"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد هشتم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۸
(ص ٤٦-۳۳)
مقاله پژوهشی

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 8, No.: 2, Autumn and Winter 2020
(pp: 33-46)
DOI: 10.22034/ijsst.2018.109046.1046
Research Article

اثر نانو ذرات نقره بر شاخص‌های جوانه‌زنی دو رقم پنبه (سپید و ورامین) و هیبرید سینگل کراس۷۰٤ و تأثیر آن بر باکتری بذرزاد *Xanthomonas smithii* عامل بلایت پنبه

زهرا صابر باغبان[۱]، مسعود احمدزاده[۲*]، حمید رضا حدادی[۳]

۱. کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی از دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه تهران
۲. استاد گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران
۳. کارشناس ارشد رشته مکانیزاسیون و ماشین‌های کشاورزی
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۱/۲۹)

چکیده

فناوری نانو به عنوان یک فناوری قدرتمند نوین، توانایی ایجاد انقلاب و تحولات عظیمی را در تأمین موادغذایی و کشاورزی در گستره جهانی دارد. این تحقیق برای بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره (شرکت نانونصب پارس) بر مؤلفه‌های جوانه‌زنی دو رقم پنبه (سپید و ورامین) و هیبرید سینگل کراس۷۰۴ به عنوان یک گیاه تک‌لپه و تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) در باکتری *Xanthomonas smithii* عامل بلایت پنبه، به عنوان باکتری بذرزاد صورت گرفت. تیمارهای مورد استفاده در این آزمایش شامل غلظت‌های ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱٤۰، ۱٦۰، ۳۲۰ و ٦٤۰ میکرولیتر بر لیتر از نانو ذرات نقره بود که اثر آنها بر فاکتورهای رشدی نظیر سرعت جوانه‌زنی بذر، طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و گیاهچه در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. در پنبه رقم سپید، غلظت ۱۲۰ میکرولیتر از نانوذرات نقره موجب بیشترین افزایش در صفات طول ساقه‌چه و گیاهچه شد. در رقم ورامین این افزایش در غلظت ٦۰ میکرولیتر بر لیتر مشاهده شد. در خصوص ذرت، بیشترین افزایش در صفات طول ریشه‌چه، ساقه‌چه وگیاهچه در غلظت ۸۰ و کمترین افزایش در غلظت ۱٦۰ میکرولیتر بر لیتر اتفاق افتاد. در مورد صفت سرعت جوانه‌زنی کمترین مقدار متعلق به غلظت ٦٤۰ میکرولیتر بر لیتر بود. بررسی‌ها نشان دادند MIC نانوذرات‌نقره در مورد باکتری (*X. smithii*) ۰/۵ میکرولیتر/لیتر می‌باشد. همچنین جلوگیری ۱۰۰ درصد از رشد این جدایه باکتریایی(MBC)، در غلظت ۱۵ میکرولیتر/لیتر بود.

کلمات کلیدی: نانوذرات نقره، مؤلفه‌های جوانه‌زنی، MIC، MBC

Effect of nano silver particles on seed germination indices of cotton (Sepid and Varamin) and maize (Single Cross 704) seeds and its effects on *Xanthomonas smithii* a seed-born pathogen of cotton

Z. Saber Baghban[1], M. Ahmadzadeh[2*], H.R. Haddadi[3]

1. Master of Science in Plant Pathology at the Faculty of Agricultural Sciences, University of Tehran
2. Professors of University of Tehran, Department of Plant Protection
3. Master of mechanization and agricultural machines
(Received: Jan. 04, 2017 – Accepted: Apr. 18, 2018)

Abstract

Effect of different concentrations of silver nano particles on germination factors of two cultivars of cotton (Sepid and Varamin) and maize (Single Cross 704) and their effects on (*Xanthomonas smithii*) a seed-born bacteria and the agent of blight disease on cotton in laboratory condition Nanotechnology is a powerful new technology, that can creates a huge revolution in food supply and agriculture in global scope. In this research the effects of different concentrations of silver nano particles were studied on germination of cotton (Sepid and Varamin) and maize (Single Cross 704) seeds. Also, both MIC, MBC of this material on *Xanthomonas smithii* as a seed-born bacteria of cotton was determined. The treatments used at this experiment were different concentrations of silver nano particles at 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 320, 640 µl/l. Their effects were studied on seed germination rate, root, shoot and seedling length. The greatest amount of shoot and seedling length in Sepid was recorded at 120 µl/l. It was occurred at 60 µl/l for Varamin cultivar. Referring to maize cultivar, root, shoot and seedling length parameters showed the highest and the lowest increase at 80 and 160 µl/l, respectively. For germination rate, the lowest amount was observed at 640 µl/l. In this study the MIC of (*X. smithii)* was determined to be 0.5 µl/l and also, the 100% inhibiting concentration of nano particles was measured to be 15 µl/l.

Key words: Silver nano particles, Germination factors, MIC, MBC

* Email: ahmadz@ut.ac.ir

مقدمه

با پیشرفت روزافزون فناوری نانو، افزایش نانوذرات در محیط امری انکارناپذیر است و تأثیر قابل توجهی بر صنعت، جامعه و محیط دارد. پیش‌بینی می‌شود تأثیر فناوری نانو فراتر از انقلاب صنعتی باشد (Nel et al., 2006; Zhang and Karn, 2005).

نتایج برخی تحقیقات محدودی که بر روی سمّیت نانوذرات در گیاهان انجام شده است، حاکی از اختلال در جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهان است (Salehi and Tamakni, 2009). این سمّیت با دیگر تنش‌ها می‌تواند تأثیر مخرب بیشتری را سبب شود. نانوسید، آنتی باکتریال قوی که دارای پتانسیل‌هایی برای کاربرد در بخش کشاورزی می‌باشد، باعث افزایش محدودیت جوانه‌زنی گندم در شرایط تنش خشکی می‌شود.

سرجین و کزهونیکووا (Seregin and Kozhevnikora, 2005) گزارش کردند که جوانه‌زنی ذرت، به دلیل وجود پوسته بذر، تاحدودی نسبت به فلزات، مقاوم است و کمتر تحت تاثیر سمّیت ناشی از فلزات سنگین قرار می‌گیرد. اگرچه کادمیوم تنها در پوسته بذر مشاهده شد، اما بازدارنده قوی در جوانه‌زنی بود. همچنین سلنیوم به طور قابل توجهی، خروج رادیکل ریشه و جوانه‌زنی بذر را کاهش داد. آزمایشات نشان داد که نانوتیتانیوم می‌تواند بطور معنی‌داری، فتوسنتز را افزایش دهد و باعث بهبود رشد در اسفناج شود. این نانو ذره باعث افزایش فعالیت نیترات رداکتاز، گلوتامات دهیدروژنار، گلوتامین سین تاز و گلوتامیک-پیرورویک ترانس میناز در طی مراحل رشدی می‌شود. همچنین جذب نیتروژن معدنی که در ترکیبات نیتروژن‌دار (مثل پروتئین‌ها و کلروفیل) جای می‌گیرند، را افزایش می‌دهد (Yang et al., 2006).

نانو ذرات فلزی مانند نقره به عنوان یکی از پر کاربردترین گزینه‌های ضد میکروبی در طی سال‌های اخیر پیشنهاد شده‌اندکه دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضد میکروبی بر روی هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین باکتری‌های مقاوم شده در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات فلزی به نظر می‌رسد که ناشی از همکنش‌های یونی می‌باشد (Sheely et al., 2015). نانو ذرات نقره دیواره سلولی باکتری *Escherichia coli* را تخریب و سوراخ نموده سپس در دیواره تجمع یافته و بدین ترتیب سبب افزایش قابلیت نفوذپذیری دیواره شده و در نهایت، منجر به مرگ سلول می‌شود (Soni and Bondi, 2004). نانو ذرات آهن و مس با پراکسیدهای موجود در محیط که به صورت رادیکال‌های آزاد بوده و سمیت زیادی برای میکروارگانیزم‌ها دارند واکنش داده و رادیکال‌ها را به صورت غیرفعال در می‌آورند (Saliba et al., 2006). داودی (Davoudi, 2008) طی تحقیقی اثر نانو ذرات نقره را در کاهش جمعیت اپی‌فیتی باکتری *Erwinia amylovora* و مدیریت بیماری آتشک گلابی مورد بررسی قرار داد. ترکیب آنتی‌باکتریال نانو سیلور با دوزهای ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرولیتر برلیتر و نیز اکسی‌کلرورمس با غلظت یک در هزار و تیمار شاهد (آب‌پاشی) در پنج مرحله محلول‌پاشی شامل مراحل قبل از گلدهی، ۲۰٪، ۴۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ گلدهی برای جلوگیری از بلایت شکوفه و کاهش جمعیت اپی‌فیتی باکتری در سطح گل‌ها به کار برده شد. داده‌های حاصل که بیانگر جمعیت باکتری‌های اپی‌فیت در هر تیمار می‌باشند، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که تیمار نانو ذرات نقره با دوز ۸۰ میکرولیتر بر لیتر بیشترین تأثیر را در پیشگیری از آلودگی و نیز کاهش جمعیت باکتری‌های اپی‌فیت سطح شکوفه داشت. پس از آن تیمارهای نانو سیلور با دوز ۶۰ میکرولیتر بر لیتر و اکسی‌کلرورمس با دوز یک در هزار به طور مشترک در یک گروه و تیمارهای نانو سیلور با دوز ۴۰ و ۲۰ میکرولیتر بر لیتر و شاهد در گروه‌های مجزای دیگر قرار گرفتند.

مکانیزم فعالیت ضد باکتریایی نقره و نانو ذرات نقره هنوز به طور کامل شناسایی نشده است. مطالعات انجام

شده پیشنهاد می‌کنند که نانو ذرات نقره ممکن است، به سطح غشای سلول چسبیده و در خصوصیات تراوائی غشا ایجاد اختلال کرده و نیز سبب افزایش خاصیت نفوذپذیری غشا شوند (Feng et al., 2000)، اینگونه بیان شده است که علت اتصال به غشای باکتری‌ها، وجود پروتئین‌های حاوی گوگرد می‌باشد که این امر سبب تغییر در مورفولوژی و نفوذپذیری غشا و تأثیر در زنجیره تنفسی و تقسیم سلولی شده و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌گردد. در این مکانیزم نانو ذرات نقره فلزی به مرور زمان یون‌های نقره از خود ساطع می‌کنند. این یون‌ها طی واکنش جانشینی، باندهای SH- را در غشای سلولی میکروارگانیزم‌ها به باندهای Sag- تبدیل می‌کنند. این نانو ذرات نه تنها با سطح غشا وارد واکنش می‌شوند، بلکه ممکن است منافذی به سمت داخل سلول برای نفوذ ایجاد نمایند (Morenes et al., 2005). نانو ذرات نقره از طریق واکنش با گروه تیول پروتئین‌ها سبب ایجاد اختلال در عملکرد تنفسی سلول و فرایندهای مربوط به انتقال مواد و سیگنال‌ها و نیز سبب تولید انواع اکسیژن فعال می‌شوند (Matsumura et al., 2003).

این تحقیق به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره بر مؤلفه‌های جوانه‌زنی دو رقم پنبه (سپید و ورامین) و تعیین میزان MIC (حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری) و MBC (حداقل غلظت باکتری‌کشی) در باکتری عامل بلایت پنبه (*Xanthomonas smithii*)، به عنوان باکتری بذرزاد و نقش کنترلی این ترکیب در بیماریزایی این باکتری صورت گرفت. این باکتری علاوه براینکه روی شاخص‌های جوانه‌زنی موثر است، موجب بروز بیماری در مراحل مختلف رشد گیاه تا مرحله تشکیل غوزه می‌شود. باتوجه به اینکه گیاه پنبه مستقیما مورد استفاده انسان قرار نمی‌گیرد، استفاده از نانوذرات نقره می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب مطرح باشد. درضمن، باتوجه به دولپه‌بودن گیاه پنبه، صرفاً برای مقایسه از هیبرید سینگل کراس۷۰۴ به عنوان گیاهی تک‌لپه استفاده شد.

مواد و روش

بررسی اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر فاکتورهای رشدی دو رقم گیاه پنبه (سپید و ورامین) و هیبرید سینگل کراس۷۰٤ در شرایط آزمایشگاه

در این آزمایش از غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰، ۳۲۰ و ۶۴۰ میکرولیتر بر لیتر برای آغشته‌سازی بذور استفاده شد. در این مرحله علاوه بر دو رقم پنبه سپید و ورامین (تهیه شده از بخش تحقیقات پنبه و گیاهان لیفی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران- ورامین) که به منظور مقایسه نتایج میان ارقام مختلف یک گیاه دولپه انتخاب شدند، از هیبرید سینگل کراس۷۰۴ (تهیه‌شده از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال وبذر) نیز برای مقایسه نتایج، میان گیاهان تک‌لپه و دولپه استفاده شد. پس از آماده‌سازی بذور و تهیه غلظت‌های مورد نظر از نانوذرات نقره (تهیه‌شده از شرکت نانونصب پارس)، برای هر کدام از تیمارهای آزمایشی، ۱۵۰ عدد بذر به مدت ۱ دقیقه داخل محلول مربوط به غلظت‌های مورد نظر قرار داده شد. پس از یک دقیقه بذور از داخل محلول خارج و در شرایط استریل به منظور خشک‌شدن، قرار داده شدند. سپس بذور به تعداد ۲۵ عدد بر روی حوله‌های کاغذی در ابعاد ۱۰×۱۵ سانتیمتر با فواصل مناسب چیده شده، حوله کاغذی به حالت ساندویچ لوله و تمامی نمونه‌ها با ۱۵ میلی لیتر آب مقطر استریل مرطوب و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی به مدت ۷ روز قرار داده شدند و در فواصل زمانی مناسب اقدام به مرطوب نمودن نمونه‌ها با حجم مساوی از آب مقطر استریل شد. شمارش بذور جوانه زده به صورت روزانه و در ابتدا هر ۱۲ ساعت اقدام به شمارش بذور جوانه زده به منظور تعیین درصد و سرعت جوانه‌زنی در هر تیمار می شد، که تا روزهای تعیین شده براساس دستورالعمل ISTA (۲۰۱۰)، برای هر بذر، ادامه داشت. ملاک جوانه‌زنی، خروج ۱ میلی‌متر ریشه چه برای بذر کوچک و ۲ میلی‌متر ریشه چه برای بذرهای درشت بود. در پایان روزهای تعیین شده، یعنی

پس از ۷ روز اقدام به اندازه‌گیری صفاتی نظیر طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و طول گیاهچه شد و از هر تکرار ۱۰ گیاهچه به تصادف انتخاب شدند.

سنجش MIC (حداقل غلظت بازدارندگی) نانوذرات نقره روی باکتری *X. smithii*

باکتری *X. smithii* جداسازی‌شده از مزارع پنبه ورامین از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهیه شد. تعیین MIC به روش میکروتیتر پلیت انجام شد (Shahrokh and Emtiazi, 2009). غلظت‌های مورد استفاده شامل ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میکرولیتر بر لیتر تهیه شدند. رقیق‌سازی محلول نانوذرات نقره با استفاده از آب مقطر استریل، باpH، ۷ و در لوله‌های فالکون استریل با حجم ۵۰ میلی لیتر انجام شد. سپس از باکتری ۲۴ ساعت کشت شده روی محیط NA، به میزان یک لوپ به داخل ظروف ارلن حاوی ۵۰ سی‌سی محیط کشت NB، در شرایط کاملاً استریل منتقل و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و با ۱۳۵ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، میزان جذب (OD) هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و OD هر یک از نمونه‌ها بر روی ۰/۵ تنظیم گردید.

در هر یک از چاهک‌های میکروپلیت، ۸۰ میکرولیتر محیط کشت NB استریل ریخته شد و سپس ۴۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف محلول نانوذرات نقره به چاهک‌های مورد نظر اضافه و در مرحله آخر نیز ۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها با OD، ۰/۵ برای رسیدن به حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شدند. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت، OD هر یک از چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الایزاریدر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش MBC (حداقل غلظت باکتری‌کشی) نانوذرات نقره روی جدایه باکتریایی (*X. smithii*)

تعیین حداقل غلظتی از نانوذرات نقره که موجب مرگ باکتری می‌شود، براساس روش شاهرخ و امتیازی (2009) روی پلیت آگار انجام گرفت. پس از آماده‌سازی محیط کشت NA حاوی غلظت‌های ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ میکرولیتر بر لیتر از نانوذرات نقره، از کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی محیط NA یک لوپ به لوله حاوی ده سی‌سی آب مقطر استریل منتقل شد و به مدت پنج دقیقه ورتکس گردید، OD آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر روی ۰/۵ تنظیم، سپس سری رقت هفتم از باکتری تهیه گردید. از سری رقت هفتم باکتری، یکصد میکرولیتر با استفاده از سمپلر بر روی محیط جامد NA منتقل و بوسیله میله شیشه‌ای L شکل بر روی محیط پخش گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

به دلیل اثر نانوذرات نقره بر سرعت رشد کلونی‌های باکتریایی و عدم رشد باکتری‌ها پس از ۲۴ ساعت کلونی‌ها پس از ۴۰ ساعت مورد شمارش قرار گرفتند.

محاسبات آماری

کلیه آزمایشات انجام شده در قالب طرح بلوکهای کاملاً تصادفی با حداقل ۴ تکرار انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به روش حداقل تفاوت معنی‌دار ($p<0.05$) با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 انجام گرفت. نرمال بودن پراکنش داده‌ها نیز قبل از آنالیز آماری با نرم‌افزار MINITAB مورد آزمایش قرار گرفت. همچنین برای مقایسه میانگین اثرات متقابل در آزمایشات فاکتوریل از نرم‌افزار MSTATC استفاده شد.

نتایج و بحث

اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر فاکتورهای رشدی دو رقم گیاه پنبه (سپید و ورامین) و هیبرید سینگل کراس۷۰۴

آزمایش با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰، ۳۲۰ و ۶۴۰ میکرولیتر بر لیتر از نانوذرات نقره انجام شد، که نتایج آن به شرح زیر است:

با توجه به بررسی کلیه جداول تجزیه واریانس مربوط به فاکتورهای رشدی مورد مطالعه، اثر متقابل دو فاکتور اصلی در تمام صفات در سطح ۰/۰۱ درصد معنی‌دار شده است (جدول۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر جوانه‌زنی و برخی شاخص‌های رشد دو رقم پنبه (سپید و ورامین) و هیبرید سینگل کراس۷۰۴در شرایط آزمایشگاه

Table 1- Analysis of variance of the effect of different concentrations of nano silver particles on seed germinatin and some growth indices of two cultivars of cotton (Sepid and Varamin) and maize (Single Cross 704) in laboratory condition

		میانگین مربعات MS			
منابع تغییرات SOV	درجه آزادی DF	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	طول ریشه‌چه Root length	طول ساقه چه Shoot length	طول گیاهچه Seedling length
تکرار Replication	5	1.004	0.790	0.548	1.3219
رقم Cultivar	2	1052.30**	844.10**	1666.909**	4816.26**
غلظت concentration	10	13.432**	14.87**	19.829**	49.40**
رقم × غلظت Cultivar × concentration	20	8.922**	9.500**	20.790**	44.36**
اشتباه آزمایشی Error	160	1.83	1.496	0.911	2.13
ضریب تغییرات CV		6.37%			

*و** به ترتیب معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

*and ** significant at 5 and 1 % level of probability, respectively.

اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر سرعت جوانه‌زنی بذور، در دو رقم گیاه پنبه (سپید و ورامین) و هیبرید سینگل کراس۷۰٤

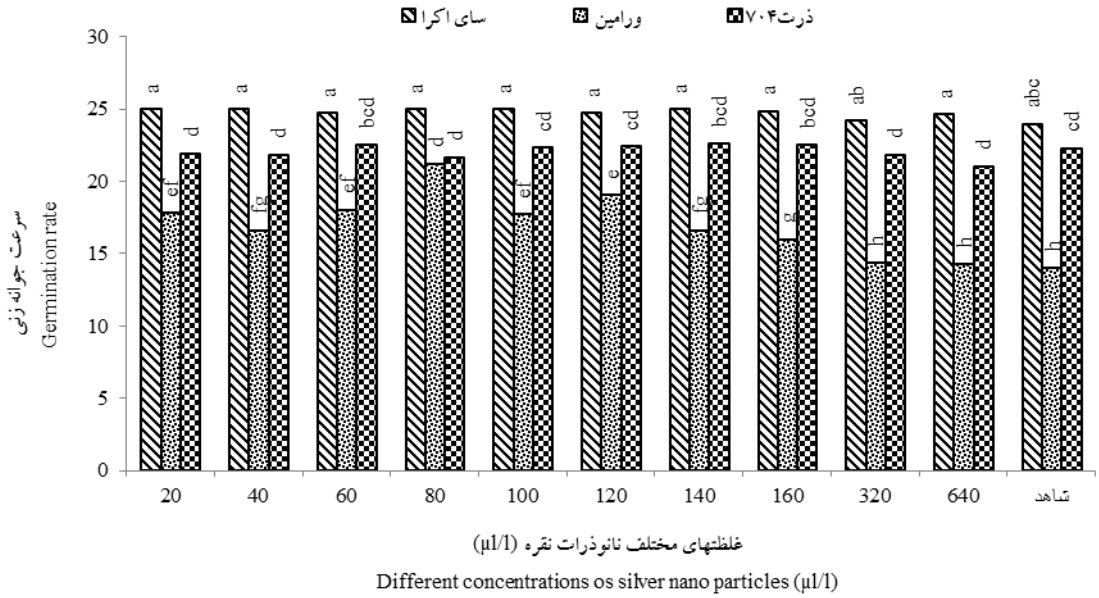
همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، در تمامی غلظت‌های آزمایش شده روی رقم سپید سرعت جوانه‌زنی نسبت به شاهد بیشتر بوده، اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و شاهد مشاهده نمی‌شود، کمترین مقادیر سرعت جوانه‌زنی مربوط به غلظت‌های ۳۲۰ و ۶۴۰ میکرولیتر بر لیتر بود و این در حالیست که تا غلظت ۳۲۰ میکرولیتر بر لیتر کاهشی در مقادیر سرعت جوانه‌زنی بذور رقم سپید دیده نشد.

کمترین مقادیر سرعت جوانه‌زنی در رقم ورامین مربوط به تیمارهای ۶۴۰،۳۲۰ میکرولیتر بر لیتر و شاهد بود، که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشتند. سرعت جوانه‌زنی در سایر تیمارها نسبت به شاهد بیشتر بود. در این رقم بیشترین سرعت جوانه‌زنی در غلظت ۸۰ میکرولیتر بر لیتر مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تمام تیمارها و شاهد دارد.

در هیبرید سینگل کراس۷۰۴هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و شاهد، مشاهده نشد. کمترین مقدار سرعت جوانه‌زنی مربوط به تیمار ۶۴۰ میکرولیتر بر لیتر و بیشترین میزان نیز مربوط به غلظت ۱۴۰ میکرولیتر بر لیتر بود. در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان این‌گونه بیان کرد که غلظت ۶۴۰ میکرولیتر بر لیتر در کلیه ارقام اثر منفی بر سرعت جوانه‌زنی گذاشته است (جدول ۱). ساسانی و همکاران (Sasani et al., 2009) نیز طی تحقیقاتی اثرات مثبتی از نانوذرات نقره را بر درصد جوانه‌زنی بذور نشان داده‌اند، که بهترین درصد جوانه‌زنی در غلظت‌های ۶۰،۴۰

و ۸۰ میکرولیتر بر لیتر به ترتیب در گیاهان ارزن دم روباهی، گندم و ماشک گل خوشه‌ای بوده است.

لو و همکاران (Lu et al., 2002) نیز گزارشاتی از تأثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و اکسید سیلیسیوم بر افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در گیاه سویا گزارش کرده‌اند که به نوبه خود، موجب افزایش جذب آب و کود شده، منجر به بهبود جوانه‌زنی بذور می‌شود.



شکل ۱ – اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر سرعت جوانه‌زنی بذور، در دو رقم پنبه (سپید و ورامین) و یک هیبرید سینگل کراس۷۰۴، در شرایط آزمایشگاه

Figure 1- Effect of different concentrations of nano silver particles on germination rate of cotton (Sepid and Varamin) and maize (Single Cross 704) seeds in laboratory condition

اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر طول ریشه‌چه، در دو رقم پنبه (سپید و ورامین) و هیبرید سینگل کراس۷۰٤

همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، در هر دو رقم پنبه سپید و ورامین کمترین مقدار طول ریشه‌چه مربوط به نمونه شاهد بوده و اختلاف معنی‌داری بین کلیه تیمارها با نمونه شاهد مشاهده شده است. بیشترین طول ریشه‌چه در رقم ورامین مربوط به غلظت یکصد میکرولیتر بر لیتر بوده است، که بین آن با برخی تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در مورد رقم سپید بیشترین میزان مربوط به غلظت ۶۴۰ میکرولیتر بر لیتر بوده، که بین این تیمار با هیچ یک از تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌دار نبود.

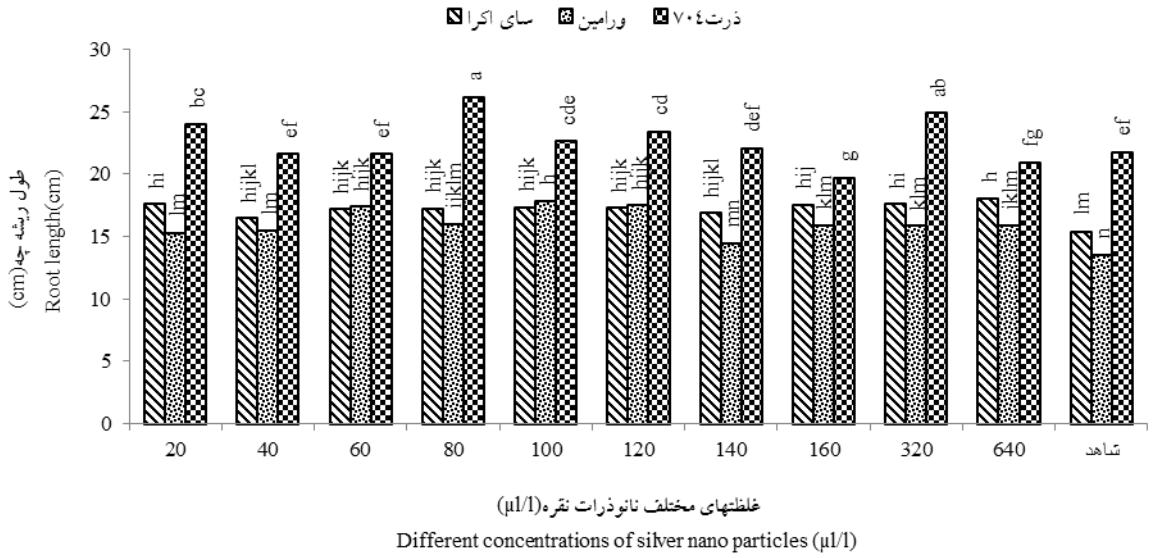
در مورد ذرت، بیشترین مقدار طول ریشه‌چه مربوط به غلظت هشتاد میکرولیتر بر لیتر بوده است و اختلاف معنی‌داری بین این تیمار با سایر تیمارها و نمونه شاهد وجود داشت و کمترین میزان در غلظت ۱۶۰ میکرولیتر بر لیتر بوده که بین این تیمار و نمونه شاهد نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱).

اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر طول ساقه‌چه، در دو رقم پنبه (سپید و ورامین) و هیبرید سینگل کراس۷۰٤

در شکل ۳ اختلاف معنی‌داری بین ارقام پنبه و ذرت (هیبرید سینگل کراس۷۰۴) مشاهده شده است. در ذرت بیشترین طول ساقه‌چه مربوط به غلظت هشتاد میکرولیتر بر لیتر بود، که اختلاف معنی‌داری با شاهد ندارد و کمترین میزان در غلظت ۱۶۰ میکرولیتر بر لیتر مشاهده شده، که

با کلیه تیمارها و نمونه شاهد، اختلاف معنی‌داری دارد.

بین ارقام سپید و ورامین در اکثر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. در رقم سپید نیز بین اکثریت تیمارها اختلاف معنی‌دار نبوده که البته در تمام موارد طول ساقه‌چه از شاهد بیشتر بوده است.



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر طول ریشه‌چه، در دو رقم پنبه (سپید و ورامین) و هیبرید سینگل کراس۷۰۴، در شرایط آزمایشگاه

Figure 2- Effect of different concentrations of nano silver particles on root length of cotton (Sepid and Varamin) and maize (Single Cross 704) in laboratory condition

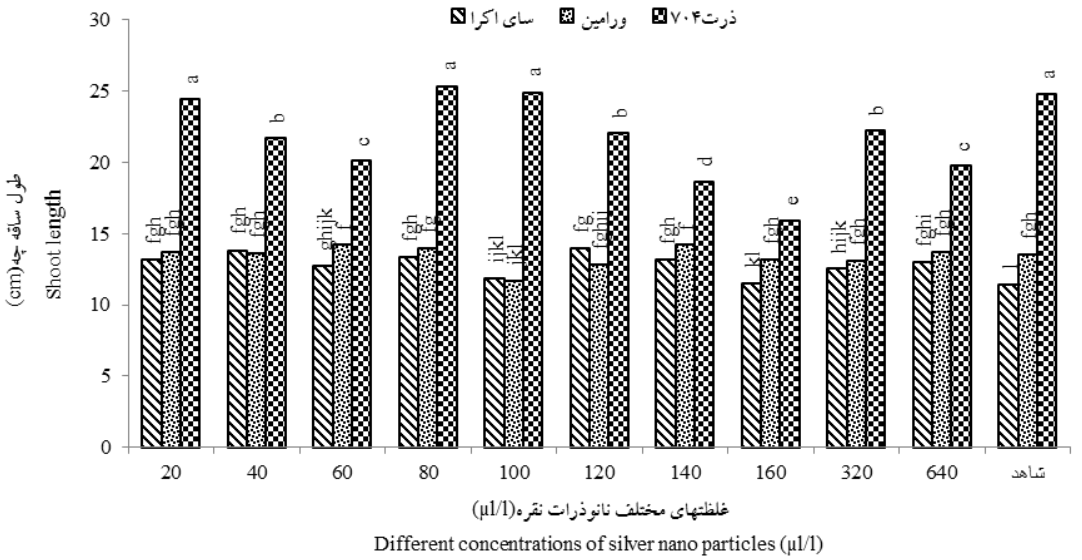
کمترین میزان این صفت در این رقم متعلق به تیمار ۱۶۰ میکرولیتر بر لیتر بوده، که با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت و بیشترین میزان این صفت در غلظت ۱۲۰ میکرولیتر بر لیتر مشاهده شده است، که اختلاف معنی‌داری با شاهد دارد. در رقم ورامین بین نمونه شاهد و هیچ یک از تیمارها به جز غلظت یکصد میکرولیتر بر لیتر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و کمترین میزان طول ساقه‌چه نیز متعلق به همین غلظت بود. بیشترین مقادیر طول ساقه‌چه نیز مربوط به غلظت‌های ۶۰ و ۱۴۰ میکرولیتر بر لیتر بودند (جدول ۱).

اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر طول گیاهچه، در دو رقم پنبه (سپید و ورامین) و هیبرید سینگل کراس۷۰٤

در مورد صفت طول گیاهچه، همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، با وجود افزایش غلظت نانوذرات نقره در بین اکثریت تیمارهای دو رقم سپید و ورامین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است و این در حالیست که، مقادیر مربوط به کلیه تیمارهای هر دو رقم، از نمونه‌های شاهدشان بیشتر بوده و شاهد در هر دو رقم با کلیه تیمارها اختلاف معنی‌دار داشته است. در مورد ذرت بیشترین مقدار متعلق به غلظت ۸۰ میکرولیتر بر لیتر بوده که از شاهد بیشتر و اختلاف معنی‌داری با شاهد و کلیه تیمارها دارد و کمترین مقدار نیز مربوط به تیمار ۱۶۰ میکرولیتر بر لیتر است، که بین آن با شاهد و کلیه تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱).

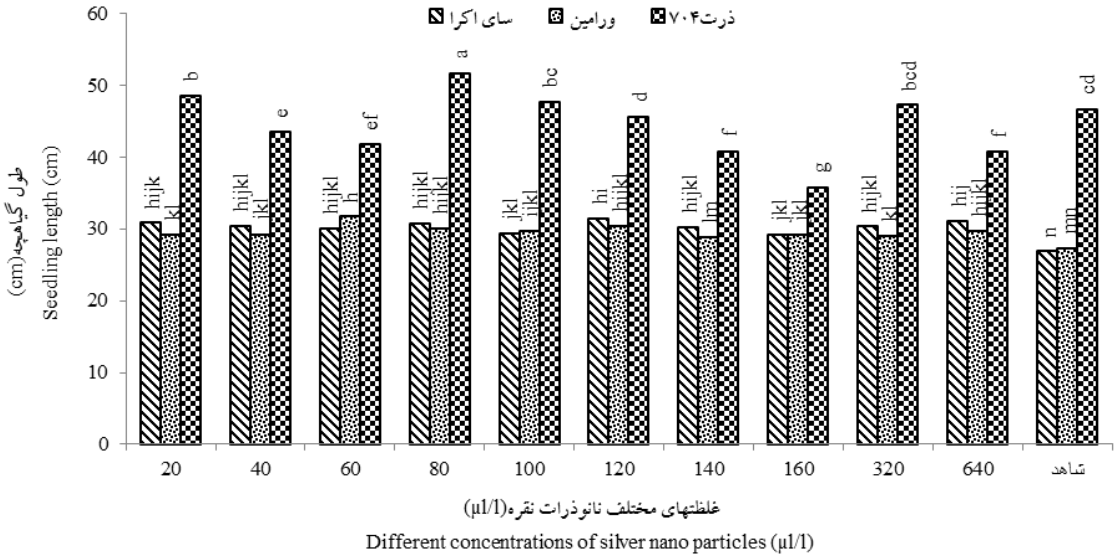
در یک جمع‌بندی کلی از مقایسه نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده در زمینه اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره روی فاکتورهای رشدی دو رقم ورامین و سپید در شرایط آزمایشگاه می‌توان اینگونه بیان کرد، در تمام صفات مورد بررسی از قبیل سرعت جوانه‌زنی، طول

ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، کمترین مقادیر متعلق به نمونه‌های شاهد بوده است. به عبارت دیگر می‌توان اینگونه بیان کرد که غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره اثر منفی بر روی این صفات رشدی نداشته است.که با نتایج اشرفی و همکاران (Ashrafi et al., 2010) تطابق دارد.



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر طول ساقه‌چه، در دو رقم پنبه (سپید و ورامین) و هیبرید سینگل کراس۷۰۴، در شرایط آزمایشگاه

Figure 3- Effect of different concentrations of nano silver particles on shoot length of cotton (Sepid and Varamin) and maize (Single Cross 704) in laboratory condition



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر طول گیاهچه، در دو رقم پنبه (سپید و ورامین) و هیبرید سینگل کراس۷۰۴، در شرایط آزمایشگاه

Figure 4- Effect of different concentrations of nano silver particles on seedling length of cotton (Sepid and Varamin) and maize (Single Cross 704) in laboratory condition

در رقم سپید بیشترین مقادیر در صفات طول ساقه‌چه و طول گیاهچه مربوط به غلظت ۱۲۰ میکرولیتر بر لیتر و در صفت طول ریشه‌چه بیشترین مقدار متعلق به غلظت ۶۴۰ میکرولیتر بر لیتر بوده‌است.

در رقم ورامین در صفات طول ساقه‌چه و طول گیاهچه بیشترین مقادیر مربوط به غلظت شصت میکرولیتر بر لیتر بوده است، به علاوه در صفت طول ساقه چه علاوه بر این غلظت، در ۱۴۰ میکرولیتر بر لیتر نیز بیشترین طول مشاهده شده است. در صفات سرعت جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه نیز بیشترین میزان متعلق به غلظت‌های هشتاد و یکصد میکرولیتر بر لیتر بوده است.

در صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و طول گیاهچه ذرت، بیشترین و کمترین مقادیر به ترتیب متعلق به غلظت‌های ۸۰ و ۱۶۰ میکرولیتر بر لیتر و در مورد صفت سرعت جوانه‌زنی کمترین مقدار متعلق به غلظت ۶۴۰ میکرولیتر بر لیتر و بیشترین مقدار در غلظت ۱۴۰ میکرولیتر بر لیتر بوده است.

با مقایسه بهترین غلظت‌ها در ارقام به خوبی می‌توان به این نکته رسید که در هر رقم وضعیت تأثیر غلظت‌های مختلف بر روی صفات، متفاوت‌می‌باشد.در تحقیق انجام شده توسط لین و زینگ (Lin and Xing, 2007) که بر روی شش گونه گیاهی اثر چندین نوع از نانوذرات مختلف را مورد آزمایش قرار دادند، نتایج به خوبی نشان دادند که غلظتی خاص، از نانو ذره‌ای معین بر روی گونه‌های مختلف گیاهی اثرات متفاوتی را اعمال می‌کنند و تفاوت‌های زیادی بین اثر نانوذرات بر روی گیاهان مختلف وجود دارد. در مطالعه دیگری نیز که توسط ساسانی و همکاران (Sasani et al., 2009) انجام شده است نتایج حاصل به خوبی بیانگر اثر متفاوت غلظتی خاص از نانوذرات بر روی صفتی معین، در بین چندین گونه گیاهی می‌باشند، به طوریکه بیشترین میزان درصد جوانه‌زنی در گیاه گندم در غلظت شصت میکرولیتر بر لیتر، کمترین میزان درصد جوانه‌زنی در گیاه کلزا در غلظت هشتاد میکرولیتر بر لیتر، در ارزن دم‌روباهی بیشترین میزان مربوط به غلظت چهل میکرولیتر بر لیتر و در ماشک گل‌خوشه‌ای بیشترین و کمترین میزان به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های هشتاد و چهل میکرولیتر بر لیتر بودند.

همانطور که ذکر شد در دو رقم سپید و ورامین، کمترین مقادیر در تمام صفات مربوط به نمونه شاهد بوده است و این نشان می‌دهد که نانوذرات نقره روی شاخصه‌های رشدی این دو رقم در غلظت‌های مورد استفاده تأثیر منفی نداشته است، کما اینکه در بین تیمارها تفاوت‌های آماری به لحاظ اثر بر روی صفات مورد بررسی وجود داشته است و تأثیر افزایش و یا کاهش غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر صفات مورد بررسی از روند خاص و منظمی تبعیت نکرده است. برخی تحقیقات انجام شده در این زمینه نیز تائید کننده نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌باشند که در قسمت ذیل به برخی از آنها اشاره شده است.

تأثیر نانوذرات نقره در رشد گیاهچه و جوانه‌زنی بذور گندم تحت تنش شوری توسط صالحی و همکاران (Salehi et al., 2009) مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که نانوذرات نقره در غلظت ۵۰ میکرولیتر بر لیتر و در شرایط بدون تنش شوری بر رشد ریشه‌چه و گیاهچه اثر مثبت داشته است. جنسون (Jenson, 2002) از طول ریشه‌چه در گیاهان به عنوان شاخصی برای قوه نامیه بذر استفاده کرده و بیان کرده است که گیاهچه‌های دارای طول ریشه‌چه بیشتر، می‌توانند استقرار بهتری در مزرعه داشته باشند. اعظم و آلن (Azam and Allan, 1976) نیز بیان کردند که همبستگی معنی‌داری بین طول کلئوپتیل، ارتفاع گیاهچه و استقرار گیاه گندم در مزرعه وجود دارد. بنابراین طول ریشه‌چه به عنوان یک شاخص مهم برای استقرار اولیه گیاه است و تأثیر نانوذرات نقره بر این صفت موجب استقرار بهتر گیاه، در مراحل اولیه رشد در محیط‌های بدون تنش می‌شود. ساسانی و همکاران (Sasani et al., 2009) نیز طی تحقیقاتی اثرات مثبتی از نانوذرات نقره را بر درصد جوانه‌زنی بذور نشان داده‌اند، که شامل دریافت بهترین درصد جوانه‌زنی در غلظت‌های چهل، شصت و هشتاد میکرولیتر بر لیتر به ترتیب در

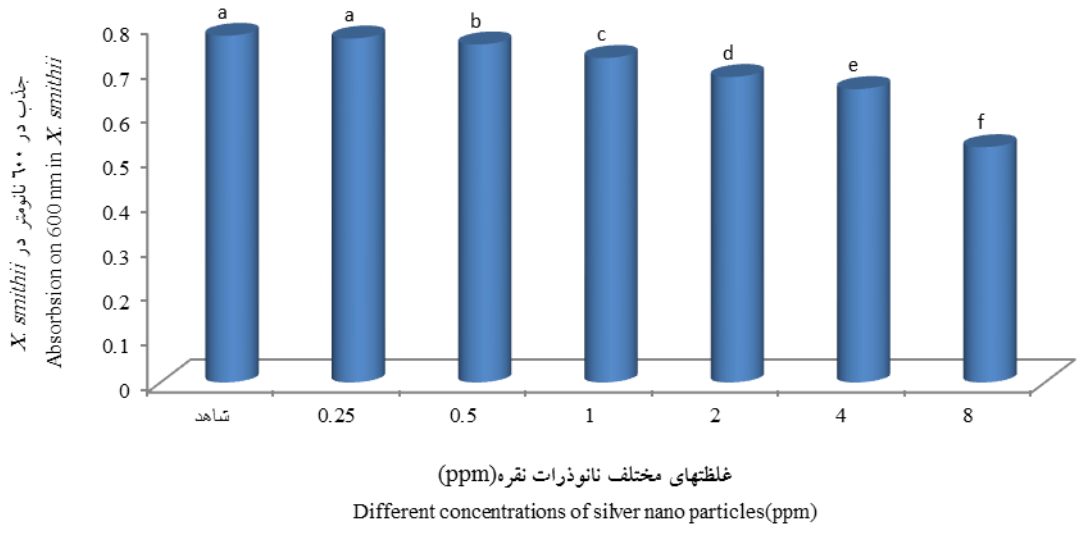
گیاهان ارزن دم روباهی، گندم و ماشک گل خوشه‌ای بوده است. نانوذرات نقره مطابق مطالعه مک ویلیام و همکاران (Mac William et al., 1970) افزایش محتویات آب سلولی باعث تحریک در سرعت جوانه‌زنی در مراحل بعدی تمایز و رشد گیاهچه می‌گردد.

اما در مورد ذرت در دو غلظت ۶۴۰ و ۱۶۰ میکرولیتر بر لیتر در صفات مختلف نسبت به شاهد کاهش مشاهده شده است و این نشان از اثر سمّی و منفی نانوذرات بر روی این گیاه در این غلظت‌ها دارد. لین و زینگ (Lin and Xing, 2007) بیان کرده‌اند که اگرچه سازوکار نانوسمّیت ناشناخته است، اما این موضوع شدیداً به ترکیبات شیمیائی، ساختار شیمیائی، اندازه و سطح نانوذرات وابسته است، سمّیت نانوذرات به دو عمل متفاوت نسبت داده می‌شود: ۱- سمّیت شیمیائی بر مبنای ترکیب شیمیائی، مثلاً رهاسازی سم یا یون‌ها ۲- تنش یا تحریک ایجاد شده بوسیله سطح، اندازه یا شکل ذرات.

از سوی دیگر پوشش بذر نقش مهمی در محافظت از جنین در برابر عوامل خارجی دارد، اگرچه آلاینده‌ها آشکارا اثر بازدارنده روی رشد ریشه‌چه دارند، اما اگر به درون پوشش بذر وارد نشوند ممکن است نتوانند بر جوانه‌زنی اثر بگذارند. از آنجا که ریشه‌چه پس از نفوذپذیری پوسته بذر مستقیماً با نانوذرات تماس پیدا می‌کنند، بنابراین طویل شدن ریشه گیاهان حساس، واکنشی وابسته به دوز خواهد داشت، زیرا بافت ریشه‌چه، اولین بافت هدف در برابر غلظت‌های زیاد آلاینده‌ها بوده و بدین ترتیب علائم سمّیت در ریشه‌ها نسبت به اندام‌های هوایی بیشتر دیده می‌شود.

تعیین MIC نانوذرات نقره در باکتری *X. smithii* در شرایط آزمایشگاه

طی بررسیهای انجام شده اثر متقابل دو فاکتور اصلی باکتری و غلظت در سطح ۰/۰۱ درصد معنی‌دار شده است با توجه به آنچه که در شکل ۵ نشان داده شده است، با افزایش غلظت نانوذرات نقره، کاهش معنی‌داری در میزان جذب، در طول موج ششصد نانومتر نسبت به نمونه شاهد مشاهده شده است. بیشترین اثر منفی بر میزان جذب باکتری‌ها در غلظت هشت میکرولیتر بر لیتر بوده است. نکته جالب توجه این است که غلظت ۰/۲۵ میکرولیتر بر لیتر تأثیر معنی‌داری بر *X. smithii* در مقایسه با شاهد نداشته است. در نهایت نتایج حاصله نشان دادند که MIC (حداقل غلظت بازدارندگی) نانوذرات نقره در مورد باکتری، نیم میکرولیتر بر لیتر می‌باشند.

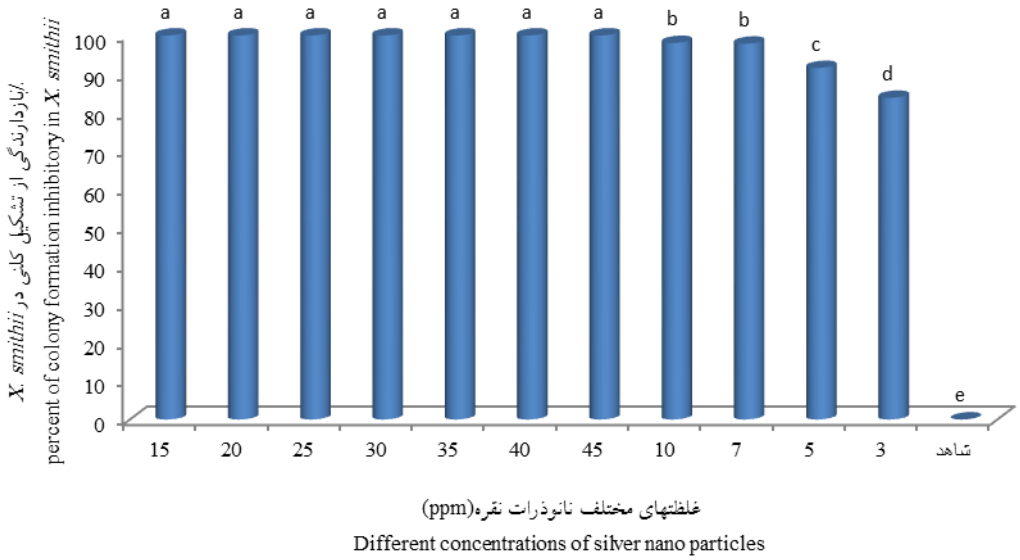


شکل ۵- MIC نانوذرات نقره در *X. smithii* در شرایط آزمایشگاه

Figure 5- MIC of nano silver particles on *X. smithii* under laboratory condition

تعیین MBC نانوذرات نقره در جدایه باکتریایی *X. smithii* در شرایط آزمایشگاه

با توجه به شکل ۶، همزمان با روند افزایش غلظت نانوذرات نقره، افزایش معنی‌داری نیز در میزان درصد بازدارندگی از تشکیل کلونی در این جدایه مشاهده شد. کمترین غلظت که سبب کاهش در تعداد کلونی‌های باکتریایی شد، سه میکرولیتر بر لیتر بود. بیشترین اثر این غلظت در بازدارندگی از تشکیل کلونی در باکتری *X. smithii*، ۸۳/۷۶٪ بود. همچنین نتایج نشان دادند که ۱۰۰٪ جلوگیری از رشد این جدایه باکتریایی در غلظت پانزده میکرولیتر بر لیتر می‌باشند.



شکل ۶- MBC نانوذرات نقره در *X. smithii* در شرایط آزمایشگاه

Figure 6- MBC of nano silver particles on *X. smithii*in under laboratory condition

نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده در زمینه اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره روی باکتری *X. smithii*، نشان از اثر نانوذرات نقره در غلظت‌های پائین روی این باکتری‌ها داشت که این خود نشان‌دهنده خاصیت ضد باکتریایی قوی این ترکیب می‌باشد. نتایج حاصل نشان داد که افزایش غلظت نانوذرات نقره، سبب کاهش جمعیت باکتری‌ها شده و همانند نتایج جانگ و همکاران (Jung et al., 2008) و نیتیا و راگوناتان (Nithya and Ragunathan, 2009) اثر نانوذرات نقره بر باکتری‌ها تا حد زیادی به غلظت‌های مورد استفاده و نیز جنس دیواره باکتریایی وابسته می‌باشد. نیتیا و راگوناتان (Nithya and Ragunathan, 2009) نیز طی تحقیقی نشان دادند که، نانوذرات نقره فعالیت ضد باکتریایی خوبی علیه باکتری‌های گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* و *E. coli* از خود نشان دادند.

اثر باکتری‌کشی نانوذرات نقره هم به غلظت نانوذرات و هم به جمعیت اولیه باکتری‌های موجود وابسته می‌باشد (Kora and Arunachalam, 2010)، مشاهدات اثبات می‌کنند که تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) و نیز آسیب به دیواره سلول باکتریایی از مکانیزم‌های فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره هستند (Kim et al., 2007). در مطالعه‌ای روی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن، القاء جلوگیری از رشد باکتری‌ها توسط نانوذرات‌نقره با متمرکز شدن اکسیژن فعال درون سلول همراه بوده است،

که این یافته‌ها مؤید تولید رادیکال‌های آزاد از سطح نانوذرات نقره و جلوگیری از رشد باکتری‌ها می‌باشند (Choi and Hu, 2008). تصاویر گرفته شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نیز نشان داده‌اند که، نانوذرات به سطح سلول باکتری حمله کرده غشای سلولی را تخریب و باعث افزایش نفوذپذیری غشا و سبب نشت محتویات درون سلول و در نتیجه تخریب سلول شده‌اند (Sondi and Salopek-Sondi, 2004; Cho et al., 2005; Morones et al., 2005; Kim et al., 2007; Raffi et al., 2008).

در نتایج آزمایشات مربوط به تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)، حداقل غلظت مؤثر در تعداد کلونی‌های باکتریایی سه میکرولیتر بر لیتر بوده، بیشترین تأثیر را با ۸۳/۷۶ درصد کنترل بر روی *X. smithii* داشته است. نتایج این قسمت نیز مؤید حساسیت این باکتری به نانوذرات نقره می‌باشد. نتایج تحقیقات کورا و آروناکالام (Kora and Arunachalam, 2010)، چو و همکاران (Cho et al, 2005)، جانگ و همکاران (Jung et al., 2008)، نیتیا و راگوناتان (Nithya and Ragunathan, 2009) و روپارلیا و همکاران (Ruparelia et al., 2008) نشان داده‌اند که نانوذرات نقره دارای سمّیت زیادی در غلظت‌های پائین بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بوده‌اند.

از این نتایج اینگونه می‌توان برداشت کرد که نانوذرات نقره را می‌توان به عنوان سم باکتری‌کش نظیر اکسی کلرور مس و مخلوط بردو برای کنترل بیماری‌های باکتریایی مورد استفاده قرار داد؛ زیرا همانطور که از نتایج حاصل از این بررسی مشخص است، نانوذرات نقره در غلظت‌های پائین کنترل خوبی را بر باکتری بیماریزا و عامل بلایت باکتریایی پنبه اعمال کرده است، که البته نیاز به انجام بررسی‌های بیشتر در این زمینه می‌باشد. در تحقیق انجام شده توسط داودی (Davoudi, 2008) در شرایط مزرعه، توانسته‌اند کنترل خوبی روی باکتری *Erwinia amylovora* با استفاده از نانوذرات نقره داشته باشند.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه تهران و حمایت شرکت نانونصب پارس انجام گرفته است.

منابع

Reference

Ashrafi, S. J., M. Falahati Rastegar, B. Jafarpour, N. Shahtahmasb, and S. Anil Kumar, 2010. Study the efficacy of silver nanoparticles in controlling lentil Fusarium wilt. The Nineteenth Iranian Plant Protection Congr 797.

Azam, G., and R. E. Allan, 1976. Interrelationships of seedling vigor criteria of wheat under different field situations and soil water potentials. Crop Sci. 16: 615-618.

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

Choi, O., and Z. Hu, 2008. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. Environ. Sci. Technol. 42: 4583-4588.

Davoudi, A. 2008. The use of silver nanoparticles in epiphytic population reduction and management of fire blight disease in pear orchards in Qazvin. The Eighteenth Iranian Plant Protection Congress 268.

Feng, Q. L. J. Wu, G. Q. Chen, K. Z. Cui, T. N. Kim, and J. O. Kim, 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J. Biomed. Mater. Res. 52: 662- 668.

Jensen, M. 2002. Seed vigour testing for predicting field seedling emergence in *Fagus sylvatica* L. Denderobiology 47: 47-54.

Jung, W. K., H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim, and Y. H. Park, 2008. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Appl. and Envir. Microbiol. 74: 2171-2178.

Kim, J. S., E. Kuk, K. N. Yu, J. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Hwang, Y. Kim, Y. Lee, D. H. Jeong, and M. Cho, 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 3: 95-101.

Kora, A. J., and J. Arunachalam, 2010. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action. World J. Microbiol Biotechnol. 27:1209-1216.

Lin, D., and B. Xing, 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. Envir. Pollut. 150: 243-250.

Lu, C. M., C. Y. Zhang, J. Q. Wen, G. R. Wu, and M. X. Tao, 2002. Research of the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of *Glycine max* and its mechanism. Soybean Sci. 21: 168-172.

Mac William, J. R., R. J. Clements, and P. M. Dowling, 1970. Some factors influencing the germination and early seedling development of pasture plants. Australian J. of Agric. Res. 21: 19-32.

Matsumura, Y., K. Yoshikata, S. Kunisaki, and T. Tsuchido, 2003. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. App. Environ. Microbiol. 69: 4278-4281.

Morones, J. R., J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez, and M. Yacaman, J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnol. 16: 2346-2353.

Nel, A., T. Xia, L. Mädler, and N. Li. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science, 311: 622-627.

Nithya, R., and R. Ragunathan, 2009. Synthesis of silver nanoparticle using *Pleurotus sajor caju* and its antimicrobial study. J. Nanomat. Biostr. 4: 623-629.

Raffi, M., F. Hussain, T. M. Bhatti, J. I. Akhter, A. Hameed, and M. M. Hasan, 2008. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224. J. Mater. Sci. Technol. 24: 192-196.

Ruparelia, J. P., A. K. Chatterjee, S. P. Duttagupta, and S. Mukherjee, 2008. Strain specifity in antimicrobial activity of silver and coopper nanoparticles. Appl. Environ. Microbiol. 73: 1712-1720.

Salehi, M., and F. Tamaskani, 2009. Effects of silver nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat under salt stress. The first National Conference on Science and Seed Technology in Iran 232.

Saliba, A. M., R. Nishi, B. Raymond, E. A. Marques, U. G. Lopes, L. Touqui, and M. C. Plotkowski, 2006. Implication of oxidative stress in the cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. Microb. Infec. 2: 450-459.

Sasani, Y., M. Karimi, A. H. Naserchiyan, F. Safari, H. Hajargasht, A. Ebrahimi, and M. R. Bihamta, 2009. Evaluate the effects of different concentrations of silver nanoparticles on indicators of germination in wheat, vetch, millet and canola. The Sixth National Biotechnology Congress of Islamic Republic of Iran 156.

Seregin, I.V., and A.D. Kozhevnikova. 2005. Distribution of cadmium, lead, nickel, and strontium in imbibing Maize caryopses. Russ.J. Plant Physiol. 52(4): 565-569.

Shahrokh, S., and G. Emtiazi, 2009. Toxicity and unusual biological behaviour of nanosilver on Gram-positive and negative bacteria assayed by Microtiter- plate. European J. of Biol. Sci. 1: 28-31.

Sondi, I., and B. Salopek-Sondi, 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram- negative bacteria. J. Coll. Interf. Sci. 275: 177-182.

Soni, I., and S. B. Bondi, 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E.coli* as a model for Gram-negative bacteria. J. of colloid and interface sci. 275: 1770-1782.

Yang, F., F. Hong, W. You, C. Liu, F. Gao, C. Wu, and P. Yang. 2006. Influences of nano-anatase TiO2 on the nitrogen metabolism of growing spinach. Biolog. Tra. Elem. Res. 110.

Zhang, W.X., and B. Karn. 2005. Nanoscale environmental science and technology: challenges and opportunities. Environ. Sci. Technol. 39: 94A-95A.