

## استفاده از نانوسیلور برای حذف آلودگی باکتریایی در کشت درون شیشه ای *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca*

حسن صالحی، مصطفی خوشحال سرمست و مرتضی خوشخوی

بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

### چکیده

حذف آلودگی قارچی و باکتریایی اولین قدم برای موفقیت در کشت بافت‌های گیاهی می‌باشد. نانوسیلور به عنوان یک ترکیب جدید قادر به کنترل و توقف آلودگی‌های میکروبی است. در این آزمایش کلونید نانوسیلور به صورت افزودن مستقیم به محیط کشت با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر و غوطه‌ور کردن در محلول‌هایی با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر در دو زمان ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر به صورت افزودن مستقیم به محیط کشت آلودگی باکتریایی را از ۸۱/۲۵ به ۱۸/۷۵ درصد رسانید و غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای ۱۸۰ دقیقه بهترین تیمار غوطه ورسازی برای کنترل آلودگی باکتریایی بود که درصد آلودگی باکتریایی را از ۶۱/۵ به ۱۱/۳ درصد کاهش داد. نانوسیلور روی آلودگی قارچی بی تاثیر بود.

### مقدمه

به طور کلی گیاهان چوبی دارای باززایی کم و آلودگی میکروبی و ترکیبات فنولی بالایی در شرایط درون شیشه ای تولید می‌کنند. آلودگی قارچی و باکتریایی درونی یکی از مشکلات اصلی در استقرار درون شیشه ای گیاه با ارزش *Araucaria excelsa* R. Br. می‌باشد. استفاده از آنتی بیوتیک‌ها جهت کنترل آلودگی‌های میکروبی نتایج متفاوتی را نشان می‌دهد. نتایج بیانگر آن است که استفاده از آنتی بیوتیک‌ها موجب آسیب به بافت‌های گیاه شده و ریسک تولید گونه‌های مقاوم باکتریایی را بالا برده و در برخی از موارد رشد گیاهان در معرض ترکیبات آنتی بیوتیکی کاهش می‌یابد (۴ و ۵). امروزه نانو تکنولوژی کاربرد‌های گسترده‌ای در الکترونیک، شیمی، پزشکی و کشاورزی دارد. مدت زمان زیادی است که مشخص شده نقره خاصیت ضد قارچ و باکتری دارد و استفاده از آن در پزشکی معمول بوده است. ذرات نانو نقره در غلظت‌های پایین دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشند (۲). تنها گزارش استفاده از ترکیب نانو نقره در کشت درون شیشه ای مربوط به (Abdi et al. (2008 بوده که موفق شدند با استفاده از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو نقره به مدت ۱۸۰ دقیقه درصد آلودگی قارچی و باکتریایی را به ۲۶ درصد در گیاه سنبل الطیب کاهش دهند (۱). هدف کار حاضر بررسی پتانسیل نانونقره جهت کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی و اثر آن روی رشد گیاه *Araucaria excelsa* R. Br. می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

اندازه نانو نقره های استفاده شده برای این آزمایش در حدود ۱۸ نانومتر می‌باشد. غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانونقره جهت غوطه‌ور کردن ریز نونه‌های ۸ تا ۱۰ میلی‌متری به مدت ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه پس از استریل کردن سطحی با اتانول و کلراکس مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایشی دیگر نانو نقره با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر قبل از اتوکلاو به صورت مستقیم به محیط کشت افزوده شد. پس از کشت، نمونه‌ها در شرایط

مطلوب جهت رشد قرار گرفتند. هر تیمار دارای ۸ تکرار بود و نتایج در غالب طرح کامل تصادفی با استفاده از نرم افزار آماری MSTATC و آزمون توکی در سطح ۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج بیانگر آن است که نانونقره اثر معنی داری روی آلودگی قارچی ندارد. استفاده از نانو نقره بدون استریل سطح ریز نمونه ها نیز بی تاثیر بود. استفاده از نانو نقره باعث تاخیر در ظهور آلودگی باکتریایی در مقایسه با شاهد شد. بالاترین درصد رفع آلودگی (۳۲ درصد) با استفاده از غوطه ور کردن ریز نمونه ها در ۴۰۰ میلیگرم در لیتر نانونقره به مدت ۱۸۰ دقیقه به دست آمد. افزودن ۴۰۰ میلیگرم در لیتر نانونقره به محیط کشت باعث کاهش آلودگی باکتریایی از ۸۱،۲۵ به ۱۸،۷۵ درصد شد. غلظت های ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی گرم در لیتر موجب آسیب به ریز نمونه ها شد.

استفاده از نانونقره در آینده ممکن است نقش سرنوشت سازی در کشاورزی ایفا کند. برخی از گزارشات اثر نانونقره را بر روی باکتری های گرم مثبت و برخی دیگر روی باکتر های گرم منفی تأیید می کنند. استفاده از نانونقره های با ابعاد کوچکتر (۱-۵ نانومتر) ممکن است روی قارچها موثر باشد (۷). در چند گزارش استفاده از ترکیبات دارای نقره (نیترات نقره و تیوسولفات نقره) در محیط کشت باعث افزایش باززایی ریز نمونه ها شد. مکانیزم عمل نانونقره بسته به بافت هدف تا حدودی متغیر است. مشخص شده که نانونقره با گروههای سولفیدریل و DNA بر همکنش دارد. یون نقره روی غشای سیتوپلاسمی و دیواره سلولی اثر دارد. یکی از مکانیزم های اصلی اثر نانونقره مربوط به نفوذ این ماده به دیواره سلولی باکتری و تنظیم سیگنال های سلولی به وسیله جدا کردن فسفر از پیش ماده پپتید اصلی تیروزین می باشد (۳، ۶).

استفاده از نانونقره در غلظت های مناسب اثر منفی روی گیاه نداشته و موجب مقاومت باکتریایی نمی شود. نتایج نشان دهنده این است که گیاهان تیمار شده با نانونقره تا حدودی شاداب تر از شاهد و دارای رشد بهتری بوده که به احتمال مربوط به اثر نقره روی توقف عمل اتیلن می باشد. نتایج بیانگر این است که نانونقره روی باکتری *Pseudomonas fluorescense* که باکتری غالب در کشت درون شیشه ای *Araucaria excelsa* R. Br. بود موثر است. به هر حال بررسی های بیشتری در رابطه با اثرات مثبت و منفی نانونقره روی دیگر محصولات باید انجام شود.

### منابع

1. Abdi, Gh, H. Salehi and M. Khosh-Khui. 2008 Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. Acta Physiol. Plant. 30: 709-714.
2. Baker, C., A. Pradhan, L. Pakstis, D.J. Pochan and S.I. Shah, 2005. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. J. Nanosci. Technol. 5:244-249.
3. Braydich-Stolle, L., S. Hussain, J.J. Schlager, and M.C. Hofmann. 2005. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells Toxicol. Sci. 88: 412-419.
4. Dodds, J.H, and W.L. Roberts, 1981 some inhibitory effectors on gentamicin on plant tissue culture . In Vitro. 17:467-470.
5. Falkiner, F.R. 1990. The criteria for choosing an antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture in tlc. Assoc. Plant Tiss. Cult. Newsl. 60: 13-23.

6. Shrivastava, S., T. Bera, A. Royl, G. Singh, P. Ramachandrarao and Debabrata Dash. 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. Nanotechnol. 18: 1-9.
7. Wainwright, M.S.J. Grayston, and P. deJong, 1986 Adsorption of insoluble compounds by mycelium of the fungus *Mucor flavus*. Enzyme Micro. Technol. 8:597-600.

**Nano silver can be used to eradicate the bacterial contamination in tissue culture of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca***

**H. Salehi\*, M. Khoshhal Sarmast and M. Khosh-Khui**

Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Abstract

The elimination of bacterial and fungal contamination is the first step in a successful plant tissue culture program. Nano silver (NS) can eliminate microbial infections. In this experiment, NS was added to the tissue culture medium of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca* before autoclaving with concentrations of 25, 50, 100, 200, 400, 800 and 1600 mg l<sup>-1</sup>. In other experiment, the explants were soaked in NS solution with concentrations of 100, 200 and 400 mg l<sup>-1</sup> at two times of 60 and 180 min after surface sterilization. Results showed that using 400 mg l<sup>-1</sup> NS in the medium can reduce the bacterial contamination from 81.25% to 18.75%, and soaking in 200 mg l<sup>-1</sup> of NS for 180 min after surface sterilization reduced the bacterial contamination from 61.5% to 11.3%.