

Green synthesis of iron oxide, copper, zinc oxide and silver nanoparticles from aqueous extract of *F. vulgare* and evaluation of their structural and antimicrobial properties

Shima Bourang 

Ph. D. Student, of Agricultural Biotechnology, Department of plant genetics and production engineering, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: sh.bourang@gmail.com

Sodابه Jahanbakhsh-Godekahriz 

*Corresponding author. Professor, Department of plant genetics and production engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: jahanbakhsh@uma.ac.ir

Rasool Asghari-Zakaria 

Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: r-asghari@uma.ac.ir

Hamed Parsa-Khankandi 

Assistant Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Ardabil, Iran. E-mail address: h.parsa@arums.ac.ir

Mehran Noruzpour 

Ph. D. Student, of Agricultural Biotechnology, Department of plant genetics and production engineering, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: m.noruzpour@gmail.com

Abstract

Objective

Fennel (*Foeniculum vulgare*) has important medicinal compounds with the ability to inhibit DNA oxidative damage. In the present study, metal nanoparticles were first biosynthesized from the aqueous extract of the aerial parts of the fennel plant, and after evaluating the structure and size of the nanoparticles, the effect of the aqueous extract obtained from the aerial parts of the fennel plant and the metal nanoparticles biosynthesized from it was investigated on the growth and survival of bacteria. *E. coli* and *S. aureus* were investigated.

Materials and methods

The size of the resulting nanoparticles was analyzed using scanning electron microscope (SEM) and nanoparticle size distribution (DLS), and the chemical structure and bonds in the composition of nanoparticles were investigated using FTIR. The amount of antibacterial activity of the

resulting extract (at a concentration of 20, 10, 5 and 2.5 µl/ml) and iron oxide nanoparticles (at a concentration of 10, 5, 2.5 and 1.25 µl/ml), copper, zinc oxide and silver (in concentrations of 2, 1, 0.5 and 0.25 µl/ml) on culture media containing *E. coli* and *S. aureus* bacteria were investigated using the diffusion plate method and the minimum inhibitory concentration (MIC).

Results

According to the SEM results, biosynthesized iron oxide, copper, silver and zinc oxide nanoparticles had an average size of 25, 22, 23 and 24 nm, respectively, which can be highly effective in the process of dealing with different bacteria. According to the results, *E. coli* bacteria were more sensitive than *S. aureus* to concentrations equal to the treatments used and created larger halos. Also, the size of the formed halos depended on the concentration and their size increased with the increase of the concentration. Among the treatments used, the use of biosynthesized silver nanoparticles (especially in concentrations of 10, 5, 2.5 and 1.25 mg) had more antibacterial properties. In terms of the survival rate and growth of bacteria cultured using the MIC method, the IC₅₀ of *E. coli* bacteria is lower than that of *S. aureus* bacteria at concentrations equal to the applied treatments, indicating the high sensitivity of the bacterial strain. *E. coli* compared to *S. aureus* bacteria.

Conclusions

Aqueous extract of fennel plant and metal nanoparticles biosynthesized from it have high properties in controlling *S. aureus* bacteria as gram positive bacteria and *E. coli* as gram negative bacteria. In this research, it was found that silver nanoparticles biosynthesized from the aqueous extract of fennel plant have high antibacterial properties compared to iron oxide, zinc oxide and copper nanoparticles.

Keywords: Antibacterial properties, *F. vulgare*, Green synthesis, Metal nanoparticles

Paper Type: Research Paper.

Citation: Bourang Sh, Jahanbakhsh-Godekahriz S, Asghari-Zakaria R, Parsa-Khankandi H, Noruzpour M (2024) Green synthesis of iron oxide, copper, zinc oxide and silver nanoparticles from aqueous extract of *F. vulgare* and evaluation of their structural and antimicrobial properties. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (3), 61-88.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (3), 61-88.

DOI: 10.22103/jab.2024.23102.1557

Received: June 26, 2024.

Received in revised form: August 09, 2024.

Accepted: August 10, 2024.

Published online: September 30, 2024.




Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.


© the authors

سنترز سبز نانوذرات اکسید آهن، مس، اکسید روی و نقره از عصاره آبی گیاه رازیانه (F.)


(vulgare) و ارزیابی خواص ساختاری و ضد میکروبی آنها

شیمای بورنگ 


دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، اردبیل، ایران. رایانامه: shbourang@gmail.com

سدابه جهانبخش گده کهریز 


*نویسنده مسئول: استاد، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، اردبیل، ایران. رایانامه: jahanbakhsh@uma.ac.ir

رسول اصغری زکریا 

استاد، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، اردبیل، ایران. رایانامه: I- asghari@uma.ac.ir

حامد پارسا خانکندی 

استادیار، دانشگاه علوم پزشکی، واحد اردبیل، دانشکده داروسازی، گروه فارماکونوزی، اردبیل، ایران. رایانامه: h.parsa@arums.ac.ir

مهران نوروزپور 

دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، اردبیل، ایران. رایانامه: m.noruzpuor@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۵/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۰

چکیده

هدف: رازیانه (*Foeniculum vulgare*) دارای ترکیبات دارویی مهم با توانایی مهار آسیب‌های اکسیداتیوی DNA است. در پژوهش حاضر ابتدا نانوذرات فلزی از عصاره آبی اندام هوایی گیاه رازیانه بیوسنتز شده و پس از ارزیابی ساختار و اندازه نانوذرات، به بررسی تأثیر عصاره آبی حاصل از اندام هوایی گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن بر روی رشد و زنده‌مانی باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: اندازه نانوذرات حاصل به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و توزیع اندازه نانوذرات (DLS) و ساختار شیمیایی و پیوندهای موجود در ترکیب نانوذرات به کمک FTIR بررسی شدند. میزان فعالیت ضدباکتریایی عصاره حاصل (در غلظت ۲۰، ۱۰، ۵ و ۲/۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر) و نانوذرات اکسید آهن (در غلظت ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، مس، اکسیدروی و نقره (در غلظت ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) بر محیط کشت‌های حاوی باکتری *E. coli* و *S. aureus* به کمک روش صفحات انتشار و حداقل غلظت بازدارنده (MIC) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: طبق نتایج حاصل از SEM نانوذرات اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی بیوسنتز شده دارای اندازه متوسط به ترتیب ۲۵، ۲۲، ۲۳ و ۲۴ نانومتر بود که می‌تواند از کارایی بالایی در فرایند مقابله با باکتری‌های مختلف داشته باشد. طبق نتایج حاصل، باکتری *E. coli* نسبت به *S. aureus* به غلظت‌های برابر تیمارهای مورد استفاده حساس‌تر بوده و هاله‌های بزرگ‌تری را ایجاد کردند. همچنین اندازه هاله‌های تشکیل شده نیز وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، اندازه آن‌ها افزایش یافت. در میان تیمارهای استفاده شده، استفاده از نانوذرات نقره بیوسنتز شده (به خصوص در غلظت‌های ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میلی‌گرم) خواص ضدباکتریایی بیشتری داشت. از نظر میزان زنده‌مانی و رشد باکتری‌های کشت شده به کمک روش MIC، نیز میزان IC_{50} باکتری *E. coli* نسبت به باکتری *S. aureus* در غلظت‌های برابر تیمارهای اعمال شده پایین‌تر بوده و بیانگر حساسیت بالای سوبه باکتری *E. coli* نسبت به باکتری *S. aureus* بود.

نتیجه‌گیری: عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن از خواص بالایی در کنترل باکتری *S. aureus* به عنوان باکتری گرم مثبت و *E. coli* به عنوان باکتری گرم منفی برخوردار است. در این پژوهش مشخص شد که نانوذرات نقره بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه رازیانه در مقایسه با نانوذرات اکسید آهن، اکسیدروی و مس از خواص ضدباکتریایی بالایی برخوردار است.

کلیدواژه‌ها: بیوسنتز نانوذرات، فلزی خواص ضدباکتریایی، رازیانه

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: بورنگ شیماء، جهانبخش گده‌کهریز سدابه، اصغری زکریا رسول، پارسا خانکندی حامد، نوروزپور مهران (۱۴۰۳) سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن، مس، اکسیدروی و نقره از عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*) و ارزیابی خواص ساختاری و ضد میکروبی آن‌ها. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۶(۳)، ۸۸-۶۱.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

یکی از ویژگی‌های مهم نانو تکنولوژی جنبه چند رشته‌ای بودن آن است. نانو تکنولوژی حوزه‌های مختلفی از علوم پایه از جمله کشاورزی، مهندسی مواد، رنگ‌سازی پزشکی، الکترونیک و غیره را در بر می‌گیرد (Usman et al. 2020). امروزه به دلیل استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها، چندین سویه از انواع باکتری‌های مقاوم در برابر چندین دارو شناسایی شده‌اند (Hasan & Al-Harmoosh 2020). تأثیر اقتصادی مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به داروها به دلیل افزایش هزینه‌های درمان و پزشکی با سرعت نگران‌کننده‌ای در حال افزایش است (Tacconelli et al. 2018). باکتری‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی نسبت به داروها مقاومت پیدا می‌کنند (Belete 2019). شناسایی عوامل ضد میکروبی جدید جهت بهبود فعالیت‌شان ضروری است. نانو تکنولوژی بستر مناسبی جهت تغییر خواص فیزیکی و شیمیایی مواد مختلف در مقایسه با همتای آن‌ها فراهم می‌کند که می‌توان از آن برای کاربردهای زیستی استفاده کرد (Bourang et al. 2024). نانوپزشکی شاخه‌ای از فناوری نانو است که در زمینه تشخیص، نظارت، دارورسانی و کنترل بیماری‌ها اهمیت دارد (Zheng et al. 2021). کاربرد نانو تکنولوژی در پزشکی یک روند نسبتاً جدید به نظر می‌رسد (Bourang et al. 2024). طبق گزارشات انجام شده نانوذرات نقره می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و کنترل عفونت‌های میکروبی باشند (Bruna et al. 2021). تعیین اثربخشی یک نانوذره به عنوان یک عامل ضد باکتری، نیازمند تکنیک‌های تجربی است که میزان زنده‌مانی باکتری‌ها را می‌سنجد (Sánchez-López et al. 2020). در حالی که تکنیک‌های متعددی برای تعیین فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات توسعه یافته‌اند، اما هر کدام از روش‌ها دارای نواقصی هستند (Zheng et al. 2021). باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی پاسخ متفاوتی به نانوذرات دارای خواص ضد باکتریایی دارند که بر این اساس روش‌های ارزیابی آن‌ها نیز متفاوت هستند (Khan et al. 2018). بنابراین، مطالعات مختلف تأثیرات نانوذرات بر روی باکتری‌ها اغلب شامل حداقل یک گونه باکتری گرم مثبت و یک گونه باکتری گرم منفی است (Yusof et al. 2019). تکنیک انتخاب شده جهت ارزیابی میزان اثر بخشی نانوذرات تا حدودی به نوع داده‌های مورد نیاز بستگی دارد.

روش‌های مختلفی جهت سنجش مقاومت باکتری‌ها در برابر نانوذرات با خواص ضد باکتریایی وجود دارند که از جمله آن می‌توان به سنجش حداقل غلظت مهارکننده (MIC)، حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) و سنجش‌های پیچیده‌تر دیگر، از جمله رنگ‌آمیزی باکتری‌های زنده یا مرده و سنجش کاهش نمک تترازولیوم اشاره نمود (Siva et al. 2020). چندین نانوذره همانند نقره، مس، اکسید آهن (Fe_3O_4)، دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2)، اکسیدروی (ZnO) و طلا جهت خواص ضد میکروبی مورد مطالعه قرار گرفته است (Kheiri et al. 2019). برخی از فلزات همانند روی، نقره و مس مکانیسم‌های ضد باکتریایی را به شکل توده‌ای از خود نشان می‌دهند، این در حالیست که ترکیبات دیگر همانند آهن در حالت طبیعی خواص ضد باکتری ندارند و تنها در حالت نانوذره خود توانایی کنترل رشد باکتری را دارند (Saqib et al. 2019). از طرفی دیگر مکانیسم فعالیت ضد باکتریایی از یک نانوذره به نانوذره‌ای دیگر متفاوت است. این در حالیست که مکانیسم دقیق اثرات ضد باکتریایی تمامی نانوذرات به طور کامل شناسایی نشده است (Thakur & Verma 2021). از جمله مکانیسم‌های پیشنهادی می‌توان به خواص تأثیر نانوذرات بر روی غشاء سلولی و

آزادسازی یون‌های فلزی ضدباکتری به درون سلول‌های باکتریایی اشاره نمود (Niño-Martínez et al. 2019). میزان سطح به حجم یک نانوذرات با کاهش اندازه، افزایش می‌یابد که امکان تعامل بیشتر ذرات با محیط اطراف را فراهم می‌کند. بنابراین، برای ذرات ضدباکتری ذاتی مانند روی و نقره افزایش نسبت سطح به حجم آن‌ها اثر ضدباکتریایی را افزایش می‌دهد (Ajinkya et al. 2020).

فلز روی به طور طبیعی رشد طیف وسیعی از سویه‌های باکتری (عمدتاً گرم مثبت) را بدون استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها کاهش می‌دهد. نانوذرات اکسیدروی برای باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها همانند *Streptococcus aureus* و *Streptococcus agalactiae* از سمیت بالایی برخوردار است (Thakur & Verma 2021). نانوذرات اکسیدروی با ایجاد منافذ متعدد بر روی غشاء سلولی و ورود به داخل باکتری موجب افزایش تنش اکسیداتیو در داخل سلول باکتری و در نهایت مرگ میزبان می‌شوند (Mohd Yusof et al. 2020). واکنش‌پذیری نانوذرات اکسیدروی در محیط‌های اسیدی (pH زیر ۵/۵ و شبیه به میزان pH سلول‌های باکتریایی) افزایش یافته و به سرعت یون‌های Zn^{+2} آزاد می‌کنند که موجب بروز اختلال در عملکرد میتوکندری سلول‌های توموری، فوران ROS، پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب به DNA و در نهایت مرگ سلول‌های میزبان می‌شود (Dappula et al. 2023). سمیت نانوذرات اکسیدروی وابسته به غلظت بوده و در غلظت‌های بالاتر سمی‌تر هستند (Mohd Yusof et al. 2020). طبق نتایج ارائه شده استفاده از نانوذرات اکسیدروی در بدن انسان به دلیل سمیت پایین و زیست‌سازگارپذیری بالا، جهت دارورسانی هدفمند بسیار ارزشمند می‌باشد (Brindhadevi et al. 2020).

استفاده از نقره به عنوان یک عامل ضدباکتری، پیشینه تاریخی داشته و از دیرباز مورد استفاده قرار می‌گرفته است (Yaqoob et al. 2020). نقره به عنوان یک فلز ضدباکتری طبیعی است که در نوع نانوذره آن از فعالیت ضدباکتریایی بالاتری برخوردار است (Tang & Zheng 2018). طبق گزارشات انجام شده نانوذرات نقره با قطر متوسط ۲۱ نانومتر از رشد گونه‌های باکتری گرم منفی (*Escherichia coli*، *Vibrio cholera* و *Salmonella typhi*) جلوگیری می‌کنند (Noruzpuor et al. 2024). نانوذرات نقره می‌توانند به ساختار غشای سلولی باکتری آسیب برسانند و منجر به نشت قندهای کاهنده و ترکیبات درون سیتوپلاسمی شده و در نتیجه منجر به مرگ باکتری‌ها شوند (Noruzpuor et al. 2024). نانوذرات نقره با گروه‌های دهنده الکترون حاوی اتم‌های گوگرد، اکسیژن یا نیتروژن که معمولاً به صورت تیول‌ها یا فسفات‌ها روی اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک وجود دارند، تشکیل کمپلکس داده و از تقسیم سلولی و تکثیر DNA جلوگیری می‌کنند (Noruzpuor et al. 2024). یون‌های Cu^{+2} آزاد شده توسط نانوذرات مس با ایجاد منافذ بر روی غشای سلولی و ورود به داخل سلول باکتریایی با گروه‌های $-SH$ و $-COOH$ پیوند یافته و در تقسیم سلولی، فرایند تقسیم DNA، RNA، عملکرد میتوکندری، ذخیره آب، سوخت و سوز درون سلولی، عملکرد آنزیم و غیره اختلال ایجاد نموده و موجب از بین رفتن سلول‌های باکتری می‌شوند (Samuel et al. 2020; Rajeshkumar et al. 2019). نانوذرات مس (CuO) فعالیت خود را در برابر طیف وسیعی از

پاتوژن‌های باکتریایی از جمله *Escherichia coli* و *aureus Staphylococcus* نشان داده‌اند (Maliki et al. 2022). انواع مختلفی از نانوذرات مبتنی بر اکسید آهن شامل مگنتیت‌ها (Fe_3O_4)، ماگمیت‌ها (Fe_2O_3) و فریت‌های مخلوط (MFe_2O_4) که در آن M می‌تواند Co، Mn، Ni یا Zn باشد) است (Bankier et al. 2019). با اصلاح سطح، از نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامگناطیس (SPION)^۱ حاصل، می‌توان در تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI)^۲، تصویربرداری ذرات مغناطیسی (MPI)^۳، تحویل هدفمند داروها، پروتئین‌ها، آنتی‌بادی‌ها و اسیدهای نوکلئیک، هایپرترمی، حسگر زیستی، ترمیم بافت و جداسازی زیست مولکول‌ها استفاده کرد (Dulińska-Litewka et al. 2019). نانوذرات اکسید آهن با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)^۴، موجب بروز آسیب به پروتئین‌ها و DNA می‌شود (Duan et al. 2019).

روش‌های مختلفی جهت سنتز انواع نانوذرات فلزی وجود دارد که می‌توان به روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی اشاره نمود (Flieger et al. 2021). روش زیستی به معنای سنتز نانوذرات با استفاده از باکتری، قارچ، جلبک، مخمر و گیاهان است. روش‌های فیزیکی و شیمیایی دارای مزایا و معایب گوناگونی می‌باشند که از جمله مزایای این نانوذرات توزیع اندازه باریک آن‌ها و معایب اصلی آن مصرف انرژی بالا، زمان، هزینه بالا و سمیت بالا و زیست سازگاری پایین آن‌ها می‌باشد که امروزه کمتر مورد توجه قرار گرفته است (Pal et al. 2019). روش‌های بیولوژیکی مزایای بیشتری نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی نظیر سازگاری با محیط‌زیست، هزینه کم تولید، عدم پردازش پایین دستی و بازدهی بالای دارند. از این رو، سنتز نانوذرات از طریق عصاره گیاهان، فرآیند کاهش یک مرحله‌ای ساده را با تولید در مقیاس بزرگ ارائه می‌دهد. گزارش‌های متعدد در مورد سنتز نانوذرات با استفاده از عصاره‌های گیاهی با فعالیت‌های بیولوژیکی قابل توجه ارائه شده است (Küüнал et al. 2018). ترکیبات با ارزش دارویی نظیر فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، فنل‌ها، آلکالوئیدها، تانن‌ها و غیره موجود در عصاره‌های گیاهان دارویی به عنوان عوامل کاهنده، پوشاننده و تثبیت کننده نانوذرات فلزی عمل می‌کنند. قسمت‌های مختلف گیاهان از جمله برگ، ساقه، ریشه، شاخساره، گل، پوست، دانه و همچنین متابولیت‌های ثانویه حاصل از آن‌ها جهت بیوسنتز نانوذرات فلزی مورد استفاده قرار گرفته است (Jadoun et al. 2021). *Foeniculum vulgare* سرشار از ترکیبات شیمیایی مهم دارویی از جمله کربوهیدرات‌ها، ساپونین‌ها، تانن‌ها، استروئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کوئینون‌ها، ترکیبات فنلی و آلکالوئیدها هستند که در بیوسنتز نانوذرات فلزی از اهمیت بالایی برخوردار است (Anka et al. 2020).

به علاوه، یکی از جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک‌ها، به عنوان محرک‌های رشد ضد میکروبی طبیعی، استفاده از فیتوبیوتیک‌ها و گیاهان دارویی است (Amirteymoori et al. 2021). جایگزینی ترکیبات فیتوژنیک (فیتوبیوتیک‌ها و گیاهان دارویی)، از جمله اسانس‌ها، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها، مزایای بسیاری دارد (Vahabzadeh et al. 2021; Jafari Ahmadabadi et al.)

1- Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION)

2- Magnetic Resonance Imaging (MRI)

3- Magnetic particle imaging (MPI)

4- Reactive Oxygen Species (ROS)

2023). بعضی از این مزیت‌ها عبارتند از پیشگیری از بیماری‌های خاص، افزایش عملکرد ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی، بهبود فعالیت‌های کبدی، بهبود آنزیم‌های مربوط به هضم، افزایش معیارهای تولید ژئوتکنیکی، و اثرات هیپوکلسترولمی (Safaei et al. 2023; Shokri et al. 2022). نشان داده شده که افزودن فیتوبیوتیک‌ها و گیاهان دارویی به غذا باعث بهبود عملکرد غذایی می‌شود (Vahabzadeh et al. 2020). یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی که دارای خواص ضد میکروبی، محافظ کبد و آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی بوده و از زمان‌های بسیار قدیم مورد استفاده انسان قرار گرفته است رازیانه (*Foeniculum vulgare* mill) از خانواده Apiaceae است (Shahsavari et al. 2022). نتایج مطالعات ثابت کرده است که افزودن رازیانه در جیره غذایی باعث افزایش هضم و بازده رشد می‌شود، حجم بسته‌بندی سلولی را زیاد می‌کند، تعداد گلبول‌های قرمز خون و هموگلوبین را افزایش می‌دهد، وزن و طول روده کوچک را بهتر می‌کند و تعداد کل باکتری‌ها را کاهش می‌دهد، کارایی و وضعیت سلامت بهتری را ایجاد می‌کند، و وزن بدن را متعادل می‌کند (Hajalizadeh et al. 2019; Safaei et al. 2023; Mohammadabadi et al. 2023). اگرچه تحقیقات متعددی در زمینه سنتز نانوذرات فلزی مختلف از سایر گیاهان انجام گرفته است. اما منابع علمی در دسترس مبنی بر تولید نانوذرات فلزی از گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و تأثیر آن‌ها بر روی باکتری‌ها بسیار محدود است. با توجه به مقدار بالای آهن، مس، نقره و روی و سایر فلزات درون گیاهی و ترکیبات فلاونوئیدی و آلکلوئیدی در گیاه رازیانه به نظر می‌رسد این گیاه از پتانسیل بالایی در تولید نانوذرات فلزی برخوردار باشد. در این پژوهش ابتدا به بیوسنتز نانوذرات فلزی از جمله نانوذرات اکسید آهن، مس، اکسیدروی و نقره از عصاره آبی اندام هوایی گیاه رازیانه پرداخته شد و سپس ویژگی‌های ساختاری از جمله اندازه نانوذرات فلزی بیوسنتز شده به کمک DLS^۵ و SEM^۶ مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت به بررسی تأثیر عصاره آبی حاصل از اندام هوایی گیاه رازیانه و نانوذرات اکسید آهن، مس، اکسیدروی و نقره بیوسنتز شده از آن بر روی رشد و زنده‌مانی باکتری‌های *E. coli* (گرم منفی) و *S. aureus* (گرم مثبت) به کمک روش انتشار دیسک و MIC^۷ پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی: منبع گیاهی مورد استفاده در این آزمایش از نمونه گیاهی رازیانه (رقم سنتتیک میان‌رس مشکین شهر) رشد یافته از بذور تهیه شده از مرکز تحقیقات بذور استان اردبیل (شهرستان اردبیل) در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل جمع‌آوری شدند. سرشاخه‌های جوان فاقد بیماری و مناسب از نظر ظاهری انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های هدف پس از جداسازی در دمای °C ۲۵ خشک شدند.

5- Dynamic Light Scattering

6- Scanning Electron Microscopy

7- Minimum Inhibitory Concentration

عصاره گیری: فرایند عصاره گیری در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه محقق اردبیلی، به کمک آب مقطر (دو بار تقطیر شده) و روش پرکولاسیون، نسبت ۱:۱۵ (یک گرم نمونه گیاهی به ۱۵ میلی لیتر حلال) و در مدت زمان ۴۸ ساعت انجام شد (Alizadeh et al. 2016). نمونه حاصل پس از عبور از کاغذ صافی (واتمن، با منافذ ۲/۵ میکرومتری) در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و نمونه رویی به عنوان عصاره نهایی گیاهی برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

بیوسنتز نانوذرات فلزی-بیوسنتز نانوذرات اکسید آهن: به منظور سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن از روش Hasan

(2022) *et al.* با کمی تغییرات استفاده شد. در ابتدا مقدار ۳/۳۳ گرم از نمک آهن (III) کلرید ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) و ۱/۵۹ گرم از نمک آهن (II) کلرید ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) به داخل بالن سه دهانه ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه به آن اضافه شد. به یک دهانه دماسنج و از دهانه دیگر گاز نیتروژن با فشار ۵۰ بار به درون ظرف دمیده شد. سپس محتویات ظرف با استفاده از یک مگنت همزده شده (۳۰۰ دور در دقیقه) و دما تا 80°C بالا برده شد. سپس در بازه زمانی ۱۰ دقیقه ۱۵ میلی لیتر از عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*) به صورت قطره قطره به محلول اضافه شد سپس میزان ۶۰ میلی لیتر NaOH یک مولار به آن اضافه شده و بعد از تغییر رنگ محلول محتویات بالن به بشر انتقال داده و با استفاده از آهن ربای قوی نانوذرات سنتز شده از کف بشر جمع آوری و مورد شستشو قرار گرفت. نمونه های حاصل پس از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه از لوله های آزمایشی جمع آوری شدند و پس از ۲۴ ساعت استقرار در فریزر -80°C آب گیری نمونه های حاصل درون دستگاه انجماد خشک انجام و به مدت سه ساعت خشک شدند.

بیوسنتز نانوذرات مس: بیوسنتز نانوذرات مس به روش Akbari et al. (2020) با کمی تغییرات انجام شد. بدین

منظور ابتدا ۱۰ میلی مولار سولفات مس (CuSO_4) به ۱۰ میلی لیتر عصاره آبی گیاه اضافه شد. سپس محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت و در دمای 50°C توسط دستگاه شیکر در دور ۶۰ دور در دقیقه تکان داده شد. نهایتاً نانوذرات حاصل توسط سانتریفیوژ جداسازی و پس از شستشو توسط بافر فسفات و خشک شدن توسط دستگاه انجماد خشک تا زمان استفاده در یخچال و دمای 80°C نگهداری شدند.

بیوسنتز نانوذرات نقره: به منظور سنتز سبز نانوذرات نقره ابتدا یک میلی مولار نیترات نقره (AgNO_3) به ۱۰ میلی لیتر

آب دیونیزه اضافه شده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه شیکر (۴۰ دور در دقیقه) قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی لیتر عصاره گیاهی به آن اضافه شد. پس از ۳۰ الی ۴۰ دقیقه محلول مورد نظر تغییر رنگ داد. سپس محلول مورد نظر در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای 25°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از حذف محلول رویی رسوب مورد نظر برای سه مرتبه توسط بافر فسفات شستشو و پس از خشک شدن توسط دستگاه انجماد خشک، جهت آزمایشات بعدی در دمای 80°C - نگهداری شد (Ahmadi-Nouraldinvand et al. 2024).

بیوسنتز نانوذرات اکسیدروی: برای بیوسنتز نانوذرات اکسیدروی ابتدا ۰/۰۲ مولار استات روی ($Zn.2H_2O$) به ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه شده اضافه و به کمک همزن برقی مغناطیسی به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق هم زده شد. سپس ۱۰ میلی لیتر از عصاره آبی گیاه در طی چند مرحله به آن اضافه گردید. پس از ۱۰ دقیقه و به صورت قطره قطره یک میلی لیتر سود (NaOH) پنج مولار به آن اضافه شد تا pH محلول به ۱۱ تا ۱۲ افزایش یابد. با افزایش pH محلول، رنگ آن به شیری-زرد تغییر نموده و تا ۴ ساعت فرآیند هم‌زدن ادامه یافت. با افزایش دمای دستگاه همزن برقی مغناطیسی به $50^{\circ}C$ ذراتی به رنگ شیری روشن در محلول مشاهده می‌شود که بیانگر سنتز نانوذرات اکسیدروی است. سپس محلول مورد نظر به مدت ۱۵ دقیقه و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب نهایی جمع‌آوری شده و توسط دستگاه انجماد خشک، خشک شدند. ترکیب نهایی برای آزمایش‌های نهایی در دمای $80^{\circ}C$ - نگهداری شد (Dappula et al. 2023).

بررسی خصوصیات نانوذرات فلزی: شکل و اندازه نانوذرات اکسید آهن، مس، اکسیدروی و نقره توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (شرکت LIBRA Zeiss SMT، مدل 120 PLUS by Carl، ساخت کشور آلمان) اندازه‌گیری شد. هم‌چنین قطر هیدرودینامیکی نانوذرات اکسید آهن، مس، اکسیدروی و نقره بیوسنتز شده با استفاده از دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (DLS، شرکت Horiba، ساخت کشور ژاپن) تعیین شد.

تهیه نمونه باکتری: جهت بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید آهن، مس، اکسیدروی و نقره بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه رازیانه از پاتوژن گرم منفی (*Escherichia coli* (PTCC-1276) و پاتوژن گرم مثبت (ATCC-25923) *Staphylococcus aureus* استفاده شد.

سنجش فعالیت ضد میکروبی نانوذرات به کمک روش انتشار دیسک (Disk Diffusion): بدین منظور ابتدا باکتری *S. aureus* و *E. coli* بر اساس غلظت مک‌فارلند به درون پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت جامد، کاملاً پخش شد. پس از ایجاد چاهک‌های کوچک بر روی پتری‌های حاصل عصاره‌ی آبی گیاه رازیانه در غلظت (۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرو لیتر در میلی لیتر)، نانوذره اکسید آهن حاصل از عصاره آبی گیاه در غلظت (۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) و نانوذرات مس، نقره و اکسیدروی در غلظت (۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۱ و ۲ میکروگرم در میلی لیتر) درون این چاهک‌ها اضافه شده و سپس دیسک‌های استریل شده توسط اشعه UV روی هر کدام از این چاهک‌ها قرار داده شدند. در انتها این پلیت‌ها به انکوباتور با درجه حرارت $37/5^{\circ}C$ انتقال داده شده و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. از دیسک‌های حاوی تتراسایکلین به عنوان شاهد استفاده شد (Chandrasekhar et al., 2020).

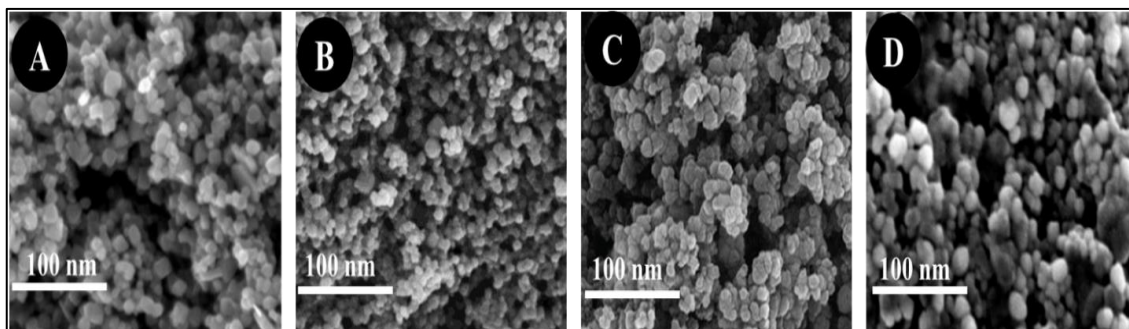
بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی MIC: بدین منظور، ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع به فالکون ۵۰ میلی لیتری در شرایط استریل منتقل شد سپس میزان ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی (باکتری *S. aureus* به عنوان باکتری گرم مثبت و *E. coli* به عنوان باکتری گرم منفی) به محیط کشت اضافه گردید و پس از مخلوط شدن کامل با محیط کشت به هر کدام از

چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد. به منظور بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره‌ی آبی گیاه *F. vulgare* و نانوذرات فلزی بیوستنتز شده از آن به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی اضافه گردید. پس از اینکه عصاره‌ی گیاهی مدنظر به طور جداگانه توسط سمپلر با ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع مخلوط شد، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته شده و به چاهک دوم منتقل شد و عمل مخلوط کردن تکرار شد. مجدداً ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک دوم برداشته و به چاهک سوم انتقال یافت، این عمل تا چاهک انتهایی پلیت ۹۶ خانه انجام گرفت (چاهک شماره ۱۲) و در نهایت از چاهک ۱۲ میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شده و دور ریخته شد. پلیت ۹۶ خانه حاوی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به انکوباتور با درجه حرارت مناسب منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. فرایند مورد نظر برای نانوذره اکسید آهن با غلظت ۴۰ میلی گرم و نانوذرات مس، نقره و اکسیدروی با غلظت ۱۰ میلی گرم به جای عصاره آبی گیاه مذکور آغاز شد. آخرین رقت از عصاره یا نانوذره که بتواند مانع از کدورت محیط یا به عبارت دیگر رشد باکتری شود به عنوان MIC در نظر گرفته شد. میزان تغییرات کدورت هر کدام از چاهک‌ها توسط دستگاه الیزاریدر بررسی شد (Alshareef 2021).

طرح آزمایشی و تجزیه آماری: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین داده‌ها با سطح احتمال یک درصد استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 26 انجام گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید. هم‌چنین میزان زنده‌مانی توده‌های باکتری به کمک نرم افزار GraphPad Prism8 بررسی شد.

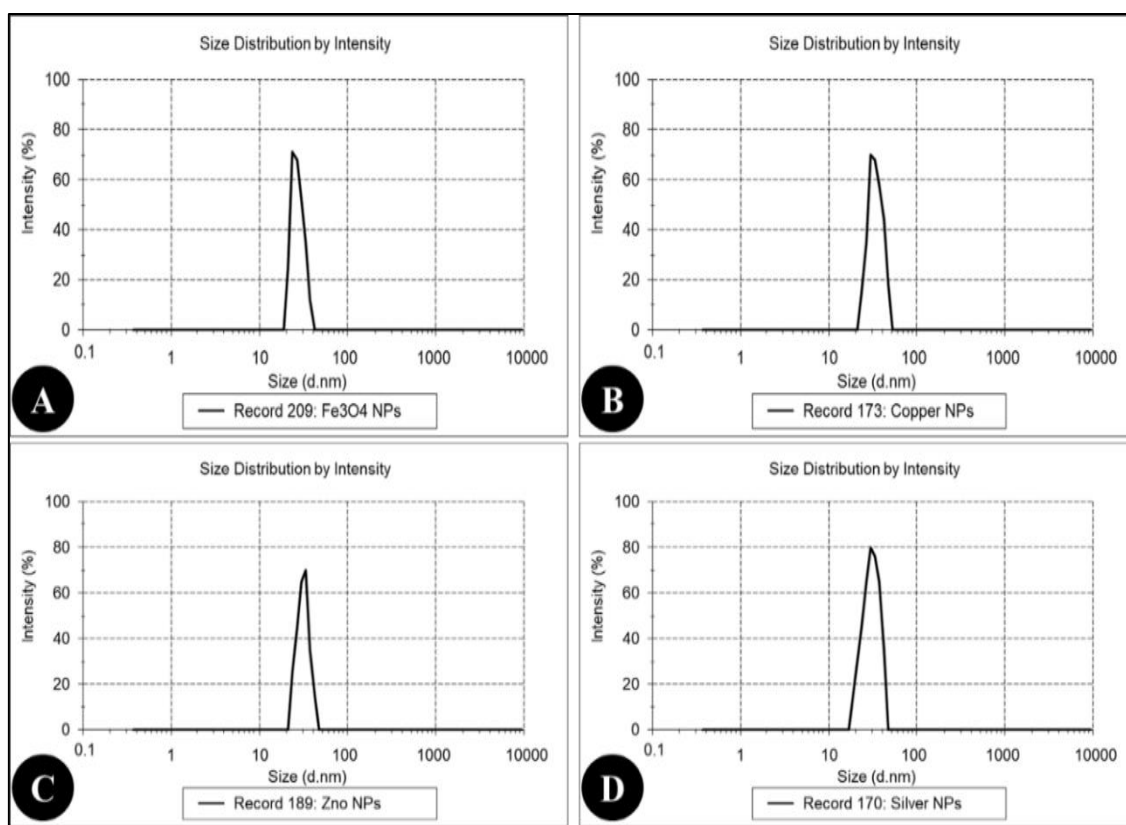
نتایج

نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): ریخت‌شناسی نانوذرات آهن، مس، روی و نقره بیوستنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) در شکل ۱- A، B، C و D آمده است. هر چه اندازه قطر نانوذرات سنتز شده کوچک‌تر باشند، سطح تماس افزایش یافته و خواص آن‌ها (از جمله خواص ضدباکتریایی) افزایش می‌یابد (Wei et al. 2018). طبق نتایج به دست آمده اندازه نانوذرات بیوستنتز شده اکسید آهن بین ۲۰ الی ۴۰ نانومتر، مس بین ۲۰ تا ۳۵ نانومتر، نقره بین ۲۰ تا ۳۵ نانومتر و اکسیدروی بین ۲۰ تا ۳۵ نانومتر بود. نتایج حاصل از توزیع اندازه نانوذرات بیوستنتز شده (DLS) نشان داده شده در شکل ۲، ابعاد نانوذرات سنتز شده را تأیید کرد. نانوذرات اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی بیوستنتز شده از عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*) دارای قطر هیدرودینامیکی به ترتیب ۲۵، ۲۲، ۲۳ و ۲۴ نانومتر می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوذرات (A) اکسید آهن، (B) مس، (C) نقره و (D) اکسیدروی بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*)

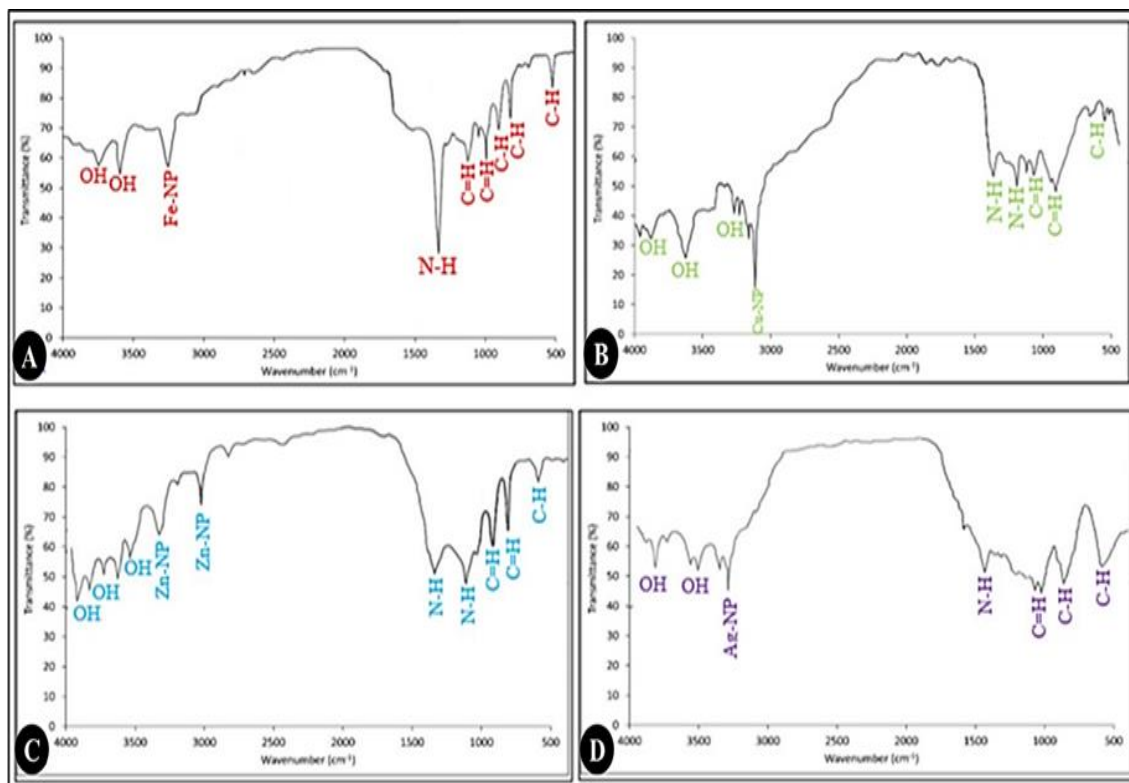
Figure 1. Scanning Electron Microscope (SEM) images of A) iron oxide, B) Copper, C) silver and D) Zinc oxide nanoparticles biosynthesized from aqueous extract of *F. vulgare*



شکل ۲. توزیع اندازه نانوذرات بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه *F. vulgare*: (A) نانوذرات اکسید آهن، (B) مس، (C) نقره و (D) اکسیدروی

Figure 2. Size distribution of nanoparticles biosynthesized from the aqueous extract of *F. vulgare*: A) iron oxide, B) Copper, C) silver and D) Zinc oxide nanoparticles

نتایج FTIR: وجود پیک‌های دوگانه و پشت سرهم در تصاویر FTIR (شکل ۳)، نانوذرات آهن، مس، روی و نقره در نواحی ۳۵۰۰-۴۰۰۰ نمایانگر ارتعاشات کششی گروه H-O می‌باشد. همچنین وجود پیک‌های دوتایی و پیک‌های کشیده در ناحیه ۳۵۰۰-۲۸۰۰ نمایانگر حضور نانوذرات فلزی است. همچنین در نواحی ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ پیک‌های کششی مربوط به پیوندهای C=O، N-H و O-C بود. از آنجایی که ترکیبات آلی عصاره‌های گیاهی در اطراف نانوذرات قرار می‌گیرند و باعث پایداری نانوذرات می‌شوند، لذا در طیف FTIR نوسان‌های جذبی مربوط به این گروه‌های آلی دیده می‌شوند (شکل ۳).



شکل ۳. طیف FTIR نانوذرات بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*): نانوذرات (A) اکسید آهن، (B) مس، (C) نقره و (D) اکسید روی

Figure 3. FTIR spectrum of nanoparticles biosynthesized from aqueous extract of *F. vulgare*: A) iron oxide, B) Copper, C) silver and D) Zinc oxide nanoparticles

بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*) و نانوذرات اکسید آهن، مس، نقره و اکسید روی بیوسنتز شده از آن: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اندازه هاله تولید شده در پلیت‌های حاوی دو گونه باکتری، گرم منفی (*E. coli*) و گرم مثبت (*S. aureus*) به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) تحت تأثیر نوع عامل بازدارنده

(عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی بیوستنز شده از آن) و غلظت‌های مختلف استفاده شده از عوامل بازدارنده قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین مربعات فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*) و نانوذرات اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی بیوستنز شده از آن

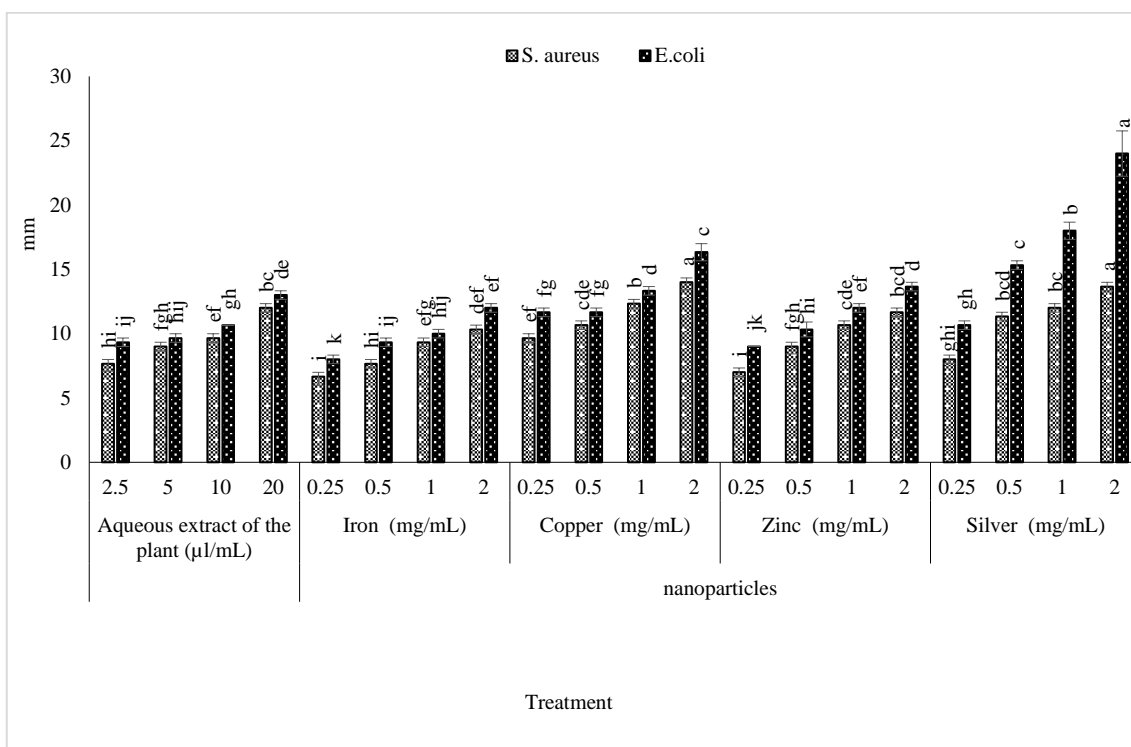
Table 1. Mean square of antibacterial activity of aqueous extract of *F. vulgare* and iron oxide, copper, silver and zinc oxide nanoparticles biosynthesized

منبع تغییرات S.O.V	df	مربعات میانگین MS	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Between different treatments	19	13.55 **	42.23 **
Between different concentrations of aqueous extract	3	9.86 **	8.22 **
Between different concentrations of iron oxide nanoparticles	3	8.11 **	8.33 **
Between different concentrations of copper nanoparticles	3	10.88 **	14.52 **
Between different concentrations of zinc oxide nanoparticles	3	12.55 **	12.30 **
Between different concentrations of silver nanoparticles	3	16.97 **	75.55 **
Error	40	0.61	0.50
CV (%) ضریب تغییرات (درصد)	-	6.75	10.28

** :Significance at the 1% probability level

همان طوری که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، بین دو گونه باکتری (باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus*) از نظر حساسیت در برابر غلظت‌های مختلف عصاره آبی رازیانه (*F. vulgare*) و نانوذرات اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد. به طوری که باکتری *E. coli* در اکثر موارد نسبت به تیمارهای اعمال شده حساس‌تر از باکتری *S. aureus* بود (شکل ۴ و ۵). این امر می‌تواند به دلیل وجود یک لایه نازک پپتیدوگلیکان در باکتری‌های گرم منفی همانند *E. coli* باشد که نسبت به باکتری‌های گرم مثبت (دارای پپتیدوگلیکان ضخیم و اسیدهای تیکوئیک) در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر ترکیبات ضد میکروبی حساس می‌باشند. به طور کلی با افزایش غلظت تیمارهای اعمال شده، اندازه هاله‌ها افزایش داشت این مورد در هر دو گونه باکتری صادق بود (شکل ۴). طبق نتایج به دست آمده بزرگترین هاله (۲۴/۰۱ میلی‌متر) مربوط به دیسک حاوی ۲ میلی‌گرم نانوذره نقره بیوستنز شده در پلیت حاوی باکتری *E. coli* مشاهده شد (شکل ۵-F). طبق نتایج به دست آمده (شکل ۴)،

خاصیت ضدباکتریایی (اندازه ایجاد هاله) عصاره آبی رازیانه (*F. vulgare*) و نانوذرات اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی بیوستنز شده از آن در مورد هر دو باکتری کشت شده وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، به طور معنی داری افزایش یافت. همچنین بین دو گونه باکتری (باکتری های *E. coli* و *S. aureus*) در غلظت های برابر نانوذرات اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی بر خلاف غلظت های برابر عصاره آبی رازیانه (*F. vulgare*) اختلاف معنی داری از نظر آماری مشاهده شد. بیشترین میزان اختلاف بین باکتری های *E. coli* و *S. aureus* مربوط به استفاده از نانوذرات نقره بود. همچنین از نظر استفاده از عصاره آبی رازیانه (*F. vulgare*) علاوه بر این که بین دو گونه باکتری اختلاف معنی داری مشاهده نشد، بین غلظت های مختلف استفاده شده نیز درون هر باکتری اختلاف معنی داری وجود نداشت.

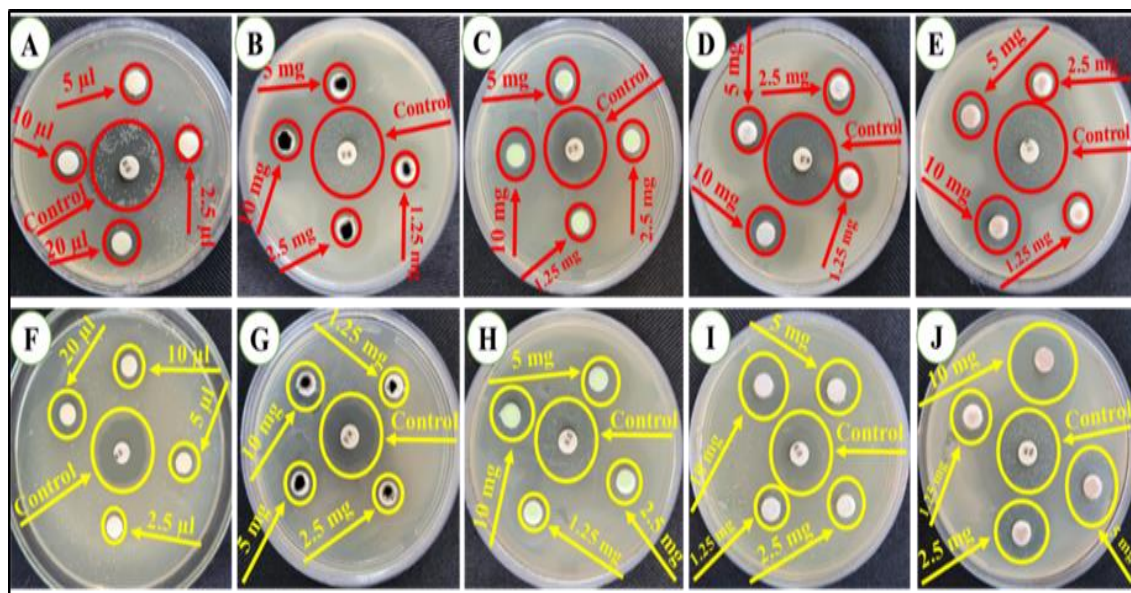


شکل ۴. اندازه هاله ناشی از فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی رازیانه (*F. vulgare*) و نانوذرات اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی بیوستنز شده

Figure 4. Halo size caused by the antibacterial activity of aqueous extract of *F. vulgare* and biosynthesized iron oxide, copper, silver and zinc oxide nanoparticles

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی MIC: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان داد که میزان زندهمانی (IC_{50})

دو گونه باکتری، *E. coli* و *S. aureus* به طور معنی داری ($p < 0.01$) تحت تأثیر عوامل بازدارنده رشد (رشد عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی بیوستنز شده از آن) قرار گرفت (جدول ۲).



شکل ۵. اندازه هاله ایجاد شده بر روی باکتری *S. aureus* حاصل از: A) عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*)، B) نانوذرات اکسید آهن، C) مس، D) اکسیدروی و E) نقره بیوسنتز شده؛ اندازه هاله ایجاد شده بر روی باکتری *E. coli* حاصل از F) عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*)، G) نانوذرات اکسید آهن، H) مس، I) اکسیدروی و J) نقره بیوسنتز شده. هم‌چنین از دیسک‌های حاوی تتراسایکلین به عنوان شاهد در هر دو گونه باکتری استفاده شد

Figure 5. The size of the halo created on *S. aureus* bacteria obtained from: A) aqueous extract of fennel plant (*F. vulgare*), B) nanoparticles of iron oxide, C) copper, D) zinc oxide and E) biosynthesized silver; The halo size created on *E. coli* bacteria obtained from (F) aqueous extract of fennel plant (*F. vulgare*), (G) nanoparticles of iron oxide, (H) copper, (I) zinc oxide, and (J) biosynthesized silver. Discs containing tetracycline were used as controls in both types of bacteria

طبق نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* میزان IC_{50} (غلظتی که می‌تواند حداقل ۵۰ درصد جمعیت باکتری (*S. aureus* و *E. coli*) را از بین ببرد) ثبت شده بین عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*) و نانوذرات فلزی حاصل از آن اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. به عبارتی دیگر جهت از بین بردن حداقل ۵۰ درصد باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* به غلظت بالاتری از عصاره آبی گیاه رازیانه در مقایسه با نانوذرات ذکر شده نیاز است. هم‌چنین از نظر میزان IC_{50} بین نانوذرات فلزی نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد به طوری‌که نانوذره آهن بیوسنتز شده به طور معنی‌داری میزان IC_{50} بیشتری نسبت به سایر نانوذرات داشت (شکل ۶ و شکل ۷).

به طور کلی همانطوریکه در شکل ۶ مشاهده می‌شود، باکتری *E. coli* در مقایسه با باکتری *S. aureus* در برابر غلظت‌های برابر عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن حساس‌تر بوده و میزان IC_{50} کمتری نسبت به باکتری *S. aureus* دارد اما این اختلاف معنی دار نبود. بیشترین (۲/۶ میکرولیتر در میلی‌لیتر) و کمترین (۰/۹۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) میزان IC_{50} برای هر دو باکتری *S. aureus* و *E. coli* به ترتیب مربوط به عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات مس و اکسیدروی بیوسنتز شده از آن بود.

جدول ۲. میانگین مربعات تأثیر عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی بیوسنتز شده از آن بر میزان زنده‌مانی (IC_{50}) باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli*

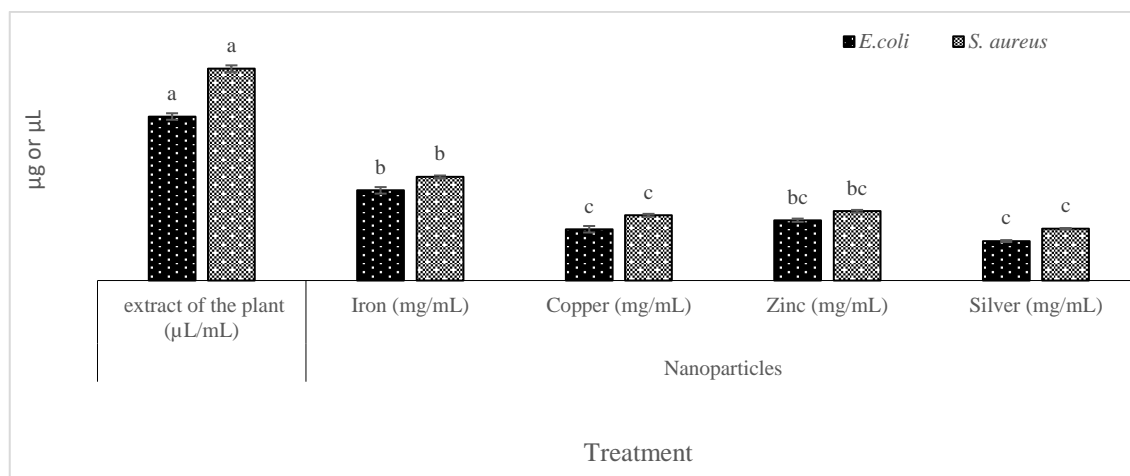
Table 2. Mean square effect of aqueous extract of *F. vulgare* and biosynthesized iron oxide, copper, silver and zinc oxide nanoparticles from it on the survival rate (IC_{50}) of *S. aureus* and *E. coli*

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	مربعات میانگین MS	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Between different Treatments	4	5.39**	3.18**
Error خطا	10	0.009	0.007
CV (%) ضریب تغییرات (درصد)	-	4.03	5.46

**Significance at the 1% probability level

بحث

نانوتکنولوژی در بسیاری از زمینه‌ها از جمله داروسازی، الکترونیک، بهداشت، تغذیه، علوم زیستی، پزشکی (درمان سرطان، آلرژی، دیابت و التهاب)، انتقال ژن، صنایع شیمیایی، علم انرژی، لوازم آرایشی، صنایع مکانیکی و فضایی کاربرد دارد (Bourang et al. 2024). نانوذرات به خصوص نانوذرات فلزی به دلیل اندازه کوچک‌شان توانایی نفوذ به درون عوامل میکروبی و نابودی آن‌ها را دارند (Shaaban et al. 2021). سنتز سبز نانوذرات فلزی از گیاهان دارویی به دلیل زیست‌سازگاری بالاتر، پایدارتر، سمیت کم، تولید ارزان و فرایند تولید آسان نسبت به روش‌های شیمیایی بسیار مهم است.

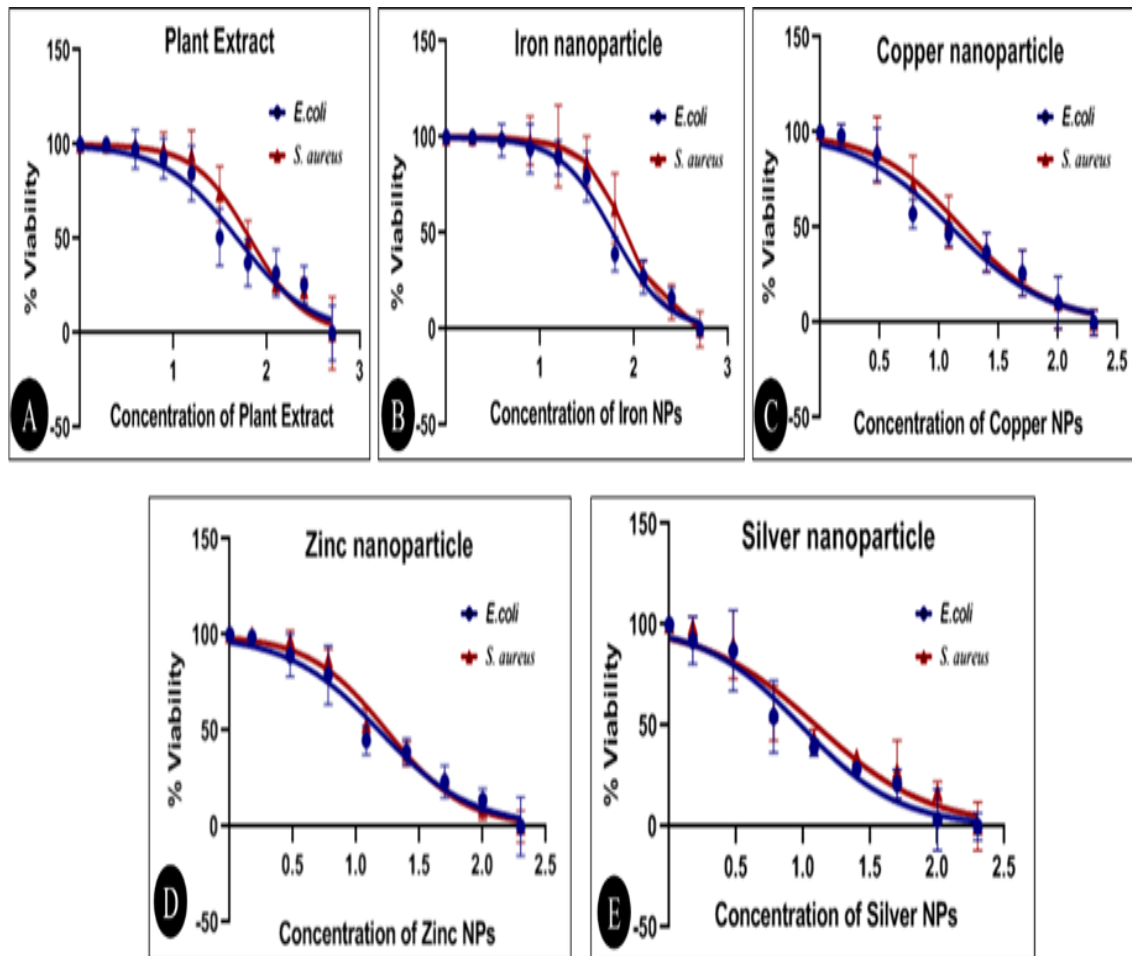


شکل ۶. میزان IC_{50} باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*)، نانوذرات بیوسنتز شده اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی

Figure 6. The IC_{50} value of *S. aureus* and *E. coli* bacteria under the influence of different concentrations of aqueous extract of *F. vulgare*, biosynthesized nanoparticles of iron oxide, copper, silver and zinc oxide

وجود میزان بالای ترکیبات دارویی و با ارزش همانند فلاونوئیدها، فنل‌ها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها و آلکالوئیدها در گیاهان دارویی امکان تثبیت، اکسیداسیون و در نتیجه سنتز نانوذرات فلزی را فراهم می‌نماید (Ishak et al. 2019). گیاه رازیانه به عنوان گیاه دارویی با ارزش دارای ترکیبات با ارزش دارویی از جمله میزان بالای فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی می‌باشد (Anka et al. 2020). به دلیل عدم وجود گزارش‌های مختلف در مورد تولید نانوذرات فلزی و تأثیرات آن بر روی رشد باکتری‌های مختلف، در این پژوهش به بررسی ویژگی‌های مختلف عصاره آبی گیاه رازیانه *F. vulgare* و نانوذرات اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی بیوسنتز شده از آن از جمله ویژگی آنتی‌اکسیدانی و مورفولوژیکی و هم چنین خواص ضدباکتری این ترکیبات بر روی دو گونه باکتری *E. coli* و *S. aureus* مورد بررسی قرار گرفت.

عصاره‌ی قسمت‌های مختلف از جمله دانه‌ها، پوست ساقه و برگ‌های گیاه *F. vulgare* خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند (Di Napoli et al. 2022). هم‌راستا با نتایج به دست آمده در این پژوهش، Jafarirad و Poorgholi (2015) با بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گیاه شاه‌تره (*Fumaria officinalis*) و نانوذرات مس و نقره بیوسنتز شده از آن به کمک روش DPPH، بیان کردند که با افزایش غلظت عصاره آبی و نانوذرات بیوسنتز شده میزان خواص آنتی‌اکسیدانی آن افزایش می‌یابد (Jafarirad & Poorgholi 2015).



شکل ۷. نمودار زنده‌مانی باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* تحت تأثیر غلظت‌های مختلف (A) عصاره آبی گیاه رازیانه (*F. vulgare*)، نانوذره بیوسنتز شده اکسید آهن (B)، مس (C)، اکسیدروی (D) و نقره (E)

Figure 7. Survival diagram of *S. aureus* and *E. coli* bacteria under the influence of different concentrations A) aqueous extract of *F. vulgare*, biosynthesized nanoparticle of iron oxide (B), copper (C), zinc oxide (D) and silver (E)

لکترین محلول در عصاره آبی جدا شده از دانه، پوست ساقه و برگ‌های رازیانه اثرات مهارکنندگی بر رشد و بقا و گونه‌های مختلف باکتری‌های بیماری‌زا دارد (Barrahi et al. 2020). در پژوهشی Kakhki et al. (2020) بیان کردند که با افزایش غلظت نانوذرات نقره و مس بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه مرزنجوش (*Origanum majorana*)، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها افزایش می‌یابد (Kakhki et al. 2020). طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش مشخص شد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گیاه *F. vulgare* و نانوذرات بیوسنتز شده اکسید آهن، مس، نقره و اکسیدروی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، افزایش یافت (شکل ۱). نانوذرات اکسید آهن به ویژه نانوذرات سوپر پارامغناطیسی (Fe_3O_4) به دلیل سمیت پایین،

زیست‌سازگارپذیری خوب و عدم حفظ ویژگی مغناطیسی بعد از حذف میدان مغناطیسی خارجی، در اکثر پژوهش‌های علمی مورد آزمایش قرار می‌گیرد (Sutunkova et al. 2023). همچنین، می‌توان نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن را با گروه‌هایی مانند NH_2 ، $-\text{COOH}$ ، $-\text{OH}$ عامل‌دار نمود (Surpi et al. 2023).

در پژوهشی (Salem et al. 2020) با بررسی تولید و خواص ویژگی‌های نانوذرات اکسید آهن از عصاره آبی جلبک دریایی، بیان کردند که نانوذرات تولید شده دارای اندازه‌ای بین ۲۵ الی ۴۵ نانومتر می‌باشند و همچنین از نظر ماهیت مغناطیسی، ابرپارامغناطیس و مغناطیس نرم هستند. آن‌ها همچنین گزارش دادند که با توجه به رنگ نانوذرات (پودر سیاه رنگ)، دمای واکنش و همچنین بررسی پیک‌های XRD می‌توان نتیجه گرفت که بیشترین مقدار نانوذرات تهیه شده از نوع Fe_3O_4 می‌باشد (Salem et al. 2020). همچنین (Koohsari et al 2017) با بررسی نتایج حاصل از عکس‌های SEM بیان کردند که نانوذرات اکسید آهن، مس و نقره بیوسنتز شده از گیاه علف چای (*Hypericum perforatum*) دارای اندازه‌ای مابین ۳۲ الی ۳۸ نانومتر می‌باشد و از خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردارند (Koohsari et al. 2017) که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد (شکل ۲-A، B و C). پیک‌های مشاهده شده در طیف XRD نانوذرات اکسید آهن، مس و نقره بیوسنتز شده در این تحقیق، با نتایج گزارش شده توسط سایر محققین (Koohsari et al. 2017; Mahmoudi et al. 2020; Thakar et al. 2022) نیز مطابقت داشت.

علاوه بر این، گزارش شده است که عصاره آبی گیاه *F. vulgare* حاوی اثرات ضدباکتری و قارچ‌کشی قدرتمند است (Belabdelli et al. 2020). عصاره اتانول پوست و ریشه گیاه *F. vulgare* دارای فعالیت‌های ضدباکتری و ضدقارچی است (Suleiman & Helal 2022). عصاره آبی حاصل از پوست ساقه این گیاه اثر ضد باکتریایی علیه *E. coli* دارد (Erdoğan 2023). همچنین (Di Napoli et al. 2022) با بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس حاصل از برگ گیاه *F. vulgare* بر رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی از جمله باکتری‌های گرم منفی *E. coli*، *S. Typhimurium* و *P. aeruginosa* و باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus*، *M. smegmatis* و *B. cereus* گزارش کردند که سویه‌های *S. aureus*، *B. cereus* و *E. coli* به غلظت‌های بالای اسانس گیاه رازیانه حساس هستند (۱۰۰ درصد مرگ در غلظت $200 \mu\text{g/mL}$)، درحالی‌که باکتری *M. smegmatis* و *P. aeruginosa* در برابر عصاره گیاه رازیانه مقاومت نسبی داشته‌اند (۸۰ درصد مرگ و میر در غلظت $200 \mu\text{g/mL}$) و سویه *S. Typhimurium* در برابر اسانس رازیانه کاملاً مقاوم بوده‌است (۵۰ درصد مرگ و میر در غلظت $200 \mu\text{g/mL}$) (Di Napoli et al. 2022) که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. در این پژوهش مشخص شد که ممانعت از رشد باکتری‌ها در هر دو گونه *E. coli* و *S. aureus* توسط عصاره آبی گیاه *F. vulgare* وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد (شکل ۴ و شکل ۵-A و F). همچنین مشخص شد که در غلظت‌های برابر عصاره آبی حاصل، باکتری‌های *E. coli* نسبت به باکتری *S. aureus* حساس‌تر است.

در پژوهشی (Liaqat et al. 2022)، با بررسی تأثیر خواص ضدباکتریایی نانوذرات مس، اکسید آهن و نقره بیوسنتز شده بیان کردند که باکتری‌های گرم منفی (*E. coli*) نسبت به گرم مثبت (*S. aureus*) در برابر نانوذرات بیوسنتز شده حساس‌تر بودند (Liaqat et al. 2022) که با نتایج حاصل از پژوهش ما مطابقت دارد، به طوری که باکتری *S. aureus* نسبت به باکتری *E. coli* در برابر غلظت‌های برابر نانوذرات مس، اکسید آهن و نقره بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه *F. vulgare* مقاومت بیشتری داشتند (شکل ۴ و ۵).

نانوذرات مس و نقره با هدف قرار دادن غشاء سلولی باکتری پتانسیل غشایی پلاسما را ناپایدار می‌کند که این امر باعث کاهش سطح آدنوزین تری فسفات (ATP) درون سلول باکتری شده و موجب مرگ آن می‌شود (Jeevanandam & San 2022). همچنین نانوذرات نقره با ایجاد پیوند با گروه‌های عاملی پروتئین‌های موجود در باکتری‌ها موجب تغییر در شکل و فعالیت آن‌ها و در نتیجه باعث مرگ آن‌ها می‌شود (Islam et al. 2021). علاوه بر این، نانوذرات فلزی به خصوص نقره، اکسیدروی و مس با ورود به درون سلول باکتری موجب تغییر در فعالیت آنزیم‌های کلیدی و در نتیجه مرگ باکتری‌ها می‌شوند (Ahmed et al. 2020). در پژوهشی (Azizian et al. 2023) با بررسی تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی گیاه آقوی (*Polygonum aviculare L.*) بر باکتری‌های کشت شده بیان کردند که این نانوذرات از رشد باکتری *E. coli* ممانعت می‌کند (Larijani & Aziziyan 2023). همچنین (Nagarajan et al. 2023) گزارش کردند که نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره گیاه بهار نارنج (*Citrus aurantium*) رشد باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* را مهار می‌کنند که با نتایج ما در این پژوهش مطابقت دارد (Nagarajan et al. 2023). اندازه هاله‌های تولید شده در پلیت حاوی باکتری *E. coli* و *S. aureus* توسط نانوذرات نقره بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه *F. vulgare* در غلظت‌های برابر به طور معنی‌داری بزرگ‌تر از نانوذرات اکسید آهن، مس و اکسیدروی بیوسنتز شده توسط همان عصاره آبی بود (شکل ۴ و شکل ۵-E و J).

نتیجه‌گیری: در سال‌های اخیر پیشرفت‌هایی در زمینه نانوتکنولوژی جهت سنتز نانوناقل‌ها با قابلیت ارسال هدفمند دارو جهت مقابله با عوامل بیماری‌زا انجام گرفته است. از جمله نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از گیاهان دارویی می‌توان به نانوذرات طلا، نقره، مس، روی، نیکل و آهن اشاره نمود که در پژوهش‌های مختلف اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. در این پژوهش از گیاه رازیانه جهت بیوسنتز نانوذرات اکسید آهن، مس، اکسیدروی و نقره و تأثیرات ضدباکتریایی عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات فلزی بیوسنتز شده از آن استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش نانوذره نقره بیوسنتز شده از عصاره آبی گیاه رازیانه با بالاترین میزان خاصیت ضدباکتریایی خود، بهترین عملکرد را داشت. استفاده از طیف بیشتر باکتری‌ها در بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره آبی گیاه رازیانه و نانوذرات اکسید آهن، مس، اکسیدروی و نقره بیوسنتز شده از آن در پژوهش‌های آتی می‌تواند به تکمیل اطلاعات مربوط به خاصیت ضدباکتریایی گیاه دارویی رازیانه کمک شایانی نماید.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر حمایت مالی و حمایت معنوی در اجرای پژوهش

حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- محمدآبادی محمدرضا، گلکار افروز، عسکری حسنی مجید (۱۴۰۲) اثر رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر بیان ژن فاکتور ۱ رشد شبه انسولین در بافت شکمبه گوسفند کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۴)، ۲۳۹-۲۵۶.
- جعفری احمدآبادی سید علی اصغر، عسکری همت حشمت‌اله، محمدآبادی محمدرضا (۱۴۰۲) تاثیر شاهدانه بر بیان ژن DLK1 در بافت قلب بره‌های کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۱)، ۲۱۷-۲۳۴.
- شکری سمیرا، خضری امین، محمدآبادی محمدرضا، خیرالدین حمید (۱۴۰۲) بررسی بیان ژن MYH7 در بافت‌های ران، دست و راسته بره‌های پرواری نژاد کرمانی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۵(۲)، ۲۱۷-۲۳۶.

References

- Ahmadi-Nouraldinvand F, Bourang S, Azizi S et al. (2024) Preparation and characterization of multi-target nanoparticles for co-drug delivery. *Med Drug Discov* 21, 100177.
- Ahmed T, Shahid M, Noman M et al. (2020) Silver nanoparticles synthesized by using *Bacillus cereus* SZT1 ameliorated the damage of bacterial leaf blight pathogen in rice. *Pathogens* 9, 160.
- Ajinkya N, Yu X, Kaithal P et al. (2020) Magnetic iron oxide nanoparticle (IONP) synthesis to applications: present and future. *Materials* 13, 4644.
- Akbari A, Akbarzadeh A, Tehrani MR et al. (2020) Development and characterization of nanoliposomal hydroxyurea against BT-474 breast cancer cells. *Adv Pharm Bull* 10, 39.
- Alizadeh BB, Tabatabaei YF, Noorbakhsh H et al. (2016) Study of the antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of *Myrtus communis* on pathogenic strains causing infection.
- Alshareef F (2021) Protocol to Evaluate Antibacterial Activity MIC, FIC and Time Kill Method. *ASMI* (ISSN: 2581-3226) 4.
- Amirteymoori E, Khezri A, Dayani O, et al. (2021) Effects of linseed processing method (ground versus extruded) and dietary crude protein content on performance, digestibility, ruminal fermentation pattern, and rumen protozoa. *Italian J Anim Sci* 20(1), 1506-1517.
- Anka Z, Gimba S, Nanda A, Salisu L (2020) Phytochemistry and pharmacological activities of *Foeniculum vulgare*. *IOSR J Pharm* 10, 1-10.

- Arshad R, Gulshad L, Haq IU et al. (2021) Nanotechnology: A novel tool to enhance the bioavailability of micronutrients. *Food Science & Nutrition* 9, 3354-3361.
- Bankier C, Matharu R, Cheong Y et al. (2019) Synergistic antibacterial effects of metallic nanoparticle combinations. *Sci Rep* 9, 16074.
- Barrahi M, Esmail A, Elhartiti H et al. (2020) Chemical composition and evaluation of antibacterial activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) seed essential oil against some pathogenic bacterial strains. *Casp J Environ* 18, 295-307.
- Belabdelli F, Piras A, Bekhti N et al. (2020) Chemical composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. *Chem Afr* 3, 323-328.
- Belete TM (2019) Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents. *Hum. Microbiome J* 11, 100052.
- Bhuyan T, Mishra K, Khanuja M et al. (2015) Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles from *Azadirachta indica* for antibacterial and photocatalytic applications. *Mater Sci Semicond Process* 32, 55-61.
- Bourang S, Asadian S, Noruzpour M et al. (2024a) PLA-HA/Fe₃O₄ magnetic nanoparticles loaded with curcumin: physicochemical characterization and toxicity evaluation in HCT116 colorectal cancer cells. *SN Appl Sci* 6, 186.
- Bourang S, Noruzpour M, Azizi S et al. (2024b) Synthesis and in vitro characterization of PCL-PEG-HA/FeCo magnetic nanoparticles encapsulating curcumin and 5-FU. *Nanomed J* 11.
- Bourang S, Noruzpour M, Jahanbakhsh Godekahriz S et al. (2024) Application of nanoparticles in breast cancer treatment: a systematic review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1-47.
- Brindhadevi K, Samuel MS, Verma TN et al. (2020) Zinc oxide nanoparticles (ZnONPs)-induced antioxidants and photocatalytic degradation activity from hybrid grape pulp extract (HGPE). *Biocatal Agric Biotechnol* 28, 101730.
- Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N (2021) Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *Int J Mol Sci* 22, 7202.
- Dappula SS, Kandrakonda YR, Shaik JB et al. (2023) Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using aqueous extract of *Andrographis alata*: Characterization, optimization and assessment of their antibacterial, antioxidant, antidiabetic and anti-Alzheimer's properties. *J Mol Struct* 1273, 134264.
- Di Napoli M, Castagliuolo G, Badalamenti N et al. (2022) Antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant properties of essential oil of *Foeniculum vulgare* Mill. leaves *Plants* 11, 3573.
- Duan J, Du J, Jin R et al. (2019) Iron oxide nanoparticles promote vascular endothelial cells survival from oxidative stress by enhancement of autophagy. *Regen Biomater* 6, 221-229.

- Dulińska-Litewka J, Łazarczyk A, Hałubiec P et al. (2019) Superparamagnetic iron oxide Nanoparticles-Current and prospective medical applications. *Materials* 12, 617.
- Erdoğan Eliuz EA (2023) Antimicrobial performance of methanol extract of *Foeniculum vulgare* Mill. as a sanitizer agent. *Indian J Exp Biol* 61, 124-130.
- Flieger J, Flieger W, Baj J, Maciejewski R (2021) Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials* 14, 4135.
- Hajalizadeh Z, Dayani O, Khezri A, et al. (2019) The effect of adding fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder to the diet of fattening lambs on performance, carcass characteristics and liver enzymes. *Small Rumin Res* 175, 72-77.
- Hasan AA, Tatarskiy V, Kalinina E (2022) Synthetic pathways and the therapeutic potential of quercetin and curcumin. *Int. J. Mol. Sci* 23, 14413.
- Hasan TH, Al-Harmoosh RA (2020) Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. *Sys Rev Pharm* 11, 817-823.
- Ishak NM, Kamarudin S, Timmiati S (2019) Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles via plant extracts: an overview. *Mater Res Express* 6, 112004.
- Islam MA, Jacob MV, Antunes E (2021) A critical review on silver nanoparticles: From synthesis and applications to its mitigation through low-cost adsorption by biochar. *J Environ Manag* 281, 111918.
- Jadoun S, Arif R, Jangid NK, Meena RK (2021) Green synthesis of nanoparticles using plant extracts: A review. *Environ Chem Lett* 19, 355-374.
- Jafari Ahmadabadi SAA, Askari-Hemmat H, Mohammadabadi M, et al. (2023) The effect of Cannabis seed on DLK1 gene expression in heart tissue of Kermani lambs. *Agric Biotechnol J* 15 (1), 217-234 (In Persian).
- Jafarirad S, Poorgholi S (2015) Synthesis of CuO nanoparticles and investigation on their applications in preparing hair color.
- Jeevanandam J, San Chan Y (2022) *In vitro* and *in vivo* toxicity of metal nanoparticles and their drug delivery applications. In: *Applications of Nanotechnology in Drug Discovery and Delivery*. Elsevier pp. 367-421.
- Kakhki MT, Sedaghat N, Mohsenzadeh M (2020) Chemical composition, antioxidative, antibacterial, and time-kill activities of some selected plant essential oils against foodborne pathogenic and spoilage organisms. In: *Veterinary Research Forum*. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia Iran pp. 339.

- Khan MI, Ahhmed A, Shin JH et al. (2018) Green tea seed isolated saponins exerts antibacterial effects against various strains of gram positive and gram negative bacteria, a comprehensive study *in vitro* and *in vivo*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2018.
- Kheiri S, Liu X, Thompson M (2019) Nanoparticles at biointerfaces: Antibacterial activity and nanotoxicology. Colloids Surf B 184, 110550.
- Kianfar E (2020) Importance & Applications of Nanotechnology. MedDocs Publishers.
- Koohsari H, Khormali H, Khormali A (2017) Evaluation of flavonoids and phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. Collected from two sites in North Country. J Med Plants Res 5, 78-90.
- Küünel S, Rauwel P, Rauwel E (2018) Plant extract mediated synthesis of nanoparticles. In: Emerging applications of nanoparticles and architecture nanostructures. Elsevier pp. 411-446.
- Larijani K, Aziziyan F (2023) Green synthesis of silver nanoparticles from *Polygonum aviculare* L. extract, evaluation of antibacterial, antioxidant activity.
- Liaqat N, Jahan N, Anwar T, Qureshi H (2022) Green synthesized silver nanoparticles: Optimization, characterization, antimicrobial activity, and cytotoxicity study by hemolysis assay. Front Chem 10, 952006.
- Mahmoudi R, Aghaei S, Salehpour Z et al. (2020) Antibacterial and antioxidant properties of phyto-synthesized silver nanoparticles using *Lavandula stoechas* extract. Appl Organomet Chem 34, e5394.
- Maliki M, Ifijen IH, Ikhuoria EU et al. (2022) Copper nanoparticles and their oxides: optical, anticancer and antibacterial properties. Int Nano Lett 12, 379-398.
- Mohammadabadi M, Golkar A, Askari Hesni M (2023) The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. Agricultural Biotechnology Journal 15(4), 239-256.
- Mohd Yusof H, Abdul Rahman NA, Mohamad R et al. (2020) Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles by cell-biomass and supernatant of *Lactobacillus plantarum* TA4 and its antibacterial and biocompatibility properties. Sci Rep 10, 19996.
- Nagarajan P, Subramanian V, Elavarasan V et al. (2023) Biofabricated Aluminium Oxide Nanoparticles Derived from *Citrus aurantium* L.: Antimicrobial, Anti-Proliferation, and Photocatalytic Efficiencies. Sustainability 15, 1743.
- Niño-Martínez N, Salas Orozco MF, Martínez-Castañón G-A et al. (2019) Molecular mechanisms of bacterial resistance to metal and metal oxide nanoparticles. Int J Mol Sci 20, 2808.

- Noruzpuor M, Asghari Zakaria R, Zare N et al. (2024) Green synthesis of metal nanoparticles using aqueous extract of *Moringa oleifera* L. and investigating their antioxidant and antibacterial properties. Applied Chemistry Today.
- Pal G, Rai P, Pandey A (2019) Green synthesis of nanoparticles: A greener approach for a cleaner future. In: Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles. Elsevier pp. 1-26.
- Rajeshkumar S, Menon S, Kumar SV et al. (2019) Antibacterial and antioxidant potential of biosynthesized copper nanoparticles mediated through *Cissus arnotiana* plant extract. J Photochem Photobiol 197, 111531.
- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, et al. (2022) An *Origanum majorana* Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. Animals 13(1), e14.
- Safaei SMH, Mohammadabadi M, Moradi B, et al. (2023) Role of Fennel (*Foeniculum vulgare*) Seed Powder in Increasing Testosterone and IGF1 Gene Expression in the Testis of Lamb. Gene Expr 4, 1-20.
- Salem DM, Ismail MM, Tadros HR (2020) Evaluation of the antibiofilm activity of three seaweed species and their biosynthesized iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄-NPs). Egypt J Aquat Res 46, 333-339.
- Samuel MS, Jose S, Selvarajan E et al. (2020) Biosynthesized silver nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens*; Application for cytotoxicity effect on A549 cell line and photocatalytic degradation of p-nitrophenol. J Photochem Photobiol 202, 111642.
- Sánchez-López E, Gomes D, Esteruelas G et al. (2020) Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: an overview. Nanomaterials 10, 292.
- Saqib S, Munis MFH, Zaman W et al. (2019) Synthesis, characterization and use of iron oxide nano particles for antibacterial activity. Microscopy research and technique 82, 415-420.
- Shaaban MT, Ghaly MF, Fahmi SM (2021) Antibacterial activities of hexadecanoic acid methyl ester and green-synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. J Basic Microbiol 61, 557-568.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2022) Effect of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Seed Powder Consumption on Insulin-like Growth Factor 1 Gene Expression in the Liver Tissue of Growing Lambs. Gene Express 21(2), 21-26.
- Shokri S, Khezri A, Mohammadabadi M, Kheyrodin H (2023). The expression of MYH7 gene in femur, humeral muscle and back muscle tissues of fattening lambs of the Kermani breed. Agric Biotechnol J 15 (2), 217-236 (In Persian).

- Singh R, Hano C, Nath G, Sharma B (2021) Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Carissa carandas* L. and their antioxidant and antimicrobial activity against human pathogenic bacteria. *Biomolecules* 11, 299.
- Siva S, Li C, Cui H et al. (2020) Encapsulation of essential oil components with methyl- β -cyclodextrin using ultrasonication: Solubility, characterization, DPPH and antibacterial assay. *Ultrason. Sonochem* 64, 104997.
- Suleiman WB, Helal EE-H (2022) Chemical constituents and potential pleiotropic activities of *Foeniculum vulgare* (Fennel) ethanolic extract; *in vitro* approach. *Egypt. J Chem* 65, 617-626.
- Surpi A, Murgia M, López-Amoedo S et al. (2023) Magnetic separation and concentration of A β 1–42 molecules dispersed at the threshold concentration for Alzheimer’s disease diagnosis in clinically-relevant volumes of sample. *J Nanobiotechnology* 21, 329.
- Sutunkova MP, Klinova SV, Ryabova YV et al. (2023) Comparative Evaluation of the Cytotoxic Effects of Metal Oxide and Metalloid Oxide Nanoparticles: An Experimental Study *Int J Mol Sci* 24, 8383.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A et al. (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18, 318-327.
- Tang S, Zheng J (2018) Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects. *Adv Healthc Mater* 7, 1701503.
- Thakar MA, Jha SS, Phasinam K et al. (2022) X ray diffraction (XRD) analysis and evaluation of antioxidant activity of copper oxide nanoparticles synthesized from leaf extract of *Cissus vitifolia*. *Mater Today Proc* 51, 319-324.
- Thakur PK, Verma V (2021) A review on green synthesis, characterization and anticancer application of metallic nanoparticles. *Appl Biochem Biotechnol* 193, 2357-2378.
- Usman M, Farooq M, Wakeel A et al. (2020) Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. *Sci Total Environ* 721, 137778.
- Vahabzadeh M, Chamani M, Dayani O, et al. (2020) Effect of *Origanum majorana* leaf (*Sweet marjoram*) feeding on lamb’s growth, carcass characteristics and blood biochemical parameters. *Small Rumin Res* 192, e106233.
- Vahabzadeh M, Chamani M, Dayani O, et al. (2021) Effects of Sweet Marjoram (*Origanum majorana*) Powder on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Rumen Fermentation, Meat Quality and Humoral Immune Response in Fattening Lambs. *Iran J Appl Anim Sci* 11(3), 567-576.

- Wei Y, Quan L, Zhou C, Zhan Q (2018) Factors relating to the biodistribution & clearance of nanoparticles & their effects on *in vivo* application. *Nanomedicine* 13, 1495-1512.
- Yaqoob AA, Umar K, Ibrahim MNM (2020) Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications—a review. *Appl Nanosci* 10, 1369-1378.
- Yusof NAA, Zain NM, Pauzi N (2019) Synthesis of ZnO nanoparticles with chitosan as stabilizing agent and their antibacterial properties against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Biol Macromol* 124, 1132-1136.
- Zheng W, Zhou Q, Yuan C (2021) Nanoparticles for oral cancer diagnosis and therapy. *Bioinorg Chem* 2021, e9977131.