

## بررسی خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از عصاره برگ زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) تحت تأثیر تنش شوری

ایمان رسایی<sup>۱</sup>، مریم قنادنیا<sup>۲\*</sup> و سعید باغشاهی<sup>۳</sup>

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه مهندسی علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

پست الکترونیک: ghannadnia@eng.ikiu.ac.ir

۳- استاد، گروه مهندسی مواد، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۸

تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۹

### چکیده

پیشرفت‌های اخیر در علوم زیست‌شناسی به دلیل پایه‌ای بودن آنها برای تعدادی از علوم مرتبط مانند کشاورزی، پزشکی، داروسازی، بیوتکنولوژی و حتی بیونانوتکنولوژی اهمیت ویژه‌ای یافته است. در این تحقیق تأثیر تیمارهای مختلف شوری (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) بر گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) و ویژگی‌های نانوذرات نقره (Ag NPs) بیوسنتز شده توسط عصاره این گیاه بررسی شد. تغییر رنگ محلول‌ها، وجود پیک در ناحیه ۴۵۰ nm اسپکتروفتومتری و نتایج حاصل از تفرق اشعه ایکس (XRD)، بیوسنتز نانوذرات نقره را تأیید کرد. تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM) بیشتر ذرات را کروی شکل نشان داد که اشکال زاویه‌دار نیز در تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار قابل مشاهده بودند. نتایج حاصل از دستگاه تبدیل طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR) عوامل شیمیایی مختلف مانند OH، CO، CH= و C=C را که در فرایند بیوسنتز شرکت کرده بودند نشان داد. غلظت ۵۰ میکرومولار از نمک بیشترین تأثیر را بر افزایش متابولیت‌های گیاهان داشت. کوچکترین نانوذرات (۲۵/۳nm) مربوط به تیمار شاهد (کروی شکل) بود. برخی نانوذرات بیوسنتز شده توسط غلظت ۱۵۰ میکرومولار با اندازه ۳۴/۲ nm، زاویه‌دار بوده و بیشترین خاصیت ضدباکتریایی را نشان دادند. نانوذرات نقره بیوسنتز شده، تأثیر منفی بیشتری بر باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت داشتند. بیشترین خاصیت ضدباکتریایی را نانوذرات بیوسنتز شده توسط غلظت ۱۵۰ میکرومولار نشان دادند. این نتایج در ادامه تحقیقات قبلی ما برای اولین بار تأثیر تیمارهای شوری را بر ویژگی‌های نانوذرات بیوسنتز شده توسط عصاره گیاه زوفا نشان داد. این نتایج می‌توانند زمینه جالب توجهی برای بیوسنتز نانوذرات نقره ایجاد کنند که بتوانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند.

واژه‌های کلیدی: زوفا (*Hyssopus officinalis* L.)، زیست‌شناسی، نانو ذرات نقره، NaCl.

## مقدمه

نقره عنصری با ویژگی ضدباکتریایی ( Sanchez-Lopez et al., 2020) تقریباً مؤثر بر روی همه موجودات زنده بوده (Abdel-Aziz et al., 2014) و در بهبود زخم‌ها نیز مؤثر است (Boisselier & Astruc, 2009). با توجه به ایجاد ویژگی‌های متفاوت و همچنین افزایش نسبت سطح به حجم، با کاهش اندازه هر چه بیشتر مواد (Biener et al., 2009)، امروزه انواع نانوذرات به روش‌های مختلف تولید شده و در انواع صنایع به شکل گسترده استفاده می‌شوند که روش‌های غیرزیستی آنها دارای مضراتی می‌باشند (Behera et al., 2012). یکی از جدیدترین روش‌های تولید نانو ذرات، روش بیونانوتکنولوژی است که روش تولید نانو ذرات با استفاده از موجودات زنده می‌باشد (Gilaki, 2010). این روش ساده‌تر، کم‌هزینه و سازگار با محیط‌زیست بوده و از سوی دیگر نانوذرات بیوسنتز شده آن سازگاری بیشتری با بدن موجودات زنده داشته و بیشتر می‌توانند در صنایع پزشکی، داروسازی و سایر علوم مربوطه کاربرد داشته باشند (Govindaraju et al., 2010). تحقیقات زیادی برای بیوسنتز نانوذرات مختلف با استفاده از گیاهان انجام شده است (Afshar & Sre et al., 2015; Zargar et al., 2011; Arumugam et al., 2016; Sedaghat, 2016; Boogar, 2014). یکی از ویژگی‌های بسیار مهم نانوذرات نقره خاصیت ضدباکتریایی آنها است که با توجه به مقاومت روزافزون باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و ایجاد انواع باکتری‌های مقاوم به آنها، جایگزینی نانوذرات زیستی نقره می‌تواند گام مؤثری در رفع این چالش بزرگ قرن بیست و یکم باشد (Rai et al., 2012).

در سال‌های اخیر استفاده از نانوذرات نقره به دلیل ویژگی‌های ضدباکتریایی آنها در زمینه‌های مختلف مانند صنایع بهداشتی-آرایشی، نساجی، پزشکی، داروسازی و غذایی اهمیت ویژه‌ای یافته است (Asharani et al., 2009). نتایج برخی محققان نیز خاصیت حشره‌کشی این نانوذرات را مشخص نموده، به طوری که کم‌هزینه‌تر بوده و مشکلات

زیست محیطی نیز ایجاد نمی‌کند (Gnanadesigan et al., 2011; Roopan et al., 2013).

گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis*) گیاهی خشبی و چندساله از خانواده نعنائیان است. این گیاه بومی قفقاز، شمال غربی ایران، ترکیه، شمال شرقی منطقه دریای سیاه و آناتولی است. زوفا چهار زیرگونه دارد که مهمترین آنها زیرگونه‌های *H. officinalis* و *H. canescens* می‌باشند. این دو زیرگونه در بیشتر نقاط جهان به‌ویژه در اروپای مرکزی می‌رویند (Tahir et al., 2018). از این گیاه در درمان بیماری‌های دستگاه تنفس فوقانی مانند سرفه، سیاه‌سرفه، برونشیت و آسم استفاده می‌شود. اسانس این گیاه خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی داشته (Kizil et al., 2010) که از این لحاظ در صنایع غذایی و آرایشی-بهداشتی کاربرد فراوان دارد. ترکیب‌های اصلی تشکیل‌دهنده اسانس زوفا پینوکامفن، آلفا-پینن، بتا-پینن، کامفن، دیوزمین و هیسوپین است (Fathiazad & Hamedeyazdan, 2011). تحقیقات انجام شده تأثیر معنی‌دار شوری را بر ترکیب‌های مؤثره گیاهان این خانواده مانند ترکیب‌های مونوترپنی گیاهانی مانند *Mentha spicata* و *Mentha pulegium* و مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) نشان داده است (Karray- Taarit et al., 2010; Bouraoui et al., 2009).

هدف اصلی این پژوهش تأثیر تیمارهای مختلف شوری بر عصاره برگ گیاه زوفا و به دنبال آن بر ویژگی‌های نانوذرات بیوسنتز شده توسط عصاره این گیاهان و خاصیت ضدباکتریایی حاصل از آنها می‌باشد. اگرچه تحقیقات زیادی در رابطه با بیوسنتز نانوذرات نقره توسط گیاهان انجام شده است ولی سازوکار دقیق آن به روشنی مشخص نشده است. از احتمالات مهم و مؤثر، شرکت مولکول‌های زیستی در این فرایند است. عوامل مختلف محیطی می‌توانند بر کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه گیاهان تأثیر بگذارند. براساس بررسی‌های انجام شده در این زمینه، این موضوع جدید بوده و تحقیق دیگری در این رابطه تاکنون ثبت نشده است. نتایج این نوع تحقیقات می‌تواند با مشخص نمودن سازوکارهای

بنومیل خیس کرده و بعد برای کشت در گلدان‌های با اندازه شماره ۴ حاوی پیت‌ماس (Klasmann-Deilman, ) potgrond H به گلخانه ( $26 \pm 3^\circ\text{C}$ ) منتقل کردند. پس از رسیدن گیاهان به مرحله شش برگی، ۲۰ عدد از گیاهان دارای شرایط ظاهری یکسان نگه‌داشته شده و بقیه حذف شدند. در مرحله ۸ برگی گیاهان به ۴ گروه تقسیم و با غلظت‌های شاهد (۰)، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار از کلرید سدیم با فاصله زمانی سه روز با شرایط یکسان (شکل ۱) تا اوایل دوره گلدهی تیمار شدند. برای ممانعت از تجمع نمک در اطراف ریشه، پس از هر ۲ مرتبه تیماردهی، گیاهان یک‌بار با آب معمولی آبیاری گردیدند. پس از گذشت مدت زمان ۶ ماه از تاریخ کشت و با مشاهده علائم اولیه گلدهی، از برگ‌ها نمونه‌برداری شده و نمونه‌های برگ‌ی بلافاصله به‌وسیله ازت مایع تثبیت و در فریزر  $-80^\circ\text{C}$  تا زمان استفاده نگهداری شدند.

بیوسنتزی نانوذرات، با توجه به هدف محققان، بیوسنتز نانوذرات همگن با ویژگی‌های مورد نظر را از لحاظ شکل، اندازه و ثبات برای کاربرد در صنایع مختلف ایجاد نماید.

## مواد و روش‌ها

### کشت و تیمار گیاهان در گلخانه

این تحقیق در بهمن‌ماه سال ۱۳۹۴ در دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین انجام شد. سدیم کلرید (NaCl) و نیترات نقره ( $\text{AgNO}_3$ ) از شرکت سیگما آلدریج خریداری گردید. بذرهای گیاه زوفا از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و پس از ضدعفونی با الکل ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه شستشو شد. در مرحله بعد از هیپوکلریت سدیم ۵٪ و یک قطره تویین ۲۰٪ به مدت ۵ دقیقه برای حذف هر گونه آلودگی استفاده شد که پس از هر مرحله ۳ مرتبه آبکشی با آب مقطر انجام شد. در مرحله آخر، بذرها را در محلول رقیق قارچ‌کش



شکل ۱- گیاه زوفا در مراحل اولیه رشد در محیط گلخانه

هریک از تیمارها پس از سرد شدن به‌وسیله کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف و در دمای  $4^\circ\text{C}$  نگهداری گردیدند (Rasaei et al., 2018).

بیوسنتز نانوذرات نقره (Ag NPs): عصاره آبی هریک از تیمارها با محلول نیترات نقره ۱ میلی‌مولار به نسبت ۱ به ۹

عصاره‌گیری: برای تهیه عصاره آبی، از برگ‌های تثبیت‌شده در تکرارهای هر تیمار، به میزان ۱۰ گرم توزین و پس از بودرد کردن به ارلن مایرهای جداگانه منتقل شدند. حجم نمونه‌ها با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و به مدت ۵ دقیقه بر روی هات‌پلیت جوشانده شدند. عصاره حاصل از

سانتریفیوژ شد. از محلول حاصل بر روی گرید دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (S-HITACHI 4160، ژاپن) قرار داده شده و پس از خشک شدن از نانوذرات بیوسنتز شده توسط هر سطح تیماری تصویربرداری شد (Nahar et al., 2020).

تعیین گروه‌های عاملی مؤثر در بیوسنتز با دستگاه تبدیل طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR): پودر نانوذرات نقره با نمک پتاسیم بروماید (KBr) به نسبت ۱:۱۰۰ مخلوط شده و توسط دستگاه FTIR (Bruker، آلمان) در محدوده طول‌موج‌های بین  $4000-400\text{Cm}^{-1}$  مورد آزمون قرار گرفته و نمودار پیک‌های جذبی رسم گردید (Rasae et al., 2018).

بررسی خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات بیوسنتز شده نقره: خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از روش انتشار صفحه‌ای (Rakholiya & Chanda, 2012) بر روی باکتری‌های (*Escherichia coli* (PTTC1276) و *Bacillus subtilis* (M59KP406766) و *Bacillus vallismortis* (M92KP406765) با کشت بر روی محیط‌کشت LB در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  مورد بررسی قرار گرفت. هاله مهارکنندگی اطراف دیسک حاوی نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط هر تیمار نسبت به دیسک آب مقطر و دیسک حاوی نیترات نقره ۱ میلی‌مولار اندازه‌گیری شده و مورد مقایسه قرار گرفت.

طرح آزمایشی تجزیه و تحلیل آماری: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد و بررسی‌های آماری مربوط به تأثیر شوری بر عملکرد بیوسنتز نانوذرات نقره براساس حداکثر میزان غلظت بدست‌آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۷ زمان، در تیمارهای مختلف با سه تکرار توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد بررسی قرار گرفت و جدول تجزیه واریانس SOV رسم گردید. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ استفاده شده و نمودار آن نیز توسط نرم‌افزار Excel ۲۰۱۰ رسم شد.

مخلوط و تا تثبیت روند تغییر رنگ، بر روی شیکر با سه تکرار قرار داده شدند (Pirtarighat et al., 2019).

تعیین ویژگی‌های نانوذرات نقره بیوسنتز شده اسپکتروفتومتری با UV: اسپکتروفتومتری به مدت ۵ ساعت با فواصل زمانی ۱۵ دقیقه و به صورت تصاعد هندسی از زمان شروع برهم‌کنش در طول‌موج‌های بین ۳۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر انجام شده و میزان جذب نوری اندازه‌گیری شد. با توجه به داده‌های بدست‌آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Labomed.UV-win5، آلمان) نمودار جذب نوری براساس میانگین عملکرد سه تکرار رسم شد (Umashankari et al., 2012).

بررسی تأثیر سطوح مختلف شوری بر روی سرعت واکنش بیوسنتز نانوذرات: برای این امر، نمودارهای مربوط به افزایش میانگین غلظت نانوذرات بر حسب زمان توسط تیمارهای مختلف رسم و با یکدیگر مقایسه شدند.

تعیین ماهیت نانوذرات به وسیله دستگاه تفرق اشعه ایکس (XRD): برای تعیین ماهیت نانوذرات، ابتدا از محلول حاصل از برهم‌کنش رسوب‌گیری شده و توسط آون در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد خشک گردید. ۰/۱ گرم از پودر نانوذرات نقره توسط دستگاه XRD (X'Pert PRO MPD، هلند) آزمایش شده و طول‌موج‌های انعکاس یافته بین ۰ تا ۹۰ نانومتر اندازه‌گیری و نمودار آن ترسیم شد (Pirtarighat et al., 2019).

تعیین میانگین اندازه نانوذرات بیوسنتز شده توسط دستگاه پراکندگی دینامیکی نور (DLS): ابتدا نمونه محلول مورد نظر در آب دیونیزه مخلوط شده و بعد محلول بدست‌آمده صاف و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی به میزان ۴-۵ برابر رقیق شده و بعد توزیع ذرات در محلول از لحاظ اندازه، توسط دستگاه DLS (Zetaplus، کانادا) مورد مطالعه قرار گرفت (Nahar et al., 2020).

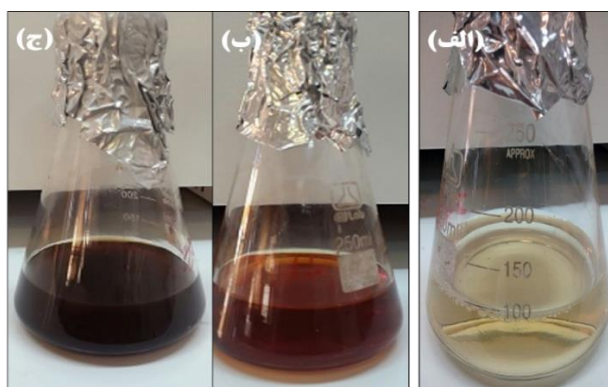
تعیین اندازه و شکل نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FESEM): محلول حاصل از هر برهم‌کنش با سرعت ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه

## نتایج

### نتایج تغییر رنگ محلول حاصل از واکنش

تغییر رنگ محلول نیترات نقره پس از افزودن عصاره به آن نشان‌دهنده احیاء یون‌های نقره به نانوذرات آن توسط عصاره

گیاه زوفا می‌باشد (شکل ۲). رنگ ابتدایی پس از مخلوط کردن عصاره برگ با نیترات نقره ۱ میلی‌مولار زرد کم‌رنگ بوده، پس از ۲/۵ ساعت به رنگ قرمز قهوه‌ای و پس از حدود ۵ ساعت به رنگ خاکستری مات تغییر رنگ داد.



شکل ۲- تغییر رنگ محلول در نتیجه تشکیل نانوذرات نقره با استفاده از عصاره زوفا؛ (الف) شروع واکنش، (ب) بعد از ۲/۵ ساعت و

(ج) بعد از ۵ ساعت

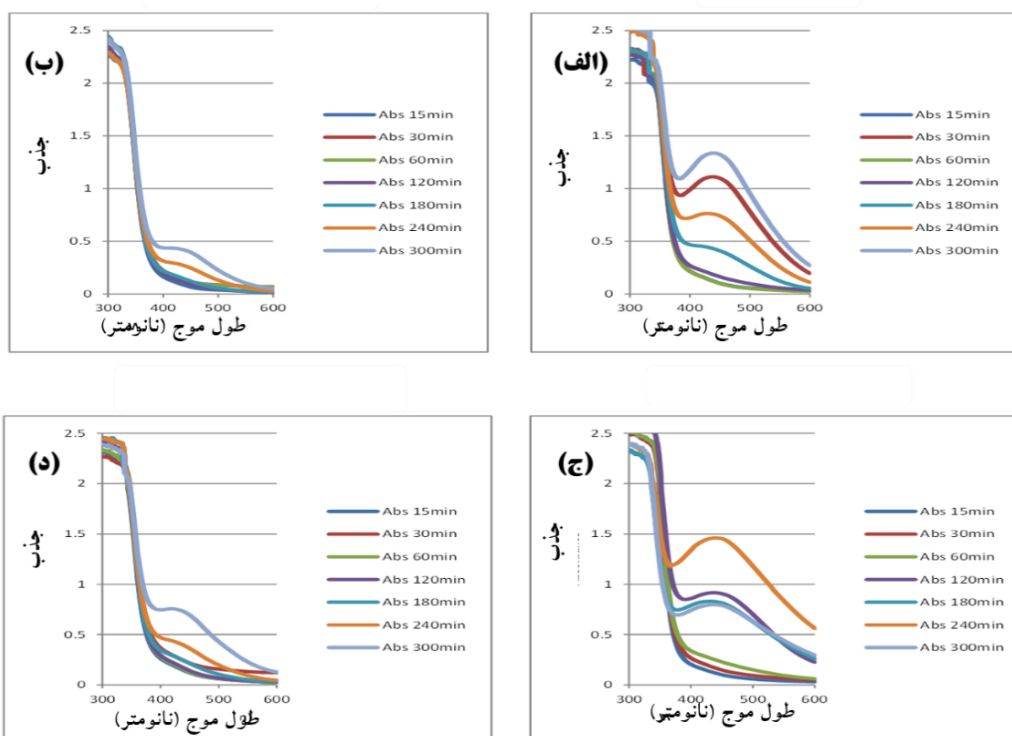
### اسپکتروفتومتری با UV

منحنی‌های ایجاد شده در اسپکتروفتومتری در تمام تیمارها، زنگوله‌ای شکل با پیکی در طول موج حدود ۴۵۰ نانومتر نشان‌دهنده بیوسنتز نانو ذرات نقره بودند. با توجه به نمودارهای بدست آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر برای میزان بیوسنتز نانوذرات توسط عصاره برگ تیمارهای مختلف گیاه زوفا، مشخص شد که تیمارهای شاهد و ۱۰۰ میکرومولار از این لحاظ دارای قابلیت بالا و تقریباً یکسانی هستند. همچنین با توجه به پیک جذب تیمار ۵۰ میکرومولار بعد از ۵ ساعت مشخص شد که این تیمار در زمینه بیوسنتز نانو ذرات کمترین مقدار را نسبت به سایر تیمارها دارد (شکل ۳). نتایج عدم وجود رابطه مستقیم، افزایش غلظت تیمارها و افزایش میزان بیوسنتز را در نمونه‌ها مشخص نمود.

استفاده از عصاره برگ تیمارهای مختلف گیاه زوفا، بیشترین سرعت (حداکثر شیب) را مربوط به تیمار ۱۰۰ و کمترین سرعت را در غلظت ۵۰ میکرومولار نشان داد. همچنین با توجه به نمودار سرعت بیوسنتز ثبت شده توسط تیمار ۱۰۰ میکرومولار نیز حداکثر سرعت بیوسنتز در فاصله‌های زمانی ۶۰-۱۲۰ و ۱۸۰-۲۴۰ دقیقه بوده و در فاصله زمانی ۱۲۰-۱۸۰ دقیقه کاهش غلظت با سرعت کمتری نسبت به سرعت بیوسنتز اتفاق افتاده است. پس از بررسی نمودار سرعت بیوسنتز توسط تیمارهای مختلف (شکل ۴) مشخص شد که تیمار ۱۰۰ میکرومولار موجب افزایش سرعت چشمگیری نسبت به تیمار شاهد شده و در مقابل تیمار ۵۰ میکرومولار با کاهش سرعت بیوسنتز نسبت به تیمار شاهد نشان داد که بر روی سرعت واکنش تأثیر منفی دارد. در تیمار شاهد سرعت بیوسنتز به شکل خطی و افزایشی بدون تغییرات قابل توجه مانند سایر تیمارها به‌ویژه تیمار ۱۰۰ میکرومولار بود.

### سرعت بیوسنتز نانوذرات در تیمارهای مختلف

نتایج مربوط به بررسی سرعت بیوسنتز نانوذرات با



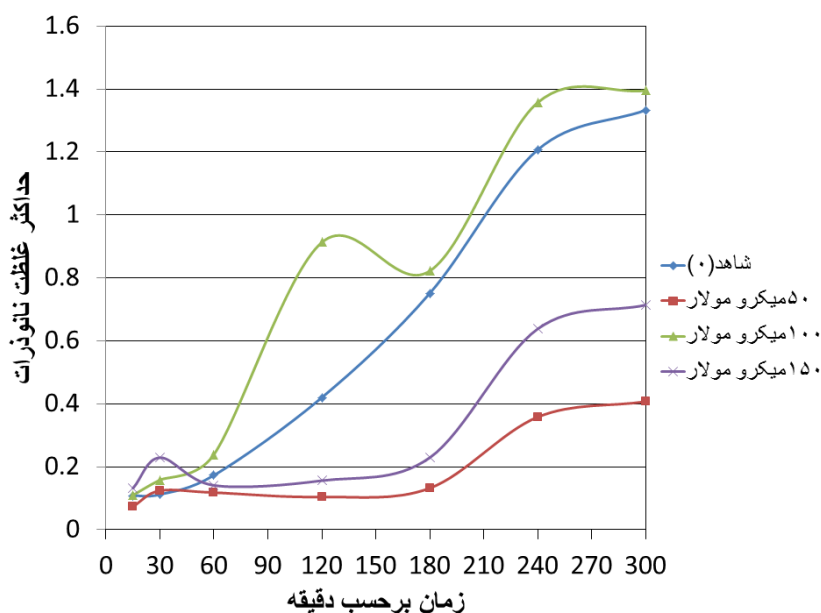
شکل ۳- نمودارهای جذب نوری نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره برگ گیاه زوفا در زمان‌های مختلف با استفاده از دستگاه

اسپکتروفتومتر؛ (الف) شاهد، (ب) تیمار  $50 \mu\text{m}$ ، (ج) تیمار  $100 \mu\text{m}$  و (د) تیمار  $150 \mu\text{m}$

تیمار شاهد و کمترین مقدار در زمان ۱۵ دقیقه پس از بیوسنتز توسط تیمار  $50$  میکرومولار ایجاد شد. نتایج مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تیمارهای مختلف شوری از لحاظ میزان غلظت نانوذرات اختلاف معنی‌داری نشان دادند. به طوری که بیشترین مقدار جذب نوری در تیمارهای شاهد و  $100$  میکرومولار دیده شد که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشته ولی با  $2$  تیمار  $150$  و  $50$  میکرومولار اختلاف معنی‌دار نشان دادند. تیمارهای  $50$  و  $150$  میکرومولار نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نشان دادند. کمترین غلظت و جذب نوری در تیمار غلظت  $50$  میکرومولار مشاهده شد (شکل ۵).

مقایسه غلظت نانو ذرات بیوسنتز شده و میزان جذب در تیمارها و زمان‌های مختلف

نتایج تجزیه واریانس داده‌های دستگاه اسپکتروفتومتری برای بیوسنتز نانوذرات توسط عصاره برگ تیمارهای مختلف گیاه زوفا در ۷ زمان نشان داد که هر ۴ سطح تیمار شوری از لحاظ حداکثر میزان غلظت نانوذرات بیوسنتز شده در زمان‌های یکسان باهم اختلاف معنی‌داری دارند (جدول ۱). معنی‌دار شدن اثر زمان نشان داد که زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان غلظت نانوذرات تولید شده داشتند. همچنین بیشترین و کمترین میزان غلظت به ترتیب  $1/649$  و  $0/086$  بود که بیشترین مقدار در زمان ۵ ساعت توسط



شکل ۴- سرعت بیوسنتز نانوذرات نقره توسط تیمارهای مختلف

جدول ۱- تجزیه واریانس میزان جذب نوری نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط تیمارهای مختلف شوری

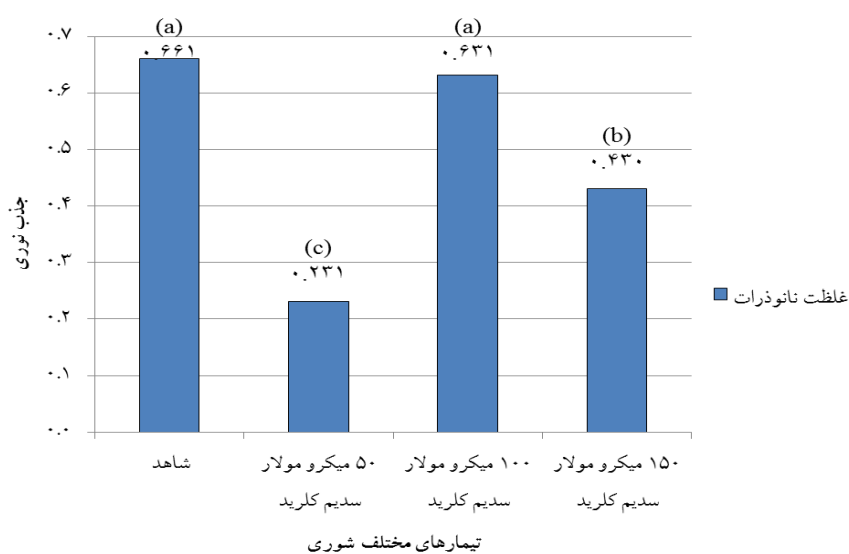
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۰/۸۳۷*
زمان	۶	۱/۷۳۶*
تیمار × زمان	۱۸	۰/۱۹۶*
خطا	۵۶	۰/۰۲۲
ضریب تغییرات (%)		۳۰/۳۹

\*: معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ns: غیر معنی دار

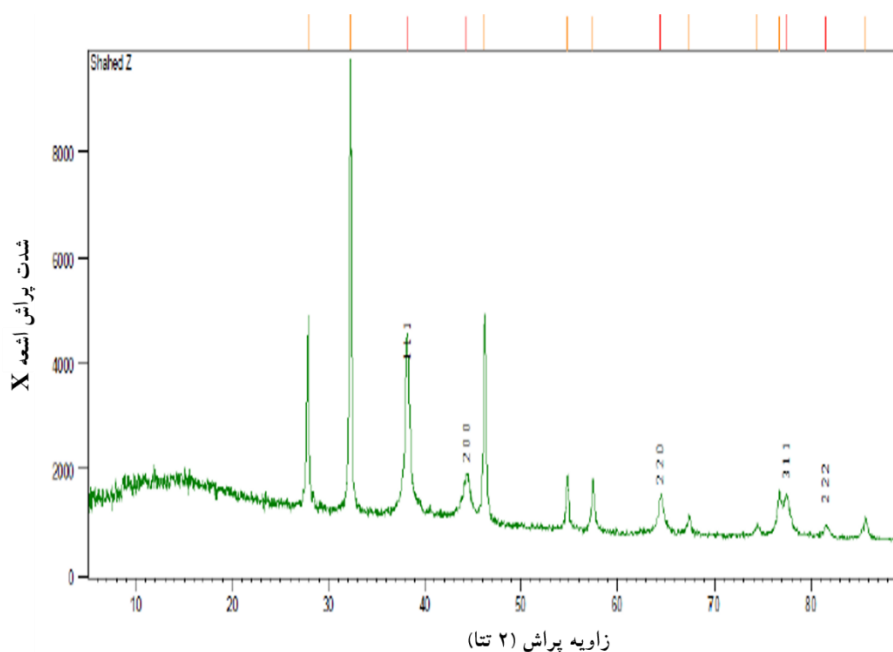
## تفرق اشعه X

الگوی تفرق اشعه X نانوذرات نقره بیوسنتز شده در شکل ۶ نشان داده شده است. پیک‌های قابل تشخیص در  $2\theta$  برابر با  $38/2^\circ$ ،  $44/7^\circ$ ،  $64/9^\circ$ ،  $77/5^\circ$  و  $81/6^\circ$  به ترتیب سطوح کریستالی ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰، ۳۱۱ و ۲۲۲ از نانوذرات نقره بیوسنتز شده را مشخص می‌کنند.

پراکندگی اندازه نانوذرات نقره بیوسنتز شده به وسیله عصاره برگ گیاهان در سطوح مختلف تیمارهای شوری به وسیله دستگاه تفرق دینامیکی نور (DLS) مشخص گردید (شکل ۷). نتایج نشان داد که میانگین اندازه نانوذرات بیوسنتز شده برای تیمارهای شاهد (۰)، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار به ترتیب برابر با  $25/3$ ،  $63/2$ ،  $37/3$  و  $34/2$  نانومتر می‌باشد (جدول ۲).

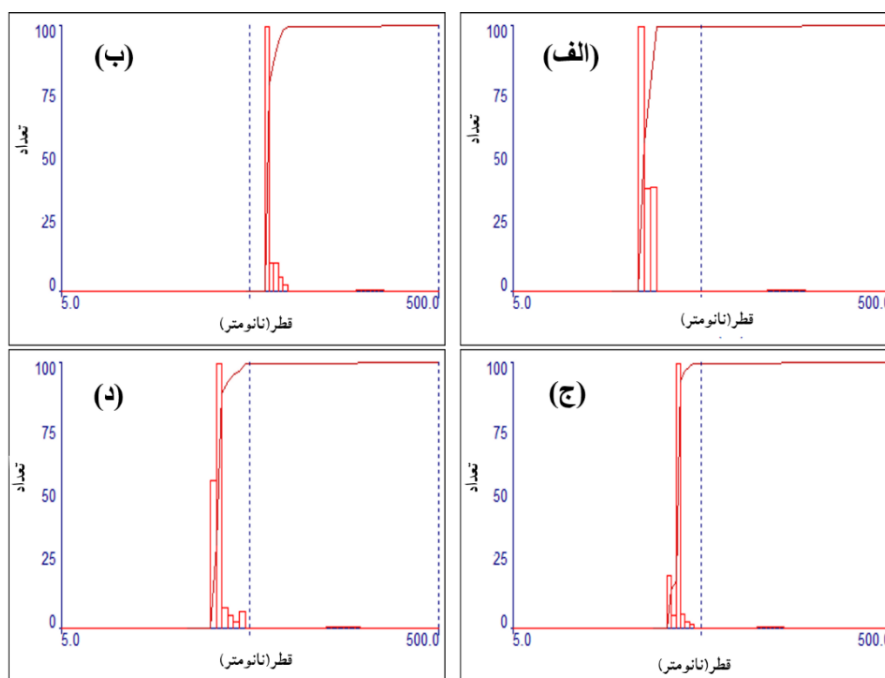


شکل ۵- مقایسه میانگین جذب نوری (غلظت نانوذرات بیوسنتزی) در تیمارهای مختلف شوری در گیاه زوفا براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن



شکل ۶- الگوی XRD گزارش شده از نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره برگ گیاه زوفا و میانگین اندازه نانوذرات بیوسنتز شده (DLS)





شکل ۷- نتایج اندازه‌گیری اندازه نانوذرات بیوسنتز شده براساس اکثریت تعداد با استفاده از عصاره برگ گیاه زوفا توسط دستگاه

پراکندگی دینامیکی نور (DLS) در تیمارهای مختلف؛ الف) شاهد، ب) ۵۰، ج) ۱۰۰ و د) ۱۵۰ میکرومولار

جدول ۲- بررسی تأثیر تیمارهای مختلف شوری بر روی تنوع و میانگین اندازه نانوذرات بیوسنتز شده

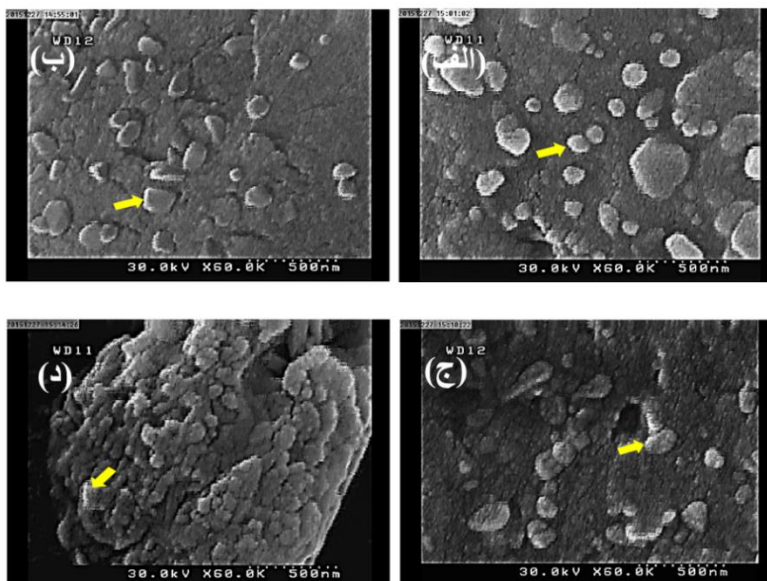
تیمار	تنوع اندازه (نوع)	میانگین اندازه (نانومتر)
شاهد	۳	۲۵/۳
۵۰ میکرومولار	۵	۶۳/۲
۱۰۰ میکرومولار	۶	۳۷/۳
۱۵۰ میکرومولار	۶	۳۴/۲

بیوسنتزی در شکل ۹ نشان داده شده است که گروه‌های عملکردی بیومولکول‌های احتمالی شرکت‌کننده در فرایند بیوسنتز را مشخص می‌کنند. پیک‌های قوی در عصاره خالص برگ زوفا در محدوده‌های (۳۰۹۱/۷۵-۳۴۲۴/۰۱)، (۱۳۵۹/۱۴۱۶-۱۲/۹۰)، (۱۶۰۴/۱۶۱۵-۸۵/۳۹)، (۱۱۱۶/۱۱۲۲-۱۶/۴۸) و (۶۷۵/۶۷۷-۱۳/۴۶) و (۶۰۱/۶۰۲-۲۹/۱۶) بر سانتی‌متر<sup>-۱</sup> مشاهده شد و پیک  $\text{Cm}^{-1}$  ۲۳۴۱/۵۶ فقط در غلظت ۵۰ میکرومولار قابل مشاهده بود. از سوی دیگر پیک‌های قوی و مشخصی در عصاره‌های بیوسنتزی در محدوده (۳۴۱۴/۹۵-۳۴۲۲/۴۲)،

اندازه و شکل ظاهری نانوذرات (FESEM) نتایج بررسی تصاویر بدست آمده از نانوذرات بیوسنتز شده توسط تیمارهای مختلف شوری با استفاده از دستگاه FESEM (شکل ۸) نشان داد که بیشتر نانوذرات نقره بیوسنتز شده کروی شکل بوده اما در دو تیمار ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار اشکال زاویه‌دار نیز وجود داشتند. همچنین بیشتر نانوذرات بیوسنتز شده توسط لایه نازکی از متابولیت‌های ثانویه (احتمالاً پروتئین‌ها و ترکیب‌های قندی) احاطه شده بودند.

طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR): نتایج طیف‌های حاصل از FTIR در عصاره‌های خالص و همچنین عصاره‌های

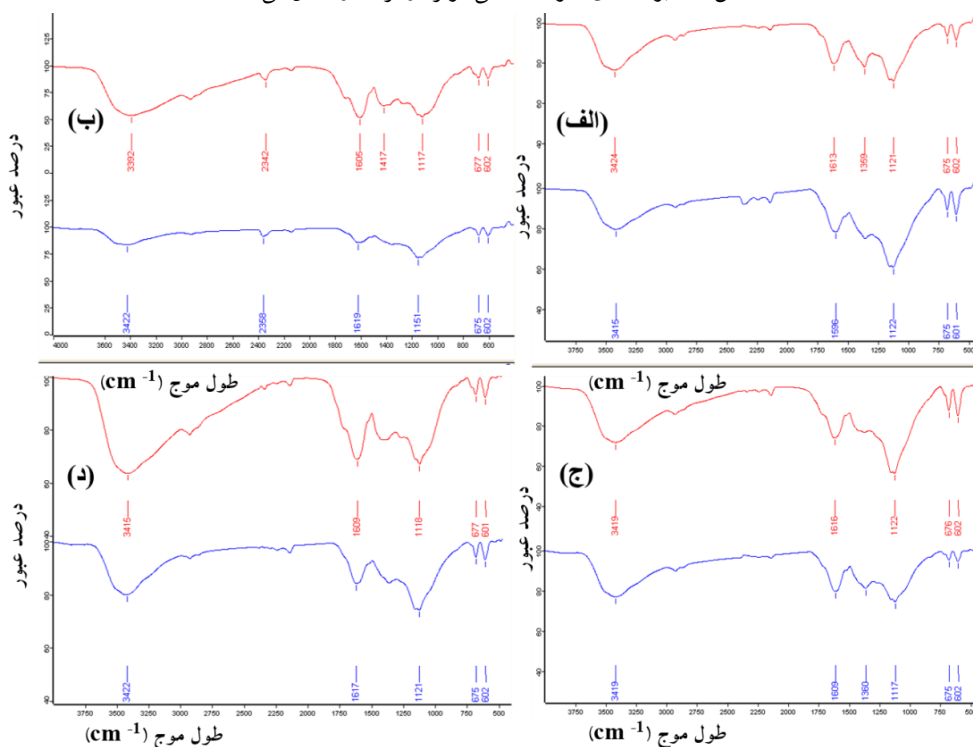
مشاهده شده و پیک ۱۳۵۹/۹۹ فقط در غلظت ۱۰۰ میکرومولار قابل مشاهده بود. (۶۶/۷۹-۱۶۰۸/۱۶۹۵)، (۴۶/۸۷-۱۱۱۷/۱۱۵۰)، (۶۷۵/۶۷۵-۲۳/۴۶) و (۶۰۱/۷۳-۶۰۱/۳۷) بر سانتی متر



شکل ۸- تصاویر FESEM نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از عصاره برگ گیاه زوفا در تیمارهای مختلف؛ الف) شاهد (۰)، ب)

۵۰ (ج) ۱۰۰ و (د) ۱۵۰ میکرومولار از NaCl

فلش‌ها متابولیت‌های نانویه احتمالی مؤثر در فرایند را نشان می‌دهد.

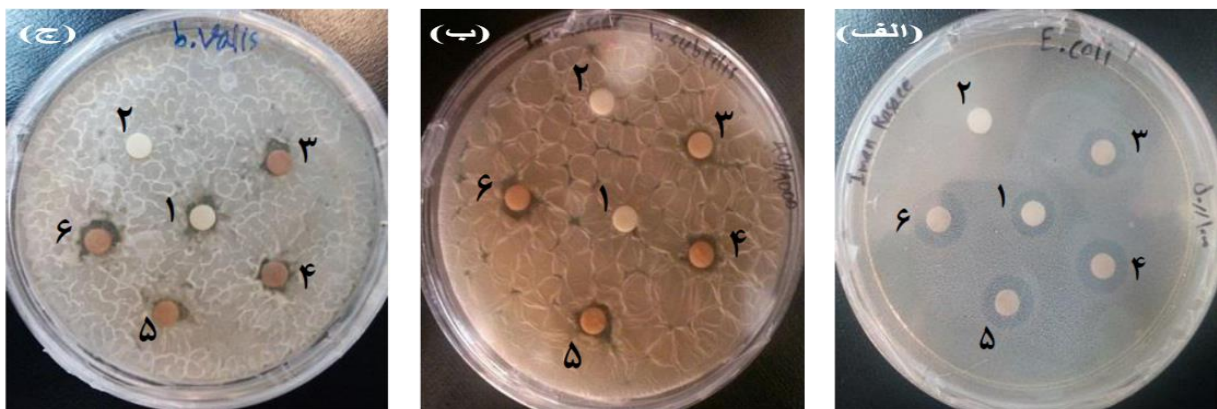


شکل ۹- طیف FTIR از عصاره خالص (رنگ قرمز) و محلول بیوسنتزی نانوذرات (رنگ آبی) گیاه زوفا؛ الف) شاهد، ب) تیمار ۵۰

میکرومولار، ج) تیمار ۱۰۰ میکرومولار و د) تیمار ۱۵۰ میکرومولار

بیشتر بوده و افزایش غلظت تیمار در عصاره‌های بیوسنتزی با افزایش تدریجی ویژگی آنتی‌باکتریالی نانوذرات نقره بیوسنتز شده همراه است. در ادامه پس از بررسی تأثیر نانوذرات بیوسنتز شده بر روی باکتری *B. subtilis* مشخص شد که بیشترین میزان قطر هاله مهارکنندگی در اطراف دیسک حاوی تیمار ۱۵۰ میکرومولار با مقدار ۷ میلی‌متر تشکیل شده، در صورتی‌که اندازه این هاله برای دیسک حاوی محلول نیترات نقره و تیمار شاهد از همه کمتر و برابر با ۶ میلی‌متر و برای تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار برابر با ۶/۵ میلی‌متر بود. انجام آزمون خاصیت آنتی‌باکتریال نانوذرات بر روی باکتری *B. vallismortis* نشان داد که بیشترین میزان حساسیت را نسبت به دیسک حاوی تیمار ۱۵۰ میکرومولار داراست. قطر هاله مهارکنندگی برای این تیمار تقریباً ۷ میلی‌متر بود. این هاله برای سایر دیسک‌های حاوی محلول نیترات نقره، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار تقریباً برابر با ۶ میلی‌متر و برای تیمار شاهد ۶/۵ میلی‌متر بود. نکته قابل توجه و مهم وجود خاصیت ضدباکتریایی در عصاره خالص برگ زوفا بوده که البته این ویژگی در نانوذرات بیوسنتزی توسط عصاره آنها افزایش می‌یافت.

بررسی خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره بیوسنتز شده نتایج این بخش مشخص کرد که باکتری *E. coli* دارای بیشترین حساسیت نسبت به نانوذرات نقره بیوسنتز شده است. از سوی دیگر با افزایش شوری میزان خاصیت آنتی‌باکتریال نانوذرات بیوسنتزی افزایش یافت. در باکتری‌های *B. subtilis* و *B. vallismortis* نیز این خاصیت برای تیمار ۱۵۰ میکرومولار بیشتر بود که این امر احتمالاً به دلیل افزایش میزان نانوذرات با شکل‌های مختلف و زاویه‌دار در این تیمار می‌باشد. نتایج آزمون آنتی‌باکتریال نانوذرات بیوسنتز شده توسط عصاره برگ گیاه زوفا (شکل ۱۰) نشان داد که میزان سمیت نانوذرات بیوسنتز شده نسبت به نیترات نقره بیشتر بوده است. میزان قطر هاله مهارکنندگی در باکتری *E. coli* برای دیسک حاوی محلول نیترات نقره از سایر دیسک‌ها کمتر و برابر با ۷/۵ میلی‌متر بود که این میزان برای دیسک حاوی نانوذرات بیوسنتز شده توسط عصاره برگ تیمارهای شاهد، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار به ترتیب برابر با ۸، ۹، ۹ و ۱۰ میلی‌متر بود. بنابراین خاصیت سمیت نانوذرات بیوسنتز شده بر روی *E. coli* برای دیسک حاوی تیمار ۱۵۰ میکرومولار از سایر دیسک‌ها



شکل ۱۰- نتایج آزمون ضدباکتریایی نانوذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره برگ گیاه زوفا؛

(الف) *E. coli* (ب) *B. subtilis* (ج) *B. vallismortis*

(۱) نیترات نقره، (۲) آب مقطر، (۳) تیمار شاهد، (۴) تیمار ۵۰، (۵) تیمار ۱۰۰ و (۶) تیمار ۱۵۰ میکرومولار

## بحث

در این تحقیق برای نخستین بار تأثیر تنش شوری حاصل از NaCl بر عصاره برگ گیاه زوفا و به دنبال آن بر بیوسنتز نانو ذرات نقره حاصل از آنها مورد بررسی قرار گرفت. تغییر رنگ محلول عصاره پس از اضافه شدن محلول نترات نقره به دلیل احیاء یون‌های فلزی در طی واکنش است (Das & Smita, 2018). تیره شدن رنگ محلول در طول زمان نیز به تشدید پلاسمون سطحی نانو ذرات نقره (Ag NPs) ارتباط داشته و تشکیل آنها را تأیید می‌کند (Malinsky *et al.*, 2001).

تشکیل پیک در ۴۵۰nm در طیف جذبی UV-vis در محلول‌های واکنش، تشکیل نانو ذرات نقره را از یون‌های نقره تأیید کرد. تعدد پیک‌ها در منحنی نشان‌دهنده ناهمگن بودن نانوذرات بیوسنتز شده بوده و وجود نمودارهای جذبی وسیع با یک پیک می‌تواند نشانه‌ای از وجود نانوذرات یک شکل و کروی باشد (Das & Smita, 2018; Rajesh *et al.*, 2009) که با نتایج این تحقیق مطابقت نشان می‌دهد. بیشترین میزان جذب نوری به ترتیب در تیمارهای شاهد، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۵۰ میکرومولار مشاهده شد که در همه آنها بجز تیمار ۱۰۰ میکرومولار، حداکثر جذب در زمان ۵ ساعت پس از آغاز واکنش مشاهده شد که با نتایج گزارش شده توسط دیگر محققان همخوانی دارد (Pirtarighat *et al.*, 2019).

سرعت بیوسنتز نانوذرات نقره در تیمار شاهد به شکل ثابت و تدریجی افزایش یافته و منحنی سیگموئیدی ایجاد نمود که این وضعیت در تیمارهای ۱۵۰ و ۵۰ میکرومولار نیز با سرعت کمتری قابل مشاهده بود. سرعت بیوسنتز در غلظت ۱۰۰ میکرومولار از سایر تیمارها بیشتر بود که البته به شکل مقطعی در فواصل زمانی ۶۰-۱۲۰ و همچنین ۱۸۰-۲۴۰ دقیقه پس از شروع واکنش حداکثر سرعت را نشان داد. ظاهراً تأثیر تیمار NaCl در این غلظت سبب تغییر کمیت و کیفیت متابولیت‌های موجود در عصاره شده و به دنبال آن نوسانهای شدید سرعت بیوسنتز، در زمان‌های

مختلف را ایجاد نموده که در تأیید نتایج برخی تحقیقات در رابطه با عدم ارتباط مستقیم افزایش غلظت تیمار و ترکیب‌های گیاه است (Lidon & Teixeira, 2000). بسیاری از تحقیقات تأثیر تیمار شوری را بر نوع و مقدار مولکول‌های زیستی در گیاهان اثبات کرده است (Ramakrishna & Ravishankar, 2011). برخی محققان تأثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی را بر عصاره حاصل از گیاهان و به دنبال آن ویژگی‌های نانوذرات بیوسنتزی توسط آن عصاره‌ها را بررسی نموده‌اند (Vanaja *et al.*, 2013). تأثیر تیمارهای مختلف بر گیاه و اثر عصاره حاصل از آن بر فرایند بیوسنتز نانوذرات در این تحقیق در ادامه پژوهش‌های ما در این رابطه است (Rasaei *et al.*, 2018). اگرچه سرعت بیوسنتزی در غلظت ۵۰ میکرومولار از دیگر تیمارها کمتر بود ولی وجود پیک  $2341/56 \text{ cm}^{-1}$  در FTIR که فقط در تیمار ۵۰ میکرومولار دیده شد نشان‌دهنده تولید ترکیب‌های سیانیدی و نیتریلی دارای گروه‌های  $C\equiv N$  و  $C\equiv C$  است (Pavia *et al.*, 2008) که می‌توانسته بر فرایند بیوسنتز تأثیر داشته باشد.

غلظت نانوذرات بیوسنتز شده در تیمارها و زمان‌های مختلف با یکدیگر اختلاف‌های معنی‌داری نشان داد که از لحاظ تأثیر زمان بر فرایند با برخی از نتایج قبلی تطابق نشان داد (Pirtarighat *et al.*, 2017). بیشترین غلظت نانوذرات بیوسنتزی در تیمار شاهد و ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد. این نتیجه می‌تواند تأثیر کمتر (غلظت ۵۰ میکرومولار) را مشابه شاهد و فعال شدن سیستم مقاومتی گیاه را در غلظت بالاتر (۱۰۰ میکرومولار) برای ممانعت تأثیر شوری بر سیستم بیوسنتزی گیاه نشان‌دهند (Negrao *et al.*, 2017). غلظت ۵۰ میکرومولار بیشترین تأثیر منفی را بر غلظت نانوذرات بیوسنتزی نشان داد. افزایش حداکثری گروه‌های عاملی بیومولکول‌ها در غلظت ۵۰ میکرومولار (نتایج FTIR همین تحقیق)، ظاهراً تأثیر منفی بر غلظت نانوذرات بیوسنتز شده (مانند سرعت بیوسنتز) داشته است.

دارای گروه‌های عاملی مختلف مانند  $\text{OH}$ ،  $\text{CH}_3$ ،  $\text{CO}$ ،  $\text{CH}=\text{C}$ ،  $\text{C}\equiv\text{N}$ ،  $\text{NH}$  و دیگر گروه‌ها می‌باشند (Pavia *et al.*, 2008). روش طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FTIR) دارای حساسیت بالا و سرعت زیاد بوده و در تشخیص ترکیب‌های آلی با استفاده از گروه‌های عاملی آنها قابلیت استفاده دارد (Stehfest *et al.*, 2005)، به طوری که در بسیاری از تحقیقات برای تشخیص متابولیت‌های گیاهی و تغییرات آنها تحت تأثیر تیمارهای مختلف قرار گرفته است (Hoang *et al.*, 2015). نتایج FTIR در این مطالعه نشان می‌دهد که تیمارهای مختلف شوری بر عصاره خالص برگ گیاه زوفا تأثیر داشته و با تحقیقاتی مشابه در این رابطه مطابقت دارد (Karray-Bouraoui *et al.*, 2010; Taarit *et al.*, 2009). پیک طیف‌ها میزان عبور را مشخص کرده و می‌توان با رابطه معکوس میزان جذب گروه‌های عاملی را نیز مشخص نمود. در مقایسه عصاره‌های خالص تیمارها با یکدیگر، پیک‌ها در محدوده (۳۴۲۴/۰۱-۳۰۹۱/۷۵) بر سانتی‌متر مشخص کننده گروه عاملی  $\text{OH}$  است که در ترکیب‌های فنلی، الکلی و کربوکسیلیک اسید هم وجود داشته (Stehfest *et al.*, 2004) و حداکثری در غلظت ۵۰ و حداقلی در تیمار شاهد نشان داده و می‌تواند بیانگر افزایش غلظت این ترکیب‌ها در غلظت ۵۰ میکرومولار باشد. وجود پیک در (۱۶۱۵/۳۹-۱۶۰۴/۸۵) بر سانتی‌متر وجود گروه عاملی  $\text{C}=\text{C}$  موجود در حلقه‌های آروماتیک (بنزن) را در ترکیب‌های معطر پلی‌فنل و مونوترین نشان می‌دهد که حداکثر جذب (غلظت) آن در تیمار ۵۰ و حداقل در تیمار شاهد قابل مشاهده بود. وجود پیک در (۱۴۱۶/۹۰-۱۳۵۹/۱۲) بر سانتی‌متر وجود گروه عاملی  $\text{CH}_3$  آلکان‌های موجود را در کربوهیدرات‌ها مشخص می‌کند. حداکثر و حداقل جذب (غلظت) این ترکیب‌ها در غلظت ۵۰ و ۰ (شاهد) مشاهده شده که با برخی نتایج قبلی مبنی بر افزایش کربوهیدرات‌ها در تیمار شوری در گیاه انگور مطابقت داشته (Oliveira *et al.*, 2009) و در دو غلظت بالاتر پیک‌های قابل تشخیصی مشاهده نشد. وجود پیک در (۱۱۲۲/۴۸-۱۱۱۶/۱۶) بر سانتی‌متر مشخص کننده گروه عاملی  $\text{CO}$  در ترکیب‌هایی

نتایج نمودار XRD، ساختار کریستالی مکعب شکل نانوذرات را مشخص کرد (Pirtarighat *et al.*, 2019). پیک‌های کمتر از  $2\theta$  می‌تواند وجود ترکیب‌های آلی را در عصاره گیاه مشخص کند که این بیومولکول‌ها احتمالاً در احیاء و ثبات نانوذرات بیوسنتز شده نقش داشته‌اند (Pirtarighat *et al.*, 2019). نتایج حاصل از دستگاه (DLS) اندازه تمام نانوذرات بیوسنتز شده را کمتر از  $100\text{ nm}$  نشان داد. بجز تیمار شاهد، افزایش غلظت تیمارها سبب کاهش اندازه نانوذرات شده و کوچکترین اندازه پس از شاهد مربوط به تیمار  $150\text{ nm}$  میکرومولار با اندازه  $34/2\text{ nm}$  بود که با نتایج تحقیقات قبلی مشابه مطابقت داشت (Rasaei *et al.*, 2018). اگرچه این نانوذرات کوچکترین اندازه را نداشتند ولی به دلیل اشکال زاویه‌دار در اثر تیمار، بیشترین خاصیت ضدباکتریایی را نشان دادند. ظاهراً تغییرات متابولیت‌های عصاره برگ گیاهان تحت تأثیر تیمار بر بیوسنتز و ویژگی‌های نانوذرات نقره مؤثر است. ادامه تحقیقات در رابطه با افزایش بیشتر غلظت تیماری برای بیوسنتز نانوذرات کوچکتر با ویژگی‌های ضدباکتریایی بیشتر در دست انجام است. براساس نتایج FESEM بیشتر نانوذرات بیوسنتز شده در تیمارها کرووی شکل بوده ولی در تیمارهای  $50$  و  $100$  میکرومولار انواع زاویه‌دار نیز قابل مشاهده بودند. نانوذرات بیشتر به شکل پخش شده و یکنواخت بوده، کمتر به شکل پیوسته بهم و خوشه‌ای بودند. وجود لایه نازک سفید رنگ در اطراف نانوذرات، نشانه‌ای از وجود ترکیب‌های آلی موجود در عصاره گیاهان بوده که در فرایند بیوسنتزی شرکت کرده و سبب زیست سازگاری بیشتر نانوذرات بیوسنتزی می‌شوند (Pirtarighat *et al.*, 2019; Khandekar *et al.*, 2014; Pugazhendhi *et al.*, 2018; Oves *et al.*, 2018).

نتایج تأثیر تیمارهای مختلف شوری بر ترکیب‌های گروه‌های عاملی ترکیب‌های آلی برگ گیاهان زوفا را نشان داد. بیشتر گیاهان دارای ترکیب‌های مختلف شیمیایی از نوع ترکیب‌های ثانویه هستند. ترکیب‌های اولیه و ثانویه گیاهی

میکرومولار نسبت به شاهد مشاهده شد. با مقایسه طیف FTIR از عصاره خالص تیمار ۵۰ میکرومولار و عصاره بیوسنتزی نانوذرات توسط آن، بیشترین تغییر پیک‌ها مربوط به کاهش جذب (غلظت) گروه‌های عاملی بررسی شده در این تحقیق مربوط به گروه‌های OH، C=C و همچنین CO بود. این نتایج مشخص کرد که ترکیب‌هایی مانند الکل‌ها و فنل‌های موجود در حلقه‌های بنزنی ترکیب‌های معطر پلی‌فنلی و مونوترپن‌ها، همچنین اتر، استر، اسیدهای کربوکسیلیک و آلکالوئیدهای موجود در عصاره برگ، بیشترین نقش احتمالی را در بیوسنتز نانوذرات نقره دارند که تحقیقات زیادی وجود این ترکیب‌ها را در گیاه زوفا مشخص نموده است (Kazazi et al., 2007; Zheljzkov et al., 2012).

در این تحقیق، باکتری گرم منفی *E. coli* نسبت به باکتری‌های گرم مثبت *B. subtilis* و *B. vallismortis* حساسیت بیشتری نشان دادند که مخالف نتایج تحقیقی ما در رابطه با گیاه ریحان است (Pirtarighat et al., 2017). این نتیجه را می‌توان به تفاوت بیومولکول‌های موجود در عصاره دو گیاه که در فرایند بیوسنتزی شرکت کرده و به طبع آن ویژگی‌های نانوذرات بیوسنتز شده، ارتباط داد (Kazazi et al., 2007). ویژگی ضدباکتریایی عصاره خالص برگ زوفا در مورد هر سه باکتری قابل مشاهده بود که با برخی نتایج تحقیقاتی قبلی مطابقت داشت (Zheljzkov et al., 2012). معمولاً باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی حساس‌تر هستند، زیرا فقط یک لایه پپتیدوگلیکان دارند که سد مؤثر غیرقابل نفوذی نسبت به وجود لایه فسفولیپیدی در باکتری‌های گرم منفی نیست. به این شکل دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی به دلیل وجود لایه‌های متعدد پپتیدوگلیکانی و فسفولیپیدی نسبت به داروها غیرقابل نفوذتر است (Ravikumar et al., 2010). افزایش ویژگی ضدباکتریایی نانوذرات بیوسنتزی با افزایش غلظت تیمارها را می‌توان به تغییرات کمیت و کیفیت بیومولکول‌های بیوسنتزی در گیاهان در اثر تیمارهای مختلف و به دنبال آن اندازه و شکل نانوذرات بیوسنتز شده و حتی ترکیب‌های آلی

مانند الکل‌ها، اترها، استرها، اسیدهای کربوکسیلیک و آلکالوئیدها است (Pavia et al., 2008) که حداکثر و حداقل جذب (غلظت) این ترکیب‌ها در غلظت ۵۰ و ۰ (شاهد) مشاهده شد. وجود پیک در (۶۷۷/۴۶-۶۷۵/۱۳) و (۲۹/۱۶-۶۰۱/۶۰۲) بر سانتی‌متر نشان‌دهنده گروه عاملی =CH در مونوترپن‌های دو حلقه‌ای معطر مانند و آلفا-پینن و بتا-پینن و همچنین ساینین است. حداکثر جذب (غلظت) این ترکیب‌ها در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار و حداقل در شاهد مشاهده شد که با نتایج برخی از محققان پیشین مطابقت نشان می‌دهد (Azza et al., 2009). به شکل کلی تیمار ۵۰ میکرومولار سبب افزایش غلظت گروه‌های عاملی نسبت به تیمار شاهد شده و عدم وجود رابطه مستقیم بین افزایش غلظت شوری و افزایش ترکیب‌ها مشخص گردید. وجود پیک ( $\text{cm}^{-1}$ ) ۱۳۵۹/۹۹ در غلظت ۱۰۰ میکرومولار نشان‌دهنده گروه‌های عاملی  $\text{C}\equiv\text{C}$  و  $\text{C}\equiv\text{N}$  است که به ترتیب در ترکیب‌های سیانیدی و نیتریلی وجود دارند که مشخص‌کننده بیوسنتز آنها در این غلظت از شوری بوده و در سایر تیمارها وجود ندارند. البته افزایش میزان این ترکیب‌ها در گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری نیز قبلاً مشاهده شده است (Smith et al., 2003).

تأثیر تیمارهای مختلف شوری بر بیومولکول‌های عصاره برگ گیاه زوفا، به شکل مشخصی بر بیوسنتز نانوذرات نقره توسط عصاره آنها نیز تأثیر داشت. مقایسه نتایج FTIR عصاره خالص هر تیمار با عصاره بیوسنتزی حاصل از همان تیمار، گروه‌های عاملی شرکت‌کننده در فرایند بیوسنتز نانوذرات را مشخص نمود. به شکل کلی پیک‌های نمودارهای بیوسنتزی هر تیمار نسبت به عصاره خالص آن، مقدار عبور بیشتر و در نتیجه غلظت کمتر گروه‌های عاملی موجود در ترکیب‌های آلی مختلف را نشان داد که مشخص‌کننده شرکت این گروه‌های عاملی موجود در ترکیب‌های آلی در بیوسنتز نانوذرات، در نتیجه جدا شدن آنها از محلول و کم شدن غلظت محلول‌های بیوسنتزی نسبت به عصاره خالص هر تیمار است. در بررسی گروه‌های عاملی مورد بررسی، بیشترین تغییر در غلظت ۵۰

- Afshar, P. and Sedaghat, S., 2016. Bio-Synthesis of silver nanoparticles using water extract of *Satureja hortensis* L. and evaluation of the antibacterial properties. *Current Nanoscience*, 12: 90-93.
- Ajitha, B., Reddy, Y.A.K. and Reddy, P.S., 2014. Biogenic nano-scale silver particles by *Tephrosia purpurea* leaf extract and their inborn antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta*, 121: 164-172.
- Arumugam, N., Thulasinathan, B., Pasubathi, R., Thangavel, K., Muthuramalingam, J.B. and Arunachalam, A., 2017. Biogenesis of silver nanoparticles using selected plant leaf extract; characterization and comparative analysis of their antimicrobial activity. *Nanomedicine Journal*, 4: 208-217.
- Asharani, P., Handi, M.P. and Valiyaveetil, S., 2009. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Molecular and Cell Biology*, 10: 1-14.
- Azza, A., El-Din, E., Eman, E., Azziz, S.F., Hendawy, A. and Omer, EA., 2009. Response of *Thymus vulgaris* L. to salt stress and alar (B9) in newly reclaimed soil. *Journal of Applied Sciences Research*, 5: 2165-2170.
- Biener, J., Wittstock, A., Baumann, T.F., Welssmuller, J., Baumer, M. and Hamza, A.V., 2009. Surface chemistry in nanoscale materials. *Materials*, 2: 2404-2428.
- Boisselier, E. and Astruc, D., 2009. Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society Reviews*, 38: 1759-1782.
- Behera, S., Ojha, A., Rout, J. and Nayak, P., 2012. Plant mediated synthesis of silver nanoparticles: Opportunity and challenge. *International Journal of Biology Pharmacy and Allied Sciences*, 1: 1637-1658.
- Boogar, R., 2014. Antibacterial effects of silver nanoparticles produced by *Satureja hortensis* extract on isolated *Bacillus cereus* from soil of sistan plain. *International Journal of Infections Diseases*, 1: 1-1.
- Chang, T.Y., Chen, C.C., Cheng, K.M., Chin, C.Y., Chen, Y.H., Chen, X.A., Sun, J.R., Young, J.J. and Chiueh, T.T., 2017. Trimethyl chitosan-capped silver nanoparticles with positive surface charge: Their catalytic activity and antibacterial spectrum including multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Colloid Surface*, 155: 61-70.
- Das, M. and Smita, S.S., 2018. Biosynthesis of silver nanoparticles using bark extracts of *Butea monosperma* (Lam.) Taub. and study of their antimicrobial activity. *Applied Nanoscience*, 8: 1059-1067.
- Fathiazad, F. and Hamedeyazdan S., 2011. A review on *Hyssopus officinalis* L.: Composition and

احاطه‌کننده آنها ارتباط داد. از سوی دیگر نتایج این پژوهش مشخص کرد با افزایش غلظت تیمارها نانوذرات اندازه کوچکتری یافته و همچنین اشکال زاویه‌دار به آنها اضافه می‌شود که خاصیت ضدباکتریایی بیشتری به دلیل نفوذ بیشتر به سلول باکتری می‌یابد (Kedziora et al., 2018). سازوکار ضدباکتریایی نانوذرات نقره بیوستتزی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌هاست (Chang et al., 2017). از مهمترین سازوکارهای ضدباکتریایی نانوذرات نقره می‌توان به اتصال نانوذرات به دیواره سلولی، ایجاد گسستگی در غشاء پلاسمایی و کاهش ATP سلولی اشاره نمود (Ajitha et al., 2014؛ Hajipour et al., 2012). توقف تنفس باکتریایی (Maliszewska & Sadowski, 2009)، تمایل زیاد یون‌های نقره تولیدی از نانوذرات نقره با بار مثبت با ترکیب‌های دارای بار منفی سلول مانند گوگرد و فسفر (Hajipour et al., 2012) و همچنین پروتئین‌های هیستونی متصل به DNA و به این شکل کاهش توانایی همانندسازی آن (Umashankari et al., 2012) از دیگر سازوکارهای احتمالی وجود خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره است. نتایج این پژوهش تأثیر تیمارهای متفاوت شوری بر کیفیت متابولیت‌های گیاه زوفا و ویژگی‌های نانو ذرات بیوستتز شده توسط آن را مشخص نمود که با توجه به هدف محققان می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد.

## سپاسگزاری

از مساعدت معاون محترم پژوهشی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین برای انجام بخشی از این تحقیق تشکر می‌شود.

## منابع مورد استفاده

- Abdel-Aziz, M.S., Shaheen, M.S., El-Nekeety, A.A. and Abdel-Wahhab, M.A., 2014. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18: 356-363.

- Lidon, F.C. and Teixeira, M.G., 2000. Rice tolerance to excess Mn: implication in the chloroplast lamella synthesis of a novel Mn protein. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 969-978.
- Malinsky, M.D., Kelly, K.L., Schatz, G.C. and Van Duyn, R.P., 2001. Chain length dependence and sensing capabilities of the localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles chemically modified with alkanethiol self-assembled monolayers. *Journal of the American Chemical Society*, 123: 1471-1482.
- Maliszewska, I. and Sadowski, Z., 2009. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles, *Journal of Physics: Conference Series*, 146: 1-6.
- Nahar, K., Aziz, S., Bashar, M.S., Haque, M.D.A. and Al-Reza, S.M.D., 2020. Synthesis and characterization of Silver nanoparticles from *Cinnamomum tamala* leaf extract and its antibacterial potential. *International Journal of Nano Dimension*, 11: 88-98.
- Negrao, S., Schmockel, S.M. and Tester, M., 2017. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*, 119: 1-11.
- Oliveira, H., Barros, A.S., Delgadillo, I., Coimbra, M.A. and Santos, C., 2009. Effects of fungus inoculation and salt stress on physiology and biochemistry of in vitro grapevines: emphasis on sugar composition changes by FT-IR analysis. *Environmental and Experimental Botany*, 65: 1-10.
- Oves, M., Aslam, M., Rauf, M.A., Qayyum, S., Qari, H.A., Khan, M.S., Alam, M.Z., Tabrez, S., Pugazhendhi, A. and Ismail, I.M., 2018. Antimicrobial and anticancer activities of silver nanoparticles synthesized from the root hair extract of *Phoenix dactylifera*. *Materials Science and Engineering: C*, 89: 429-443.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S. and Vyvyan, J.A., 2008. *Introduction to Spectroscopy*. Cengage Learning, 752p.
- Pirtarighat, S., Ghannadnia, M. and Baghshahi, S., 2017. Antimicrobial effects of green synthesized silver nanoparticles using *Melissa officinalis* grown under in vitro condition. *Nanomedicine*, 4: 184-190.
- Pirtarighat, S., Ghannadnia, M. and Baghshahi, S., 2019. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum basilicum* cultured under controlled condition for bactericidal application. *Materials Science and Engineering C*, 98: 250-255.
- Pugazhendhi, A., Edison, T.N.J.I., Karuppusamy, I. and Kathirvel, B., 2018. Inorganic nanoparticles: a potential cancer therapy for human welfare. *International Journal of Pharmaceutics*, 539: 104-111.
- Ramakrishna, A. and Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary biological activities. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5: 1959-1966.
- Gilaki, M., 2010. Biosynthesis of silver nanoparticles using plant extracts. *International Journal of Biological Sciences*, 10: 465-467.
- Gnanadesigan, M., Anand, M., Ravikumar, S., Maruthupandy, M., Vijayakumar, V., Selvam, S., Dhineshkumar, M. and Kumaraguru, A., 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles by using mangrove plant extract and their potential mosquito larvicidal property. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4: 799-803.
- Govindaraju, K., Tamilselvan, S., Kiruthing, V. and Singaravelu, G., 2010. Biogenic silver nanoparticles by *Solanum torvum* and their promising antimicrobial activity. *Journal of Biopesticides*, 3: 394-399.
- Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., Aberasturi, D.J., Larramendi, I.R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W.J. and Mahmoudi, M., 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30: 499-511.
- Hoang, T.M., Moghaddam, L., Williams, B., Khanna, H., Dale, J. and Mundree, S.G., 2015. Development of salinity tolerance in rice by constitutive overexpression of genes involved in the regulation of programmed cell death. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1-14.
- Karray-Bourauoui, N., Rabhi, M., Neffati, M., Baldan, B., Ranieri, A., Marzouk, B., Lachaâl, M. and Smaoui, A., 2009. Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*. *Industrial Crops and Products*, 30: 338-343.
- Kazazi, H., Rezaei, K., Ghotb-Sharif, S.J., Emam-Djomeh, Z. and Yamini, Y., 2007. Supercritical fluid extraction of flavors and fragrances from *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Iran. *Food Chemistry*, 105: 805-811.
- Kedziora, A., Speruda, M., Krzyzewska, E., Rybka, J., Lukowiak, A. and Bugla-Ptoskonska, G., 2018. Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 1-17.
- Khandekar, S.V., Kulkarni, M. and Devarajan, P.V., 2014. Polyaspartic acid functionalized gold nanoparticles for tumor targeted doxorubicin delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10: 143-153.
- Kizil, S., Hasimi, N., Tolan, V. and Karatas, H., 2010. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38: 99-103.



- nanoparticles using aqueous root extract of *Erythrina indica* Lam. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135: 1137-1144.
- Stehfest, K., Boese, M., Kerns, G., Piry, A. and Wilhelm, C., 2004. Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ. *Journal of Plant Physiology*, 161: 151-165.
  - Stehfest, K., Toepel, J. and Wilhelm, C., 2005. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 717-726.
  - Taarit, M.B., Msaada, K., Hosni, K. and Marzouk, B., 2010. Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. *Food Chemistry*, 119: 951-956.
  - Tahir, M., Khushtar, M., Fahad, M. and Rahman, M.D.A., 2018. Phytochemistry and pharmacological profile of traditionally used medicinal plant Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8: 132-140.
  - Umashankari, J., Inbakandan, D., Ajithkumar, T.T. and Balasubramanian, T., 2012. Mangrove plant, *Rhizophora mucronata* L. mediated one pot green synthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity against aquatic pathogens. *Aquatic Biosynthesis*, 8: 1-8.
  - Vanaja, M., Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Rajeshkumar, S., Malarkodi, C. and Annadurai, G., 2013. Phytosynthesis of silver nanoparticles by *Cissus quadrangularis*: Influence of physicochemical factors. *Nanostructure in Chemistry*, 3: 1-8.
  - Zargar, M., Hamid, A.A., Bakar, F.A., Shamsudin, M.N., Shameli, K., Jahanshiri, F. and Farahani F., 2011. Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using *Vitex negundo* L. *Molecules*, 16: 6667-6676.
  - Zheljzkov, V.D., Astatkie, T. and Histov, A.N., 2012. Lavender and hyssop productivity, oil content, and bioactivity as a function of harvest time and drying. *Industrial Crops and Products*, 36: 222-228.
  - metabolites in plants. *Journal of Plant Signaling and Behavior*, 6: 1720-1731.
  - Rai, M.K., Deshmukh, S.D., Ingle A.P. and Gade, A.K., 2012. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Applied Microbiology*, 112: 841-852.
  - Rajesh, W.R., Jaya, R.L., Niranjana, S.K., Vijay, D.M. and Sahebrao, B.K., 2009. Phytosynthesis of silver nanoparticle using *Gliricidia sepium* (Jacq.). *Current Nanoscience*, 5: 117-122.
  - Rakholiya, K. and Chanda, S., 2012. In vitro interaction of certain antimicrobial agents in combination with plant extracts against some pathogenic bacterial strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2: 876-880.
  - Rasaei, I., Ghannadnia, M. and Baghshahi, S., 2018. Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Satureja hortensis* treated with NaCl and its antibacterial properties. *Microporous and Mesoporous Materials*, 264: 240-247.
  - Ravikumar, S., Gnanadesigan, M., Suganthi, P. and Ramalakshmi, A., 2010. Antibacterial potential of chosen mangrove plants against isolated urinary tract infectious bacterial pathogens. *International Journal of Medical Sciences*, 2: 94-99.
  - Roopan, S.M., Madhumitha, G., Rahuman, A.A., Kamaraj, C., Bharathi, A. and Surendra, T., 2013. Low-cost and eco-friendly phyto-synthesis of silver nanoparticles using *Cocos nucifera* coir extract and its larvicidal activity. *Industrial Crops and Products*, 43: 631-635.
  - Sanchez-Lopez, L., Gomes, D., Esteruelas, G., Bonilla, L., Lopez-Machado, A.L., Galindo, R., Cano, A., Espina, M., Ettecheto, M., Camins, A., Silva, A.M., Durazzo, A., Santini, A., Garcia, M.L. and Souto, E.B., 2020. Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: an overview. *Nanomaterials*, 10: 1-39.
  - Smith, A., Johnson, H. and Hall, M., 2003. Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 1: 153-163.
  - Sre, P.R., Reka, M., Poovazhagi, R., Kumar, M.A. and Murugesan, K., 2015. Antibacterial and cytotoxic effect of biologically synthesized silver

## Assesment of antibacterial properties of silver nanoparticles biosynthesized using leaf extract of *Hyssopus officinalis* L. grown under salinity stress

I. Rasae<sup>1</sup>, M. Ghannadnia<sup>2\*</sup> and S. Baghshahi<sup>3</sup>

1- Department of Biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

2\*- Corresponding author, Department of Horticultural Sciences Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran, E-mail: ghannadnia@eng.ikiu.ac.ir

3- Department of Materials Engineering, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

Received: October 2019

Revised: June 2020

Accepted: July 2020

### Abstract

Recent advances in the biological sciences have become particularly important because they are the basis for some related sciences such as agriculture, medicine, pharmacology, biotechnology, and even bionanotechnology. In this study, the effect of different salinity treatments (0, 50, 100, and 150  $\mu\text{M}$ ) on *Hyssopus officinalis* L. and the properties of silver nanoparticles (Ag NPs) biosynthesized using these under-salinity stress plants leaves extract were investigated. The color change of the solutions, surface plasmon resonance at 450 nm and X-ray diffraction pattern confirmed the biosynthesis of Ag NPs. Field emission scanning electron microscopy (FESEM) images showed that most of the nanoparticles were spherical, with few angular shapes visible in 50 and 100  $\mu\text{M}$  treatments. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) results revealed the participant functional groups of the plant extract in the biosynthesis process such as OH, CO, =CH and C=C. The 50  $\mu\text{M}$  salinity treatment had the highest effect on increasing plant metabolites. The smallest nanoparticles (25.3 nm and spherical) were related to the control treatment. Some nanoparticles biosynthesized using the extract obtained from 150  $\mu\text{M}$  salinity treatment were angular in shape with 34.2 nm in size and showed the highest antibacterial properties. Gram-negative bacteria were more sensitive to Ag NPs than the gram-positive ones. These results, following our previous research, revealed for the first time the effect of salinity treatments on the properties of Ag NPs biosynthesized using hyssop extract. The present results can provide an interesting background for Ag NPs biosynthesis that can be a good alternative to antibiotics.

**Keywords:** *Hyssopus officinalis* L., biology, silver nanoparticles, NaCl.