میکروبی بیشتری تولید کرده بودند که ظاهراً با تیمار سرما، نوع عصاره‌ی بذرها، مثلی شکل بودن و ابعاد کوچکتر آنها نسبت

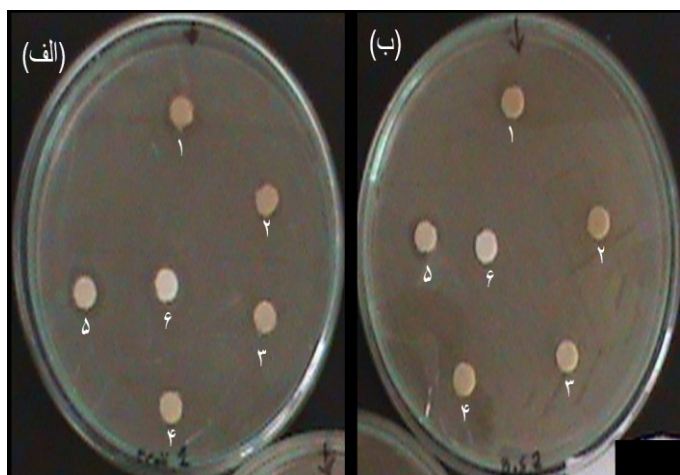
به عصاره‌های شاهد با احتمال نفوذ بیشتر آنها به باکتری‌ها مرتبط است.

جدول ۱ میانگین اندازه قطر هاله مهار کنندگی نانوذرات نقره بیوستنز شده (mm)

تیمار		شاهد						تیمار
شنبلیله		شیدر		شنبلیله		شیدر		نوع بذر
<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	۱ ۲ ۳
۶/۶۹	۱/۷۶ ۱۰	۹/۶	۱/۸۳ ۱۰	۶/۶۶	۱۰/۱۶	۹/۵۳	۱/۳۳ ۱۰	

باکتری *E. coli* (گرم منفی) در تمام تیمارها نسبت به *B. subtilis* (گرم مثبت) حساسیت بیشتری نشان داد (جدول ۱ و شکل ۷) که با پژوهش قبلی ما در رابطه با نانوذرات بیوستنز شده با عصاره‌ی برگ ریحان عدم تطابق نشان داد [۳۰]. خاصیت ضدباکتریایی بیشتر نانو ذرات نقره بر ضد باکتری *E. coli* در این پژوهش با نتایج پژوهش مشابه انجام شده در این رابطه مطابقت نشان داد. نتیجه آن پژوهش خاصیت بیشتر نانوذرات نقره را بر ضد باکتری *E. coli* نسبت به *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* نشان داد [۳۸]. اگرچه باکتری‌های گرم منفی به دلیل وجود لایه‌ی فسفولیپیدی، مقاومت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت با لایه‌ی پتیدوگلیکانی در مقابل ترکیبات دارویی دارند [۳۹]، این پژوهش بیوستنز نانوذرات نقره‌ای را امکان پذیر می‌کند که می‌تواند بر باکتری‌های مقاوم گرم منفی نیز تأثیر داشته باشند. مکانیسم‌های متفاوتی جهت خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره‌ی بیوستنزی ذکر شده که می‌توان به آزادسازی یون‌های نقره از نانوذرات و جذب الکترواستاتیکی آن‌ها به دیواره‌ی سلول باکتری که منجر به واسرشته سازی پروتئین و سرانجام تخریب سلول باکتری است، اشاره نمود [۳۷]. بین شکل نانوذرات نقره و خاصیت ضد باکتریایی آنها ارتباط وجود دارد [۳۸]. نتایج این پژوهش نشان داد که نانو ذرات مثلی شکل نسبت به انواع کروی خاصیت ضد میکروبی بیشتری دارند که با نتایج نانو ذرات سنتز شده از روش شیمیایی تفاوت نشان داد که احتمالاً ترکیبات زیستی موثر در بیوستنز و ثبات نانو ذرات به روش زیستی در این فرایند موثرند. با توجه به اینکه مکانیسم‌های ضدباکتریایی نانوذرات نقره پیچیده است، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آنها مانند اندازه، شکل و بار سطحی آنها می‌تواند بر این مکانیسم موثر باشد. نانوذرات

نقره می‌توانند نسبت به سطح خود یون‌های نقره را آزاد سازند. نتایج ما در رابطه با ویژگی ضدباکتریایی بیشتر نانوذرات مثلی شکل با پژوهش‌های پال و همکارانش در سال ۲۰۰۷ میلادی مطابقت نشان داد [۴۰].



شکل ۷- بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره‌ی بیوستنزی با استفاده از روش انتشار دیسک. الف) باکتری *E. coli*، ب) باکتری *B. subtilis*، (۱) نانوذرات بیوستنزی توسط عصاره‌ی شاهد شیدر، (۲) نانوذرات بیوستنزی توسط عصاره‌ی تیمار شیدر، (۳) نانوذرات بیوستنزی توسط عصاره‌ی شنبلیله شاهد، (۴) نانوذرات بیوستنزی با عصاره‌ی شنبلیله تیمار، (۵) یون نقره یک میلی مولار و (۶) آب مقطر استریل.

نتایج پژوهش‌های زیادی اثرات مثبت سرمادهی در جوانه‌زنی بذرها در گیاهان خانواده‌ی پروانه واران را نشان داده است [۴۱]. تیمارهای ملایم سرمایی در برخی دانه‌های گیاهی سبب شکستن خواب آن‌ها شده [۴۲] و به این ترتیب تعداد زیادی از دانه‌ها شروع به جوانه‌زنی و ترشح موادی می‌کنند که در بیوستنز و تثبیت نانوذرات می‌تواند مؤثر باشند. برخی از نتایج سایر پژوهشات وجود ترکیباتی مانند مشتقات ترکیبات قندی و پروتئینی را بر روی ریشه‌ی گیاهان خانواده‌ی پروانه‌واران جهت گره‌زایی اثبات نموده [۴۳] که احتمال شرکت آن‌ها در بیوستنز نانوذرات است. از جهت دیگر دمای کم به هنگام جوانه‌زنی دانه‌ها سبب کاهش استحکام غشاء سلولی سلول‌های ریشه‌چه شده و نشت الکترولیت‌ها را سبب می‌شود [۴۴]، که آنیون‌های نشت یافته می‌توانند در احیای یون‌های نقره نقش مهمی داشته باشند به شکلی که نتایج این پژوهش نیز بیوستنز نانوذرات با عصاره‌های تحت تأثیر تیمار سرمایی با سطوح متفاوت را نشان داد که اثر ضد میکروبی بهتری نشان دادند. پژوهش‌های جهت



supernatant of bacteria with microwave irradiation", *Journal of Chemistry*, 6, 61-70, 2009.

[5] K.C. Bhainsa, S. D'souza, "Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 47, 160-164, 2006.

[6] I. Willner, R. Baron, B. Willner, "Integrated nanoparticle-biomolecule systems for biosensing and bioelectronics", *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1841-1852, 2007.

[7] A. Vedpriya, "Living Systems: eco-friendly nanofactories", *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures*, 5, 9-21, 2010.

[8] C. Krishnaraj, P. Mathukumar, R. Ramachandran, M.D. Balakumar, P.T. Kalaichelvan, "*Acalypha indica* Linn: biogenic synthesis of silver and gold nanoparticles and their cytotoxic effects against MDA-MB-231, human breast cancer cells", *Biotechnology Reports*, 4, 42-49, 2014.

[9] P. Rajasekar, S. Priyadarshini, T. Rajarajeshwari, C. Shivashri, "Bio-inspired synthesis of silver nanoparticles using *Andrographis paniculata* whole plant extract and their antimicrobial activity over pathogenic microbes", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 3, 47-52, 2013.

[10] M. Sathishkumar, K. Sneha, S.W. Won, C.W. Cho, S. Kim, Y.S. Yun, "*Cinnamon zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73, 332-338, 2009.

[11] S. Pirtarighat, M. Ghannadnia, S. Baghshahi, "Green synthesis of silver nanoparticles using the

تکمیل نتایج در این رابطه در دست انجام بوده و نیاز به بررسی‌های بیشتری وجود دارد.

## ۴- نتیجه گیری

باتوجه به اهمیت روز افزون بیونانوذرات به دلیل ویژگی‌های خاص و مصارف آن‌ها در زمینه‌های متفاوت، پژوهش‌های تکمیلی برای شناخت مکانیسم‌های دقیق بیوسنتزی آن‌ها جهت مصرف در اهداف خاص، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. نتایج این پژوهش در ادامه‌ی پژوهش‌های پیشین ما نشان داد که به کار بردن تیمار سرمایی می‌تواند بر روند جوانه‌زنی بذر گیاهان و مواد ترشح شده از آن‌ها و به دنبال آن بر مکانیسم بیوسنتزی نانوذرات مؤثر باشد. این تیمار نانوذراتی با ابعاد کوچک تر و چند وجهی در مقایسه با تیمار دمایی معمولی تولید کرد که خاصیت ضد باکتریایی بیشتری نشان دادند. مطالعات و پژوهش‌های تکمیلی برای بیوسنتز نانوذرات با مورفولوژی و ویژگی‌های یکسان با تیمارهای خاص جهت کاربرد آن‌ها برای مصارف ضدباکتریایی در دست انجام است. اهمیت این گونه پژوهشات با توجه به مقاوم شدن باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و جایگزینی موادی به‌جای آن‌ها بیشتر مشخص می‌شود.

## مراجع

[1] A. Leela, M. Vivekanandan, "Tapping the unexploited plant resources for the synthesis of silver nanoparticles", *African Journal of Biotechnology*, 7, 3162-3165, 2008.

[2] T. Klaus-Joerger, R. Joerger, E. Olsson, C.G. Granqvist, "Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science", *Trends in Biotechnology*, 19, 15-20, 2001.

[3] S.M. Jain, P.K. Saxena, "Protocols for *in vitro* cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants". Humana Press, Springer, 350 p, 2009.

[4] N. Saifuddin, C. Wong, A. Yasumira, "Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture

under *in vitro* condition", *Nanomedicine Journal*, 4, 184-190, 2017.

[19] S. Li, Y. Shen, A. Xie, X. Yu, L. Qiu, L. Zhang, Q. Zhang, "Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L extract" *Green Chemistry*, 9, 852-858, 2007.

[20] J.Y. Song, B.S. Kim, "Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts", *Bioprocess and biosystems engineering*, 32, 79-84, 2009.

[21] S.P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry, "Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using *Aloe vera* Plant Extract", *Biotechnology Progress*, 22, 577-583, 2006.

[22] C. Krishnaraj, E.G. Jagan, S. Rajasekar, P. Selvakumar, P.T. Kalaichelvan, N. Mohan, "Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76, 50-56, 2010.

[23] S. Rajeshkumar, C. Kannan, G. Annadurai, "Synthesis and characterization of antimicrobial silver nanoparticles using marine brown seaweed *Padina tetrastromatica*". *Drug Invention Today*, 4, 511-513, 2012.

[24] S. Li, , Y. Shen, A. Xie, X. Yu, L. Qiu, L. Zhang, Q. Zhang, "Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annum* L. extract". *Green Chemistry*, 9, 852-858, 2007.

[25] S.P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, M. Sastry, "Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloevera* plant extract", *Biotechnology progress*, 22, 577-583, 2006.

plant extract of *Salvia spinosa* grown *in vitro* and their antibacterial activity assessment", *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 9, 1-9, 2019.

[12] L. Gan, Sh. Zhang, Y. Zhang, S. H. He, Y. Tian, "Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles by a halotolerant *Bacillus endophyticus* SCU-L", *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48, 582-588, 2018.

[13] R.R. Arvizo, S. Bhattacharya, R.A. Kudgus, K. Giri, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, "Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future", *Chemical Society Reviews*, 41, 2943-2970, 2012.

[14] M.M. Khalil, E.H. Ismail, K.Z. El-baghdady, D. Mohamed, "Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity". *Arabian Journal of Chemistry*, 7, 1131-1139, 2014.

[15] R. Geetha, T.H. Ashokumar, S. Tamilselvan, K. Govindaraju, M. Sadiq, G. Singaravelu, "Green synthesis of gold nanoparticles and their anticancer activity", *Cancer Nanotechnology*, 4, 91-96, 2013.

[16] D. Raju, N. Paneliya, U.J. Mehta, "Extracellular synthesis of silver nanoparticles using living peanut seedling", *Applied Nanoscience*, 4, 875-879, 2014.

[17] G.H. Rabie, H.S. Hegazy, L.D. Shaban, D.S. Raie, "Biosynthesis of nano-silver by cell free secretions from seeds of *Medicago sativa*", *American Journal of Life Sciences*, 3, 1-4, 2015.

[18] S. Pirtarighat, M. Ghannadnia, S. Baghshahi, "Antimicrobial effects of green synthesized silver nanoparticles using *Melissa officinalis* grown

- [33] J.F. Su, Z.H. Huang, X.Y. Yuan, X.Y. Wang, M. Li, "Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions", *Carbohydrate polymers*, 79, 145-153, 2010.
- [34] W.G. Hopkins, N.P.A. Huner, "Introduction to Plant Physiology", John Wiley & Sons, Inc. London, Ontario, 560 P. 2004.
- [35] D.V. Badri, J.M. Vivanco, "Regulation and function of root exudates", *Plant, Cell & Environment*, 32, 666-681, 2009.
- [36] P.R. Sre, M. Reka, R. Poovazhagi, M.A. Kumar, K. Murugesan, "Antibacterial and cytotoxic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using aqueous root extract of *Erythrina indica* Lam", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135, 1137-1144, 2015.
- [37] B. Ajitha, Y.A.K. Reddy, P.S. Reddy, "Biogenic nano-scale silver particles by *Tephrosia purpurea* leaf extract and their inborn antimicrobial activity", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 121, 164-172, 2014.
- [38] J.Y. Cheon, S.J. Kim, Y.H. Rhee, O.H. Kwon, W.H. Park, "Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles", *International Journal of Nanomedicine*, 14, 2773-2780, 2019.
- [39] S. Ravikumar, M. Gnanadesigan, P. Suganthi, A. Ramalakshmi, "Antibacterial potential of chosen mangrove plants against isolated urinary tract infectious bacterial pathogens", *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2, 94-99, 2010.
- [40] S. Pal, Y.K. Tak, J.M. Song, "Does the antibacterial activity of silver
- [26] M.K. Swamy, K.M. Sudipta, K. Jayanta, S. Balasubramanya, "The green synthesis, characterization, and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Leptadenia reticulata* leaf extract", *Applied Nanoscience*, 5, 73-81, 2015.
- [27] A. Saxena, R. Tripathi, R. Singh, "Biological synthesis of silver nanoparticles by using onion (*Allium cepa*) extract and their antibacterial activity", *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5, 427-432, 2010.
- [28] S.R. Bonde, D.P. Rathod, A.P. Ingle, R.B. Ade, A.K. Gade, M.K. Rai, "*Murraya koenigii* mediated synthesis of silver nanoparticles and its activity against three human pathogenic bacteria", *Nanoscience Methods*, 1, 25-36, 2012.
- [29] K. Praveenkumar, W. Paul, P.S.H. Chandra, "Green synthesis of gold nanoparticles with *Zingiber officinale* extracts characterization and blood compatibility", *Process Biochemistry*, 46, 2007-13, 2011.
- [30] S. Pirtarighat, M. Ghannadnia, S. Baghshahi, "Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum basilicum* cultured under controlled conditions for bactericidal application", *Materials Science and Engineering: C*, 98, 250-255, 2019.
- [31] P. Kumar, S.S. Selvi, M. Govindaraju, "Seaweed-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* for its antifungal activity against *Candida* spp", *Applied Nanoscience*, 3, 495-500, 2013.
- [32] M. Vanaja, G. Gnanajobitha, K. Paulkumar, "Phytosynthesis of silver nanoparticles by *Cissus quadrangularis*: Influence of physicochemical factors". *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3, 17-25, 2013.

nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*", *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1712–1720, 2007.

[41] M. Posmyk, K. Janas, "Effects of seed hydropriming in presence of exogenous proline on chilling injury limitation in *Vigna radiata* L. seedlings", *Acta Physiologiae Plantarum*, 29, 509-517, 2007.

[42] A. Bochenek, J. Golaszewski, A.I. Piotrowicz-cieslak, R.J. Gorecki, "The effects of temperature on the dormancy and germination of *Cirsium arvense* [L.] Scop. seeds", *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 78, 105-114, 2009.

[43] P. Nick, "Symbiotic secrets", *Protoplasma*, 256, 881-882, 2019.

[44] P. Biswas, A.R. East, E.W. Hewett, J.A. Heyes, "Increase in electrolyte leakage as a function of chilling stress and ripening of tomato", *Acta Horticulturae*, 8, 283-290, 2011.



# Biological synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using *Trifolium resupinatum* and *Trigonella foenum-graecum* seeds during germination stage under cold treatment

M. Ghannadnia<sup>1\*</sup>, S. J. Mousavi<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup> Department of Horticultural Sciences Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

<sup>2</sup> Department of Horticultural Sciences Engineering (Landscape), Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

**Abstract:** Biological synthesis of nanoparticles (NPs) has attracted recent attention of many researchers due to higher biocompatibility and eco-friendly properties compared to other methods. Possess the coating of biomolecules on the surface of these NPs makes them proper for application in different fields such as biomedical and pharmaceutical sciences and also textile and cosmetic industries. In this research, the biosynthesis of Ag NPs using *Trifolium resupinatum* and *Trigonella foenum-graecum* secreted extract during seed germination stage under cold treatment and its bactericidal properties has been reported for the first time. UV-vis spectrophotometry, XRD, FESEM and DLS were used to confirm the Ag NPs formation and characterization. FTIR results revealed the functional groups of the extracts responsible for the process and Disc diffusion method was used for antibacterial properties of the biosynthesized Ag NPs. The results showed that the cold treatment produced multidimensional Ag NPs with smaller size and higher antibacterial activities. The Ag NPs biosynthesized using cold treated seed extracts of *T. resupinatum* revealed the smallest size (9.25 nm) and the most antibacterial properties with a zone of inhibition about 10.83 nm.

**Keywords:** Biological synthesis, Silver nanoparticles, Seed germination, Cold treatment, Antimicrobial property.