

فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره‌ی سنتز شده با عصاره‌ی آبی سماق و نانوکامپوزیت نقره -

کیتوزان علیه *Xanthomonas perforans*

زهرا ربیعی^۱، فاطمه شهریاری^۲* و سمیه صدیقیان^۳

۱. دانشجوی ارشد سابق گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲. استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۳. استادیار گروه تحقیقات زیست مواد دارویی زنجان، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

*نویسنده مسئول: shahryari@znu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۳

چکیده

یکی از زمینه‌های کاربردی نانوتکنولوژی استفاده از نانوذرات مختلف در مدیریت بیماری‌های گیاهی است. لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی ناشی از باکتری *Xanthomonas perforans* یکی از بیماری‌های مهم است که باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره‌ی بیوسنتز شده و نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان علیه عامل بیماری لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی انجام شد. نانوذرات به روش سنتز سبز و با عصاره‌ی آبی سماق سنتز شدند. اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف نانوذرات با روش حداقل غلظت مهارکنندگی سنجیده شد. تشخیص نانوذرات سنتز شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی و الگوی پراش اشعه ایکس انجام شد. نانوذرات نقره و نانوکامپوزیت شبه کروی با اندازه‌ی میانگین به ترتیب ۳۵ و ۵۰ نانومتر سنتز شدند. حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره در غلظت ۱۷ میلی‌گرم بر لیتر و نانوکامپوزیت در ترکیب سه میلی‌گرم بر لیتر نانوذره نقره و ۶/۹۴ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان تعیین شد. در آزمایشات گلخانه‌ای نیز نانوذرات نقره در غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر شدت بیماری لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی را روی نشاءها در مقایسه با شاهد کاهش دادند که بیشترین کاهش با ۹۱/۱۱ درصد مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. همچنین شدت بیماری با استفاده از نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان هم در سطح معنی‌داری کاهش یافت. نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذرات بیوسنتز شده علیه باکتری مورد مطالعه فعالیت ضدباکتریایی موثری داشتند.

واژه‌های کلیدی: حداقل غلظت مهارکنندگی، شدت بیماری، لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی، نانوتکنولوژی.

مقدمه

صورت گسترش لکه‌ها در برگ، خطر بی‌برگ شدن گیاه وجود دارد. لکه‌های کوچک و قهوه‌ای تیره روی میوه-های نارس و رسیده و کاسبرگ‌ها نیز ایجاد می‌شود. این بیماری بذبرد بوده که بذره‌های آلوده منبع اصلی آلودگی اولیه و به مقدار کمتری آلودگی ثانویه هستند (Osdaghi et al., 2016).

شدت علائم بیماری با استفاده از استرپتومایسین، سولفات مس، مس-مانکوزب و سایر سموم شیمیایی مبتنی بر مس کاهش می‌یابد (Potnis et al., 2015). امروزه نانوتکنولوژی راهی جدید برای کنترل عوامل میکروبی پیش روی انسان قرار داده‌است که در بین انواع مختلف نانوذرات، نانوذرات نقره به‌صورت موثر

بیماری لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی توسط گونه‌های *X. vesicatoria*، *Xanthomonas euvesicatoria*، *X. perforans* و *X. gardneri* ایجاد می‌شود (Constantin et al., 2016) و کاهش قابل توجهی در عملکرد محصول ایجاد می‌کند (Paret et al., 2012). این بیماری در ایران اولین بار از شهرستان کازرون واقع در استان فارس گزارش شده‌است. علایم ابتدا به صورت لکه‌های کوچک، روغنی و نامنظم در سطح زیرین برگها است. لکه‌ها ابتدا سبز تیره و منفرد هستند که به تدریج بنفش و خاکستری با مرکز سیاه می‌شوند. ممکن است هاله‌ی سفید یا زرد رنگ در اطراف لکه‌ها به‌وجود آید. در

aeruginosa بررسی شده است (Lokina et al., 2014). مطالعات معدودی از اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی موثر نانوذرات نقره روی بیمارگرهای گیاهی از قبیل *Rhizoctonia solani*، *Sclerotinia sclerotiorum*، *Magnaporthe grisea*، *Bipolaris sorokiniana*، *X. campestris*، *Colletotrichum gloeosporioides*، *Clavibacter michiganensis* pv. *campestris*، *X. axonopodis* pv. *subsp. michiganensis* و *malvacearum* (Chowdappa and Gowdan, 2013; Rivas-cáceres et al., 2018; Vanti et al., 2019) گزارش شده است. همچنین نانوذرات نقره و کامپوزیت نانوذرات نقره-اکسید گرافن در شرایط آزمایشگاه و گلخانه روی گیاه گوجه‌فرنگی فعالیت ضدباکتریایی موثری علیه باکتری *X. perforans* نشان دادند (Ocsoy et al., 2013). اثر ضدباکتریایی موثر کیتوزان در شرایط آزمایشگاه علیه باکتری‌های *X. oryzae* pv. *oryzae*، *Pectobacterium* و *Agrobacterium tumefaciens* و در آزمون گلخانه‌ای علیه *Acidovorax citrulli* گزارش شده است (Li et al., 2015; Xing et al., 2011). این پژوهش با هدف بررسی خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره‌ی سماق و کیتوزان و همچنین بررسی افزایش احتمالی فعالیت ضد میکروبی نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان روی باکتری *X. perforans* (Xp) در شرایط آزمایشگاه و گلخانه انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی جدایه‌ی باکتری *X. perforans* و انجام آزمون بیماریزایی:

جدایه‌ی باکتری مذکور از آزمایشگاه باکتری-شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه شد. برای آزمون بیماریزایی از کشت شبانه باکتری روی محیط کشت نوترینت آگار سوسپانسیون سه میلی‌لیتری با غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر تهیه و روی برگ‌های گوجه‌فرنگی رقم پولاد در مرحله‌ی چهار برگی محلول پاشی شد و گیاهان به مدت دو هفته در شرایط گلخانه نگهداری شدند (Osdaghi et al., 2016). همچنین

علیه عوامل بیماریزا استفاده می‌شود (Sharma et al., 2009). چندین روش جهت سنتز نانوذرات نقره وجود دارد که از بین آنها روش سنتز سبز از جهت به حداقل رساندن اثرات زیست محیطی بسیار مناسب و مقرون به‌صرفه است (Khamhaengpol and Siri, 2017). اختلاف بین بار منفی میکروارگانیزم و بار مثبت نانوذره، به‌صورت الکترومغناطیس جاذب عمل کرده و باعث اتصال نانوذره به سطح سلول می‌شود. هر چه نانوذرات کوچکتر باشند، نسبت سطح به حجم افزایش یافته و تعداد یون بیشتری آزاد می‌شود و در نتیجه خاصیت ضد میکروبی بیشتری از خود نشان می‌دهند (نقش و همکاران، ۱۳۹۲). یون‌های نقره با گروه‌های تیول، کربوکسیل، هیدروکسیل، آمینو و فسفات پروتئین‌ها و آنزیم‌های غشاء باکتریایی در تعامل بوده و باعث تغییر ساختار غشای سلولی می‌شوند. همچنین با غیر فعال کردن آنزیم‌ها در نهایت موجب مرگ سلولی می‌شود (Ocsoy et al., 2013). نانوذرات نقره بسیار با ثبات می‌باشند و به راحتی در محلول‌های آبی پراکنده می‌شوند که از جنبه کاربردی ویژگی مثبتی است، ولی توجه به اثرات زیست محیطی و استفاده صحیح آنها را ضروری می‌سازد. همچنین برخی مطالعات نشان دادند که نانوذرات نقره می‌توانند محرک رشد گیاهان باشند (Sadak, 2019; Salachna et al., 2019). نانوذرات نقره، گستره وسیعی از پلیمرهای سنتزی و طبیعی به منظور کنترل بیماری‌ها استفاده می‌شوند (اصغری و همکاران، ۱۳۹۲). کیتوزان پلیمر استیل زدا-شده طبیعی غیرسمی پلی‌کاتیونی است که از واحدهای گلوکز آمین تشکیل شده است (Patel and Jivani, 2009) و روی بیمارگرها به دو حالت مستقیم (تغییر در نفوذپذیری دیواره‌ی سلولی میکروارگانیزم‌ها و جلوگیری از ساخته شدن RNA و تولید پروتئین‌های مختلف) و غیر مستقیم (القای مقاومت در گیاهان) اثر می‌گذارد (El hadrami et al., 2010; Kong et al., 2010).

خاصیت ضدباکتریایی موثر نانوذرات نقره بیشتر علیه باکتری‌های بیمارگر انسانی از قبیل *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas*

شد. سپس محصول در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد (Sadighian et al., 2015).

برهمکنش باکتری با نانوذرات نقره و نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان در شرایط آزمایشگاه

بررسی اثر نانوذرات مختلف روی رشد باکتری با روش حداقل غلظت مهارکنندگی انجام شد (Balouiri et al., 2016). ابتدا محلول‌های پایه (استوک) از نانوذرات نقره و نانوکامپوزیت در آب مقطر استریل و کیتوزان در اسیداستیک ۰/۱ درصد تهیه شد. سپس حجم‌های مشخصی از این محلول‌ها به دو میلی‌لیتر محیط کشت لوریا برتانی حاوی 10^7 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر (تراکم نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر در حدود ۰/۱) اضافه شد تا غلظت‌های مختلفی از نانوذرات از ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. سپس غلظت سوسپانسیون در هر کدام از لوله‌های آزمایش توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. لوله‌ها در دمای ۲۷ درجه‌ی سیلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در ۱۶۰ دور در دقیقه تکان داده شد و مجدداً تراکم نوری^۳ سوسپانسیون‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد. حداقل غلظتی که در آن باکتری قادر به رشد نبود به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین شد. در تیمارهای کنترل منفی و مثبت به ترتیب نانوذرات و باکتری به محیط کشت اضافه شدند.

آزمون تعیین زمان مرگ باکتری‌ها

این آزمون به روش ارائه شده توسط NCCLS^۴ انجام شد. پس از مخلوط کردن سوسپانسیون باکتریایی حاوی 10^7 سلول در هر میلی‌لیتر با حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات مختلف در محیط تاریک و در دمای اتاق در فاصله‌های زمانی صفر (بلافاصله بعد از مخلوط کردن)، ۲، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه، مقدار ۳۰

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده به میوه‌های نارس گوجه‌فرنگی مایه زنی شد (Opara and Odibo, 2009). در تیمارهای کنترل منفی آب مقطر استریل استفاده شد. میوه‌ها به مدت یک هفته درون شیشه‌های استریل حاوی پنبه مرطوب استریل نگهداری شدند. سپس باکتری از اطراف بافت‌های آلوده برگ و میوه نارس جداسازی و روی محیط کشت نوترینت آگار کشت شد و پس از تهیه‌ی کلنی خالص، تعدادی از آزمون‌ها از قبیل آزمون‌های گرم، اکسیداز، کاتالاز، تولید رنگدانه روی محیط کشت YDC^۱ آگار، لوآن و پوسیدگی روی ورقه‌های سیب‌زمینی وغیره انجام شد.

سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره‌ی آبی سماق

یک گرم سماق در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سیلسیوس به آرامی تکان داده شد. عصاره‌ی حاصل از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد و در دمای ۲۰- درجه‌ی سیلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شد. برای سنتز نانوذرات نقره مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محلول نیترات نقره (۰/۲ مولار) با ۵۰ میلی‌لیتر از عصاره‌ی سماق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه‌ی سیلسیوس تکان داده شد و سپس به مدت یک ساعت بدون تکان دادن در دمای محیط قرار گرفت (Khamhaengpol and Siri, 2017).

تهیه‌ی نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان

کیتوزان (وزن مولکولی $10^5 \times 10^5 - 3$ گرم بر مول) با درجه‌ی انحلال پذیری بیشتر از ۷۵ درصد از شرکت سیگما (کشور امریکا) تهیه شد. محلول ۰/۵ درصد کیتوزان (۰/۵ گرم کیتوزان در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر استیک اسید با اسیدیته ۴/۸) در دمای اتاق تهیه شد. نانو کامپوزیت نقره-کیتوزان از افزایش ۱۰ میلی‌لیتر محلول نانوذرات نقره (۰/۵ درصد) به ۴۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان (۰/۵ درصد) به دست آمد. هم‌زدن کلئید نهایی به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه‌ی سیلسیوس انجام

² Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

³ Optical density (OD)

⁴ National Committee on Clinical Laboratory Standards

¹ Yeast extract-dextrose-calcium carbonate (YDC) agar

های گوجه‌فرنگی علائم بافت مردگی روی میوه و لکه‌های نکرزه روی برگ مشاهده شد. بیماریزا بودن جدایه‌ی باکتری با رعایت اصول کخ تایید شد. به این صورت که جداسازی باکتری Xp از حاشیه‌ی بافت آلوده میوه و برگ صورت گرفت و کشت خالص روی محیط کشت نوترینت آگار تهیه شد. سپس با انجام برخی از آزمون‌های فنوتیپی و ویژگی‌هایی از قبیل گرم منفی، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، رشد هوازی، لوان مثبت و تولید رنگدانه زرد روی محیط کشت YDC و ایجاد پوسیدگی نرم روی ورقه‌های سیب‌زمینی مشخص شد (شکل ۱).

خصوصیات نانوذرات نقره

ساختار بلوری نانوذرات نقره با استفاده از الگوی پراش اشعه ایکس^۲ تایید شد. در این شکل پیک‌های مختلف نانوذرات نقره در 2θ از $38/2$ درجه، $44/4$ درجه، $64/5$ درجه و 74 درجه با $(1\ 1\ 1)$ ، (200) ، (220) و (311) سطوح تراز شبکه نانوذرات نقره مطابق بود (شکل ۲). تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی^۳ نانوذرات نقره نشان می‌دهد که نانوذرات نقره دارای شکل شبه‌کروی در توزیع یکنواخت با اندازه‌ی متوسط 35 نانومتر است (شکل ۳).

خصوصیات نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان

الگوی پراش اشعه ایکس نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان نشان می‌دهد که تعدادی از پیک‌های مشخصه‌ای که در $(1\ 1\ 1)$ ، (200) ، (220) و (311) بازتاب‌های براگ مشاهده شد، ساختار بلوری نانوذرات نقره را ایجاد کردند. این پیک‌های پراکندگی با سنتز نانوذرات نقره موافق بودند (شکل ۴). همچنین تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی برای نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان نشان می‌دهد که نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان تقریباً به شکل کروی با اندازه‌ی متوسط حدود 50 نانومتر است.

میکرولیتزر از سوسپانسیون‌ها روی محیط کشت نوترینت آگار پخش شد و پلیت‌ها در دمای 27 درجه‌ی سیلسیوس به مدت 24 ساعت نگهداری شدند. کلنی‌های تشکیل شده برای هر زمان بعد از 24 ساعت شمارش و ثبت شد (Tuomanen et al., 1986).

آزمون گلخانه‌ای

به منظور بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات در شرایط گلخانه، نشاء چهار برگی گوجه‌فرنگی با محلول نانوذرات نقره و نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان در غلظت‌های 10 ، 50 و 100 میلی‌گرم بر لیتر محلول پاشی شدند. دو ساعت بعد از تیمار شدن با نانوذرات، گیاهان با 10 میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر محلول پاشی و به مدت 48 ساعت زیر کیسه‌های پلاستیکی شفاف قرار گرفتند. سپس گیاهان در گلخانه در دمای $28-32$ درجه‌ی سیلسیوس و رطوبت نسبی تقریبی 70 درصد به مدت 30 روز نگهداری شدند. شدت بیماری با اندازه‌گیری مساحت لکه‌های نکروز تشکیل شده روی برگ‌ها با نرم افزار ImageMeter Pro-photo measure v2.22.1 و با استفاده از فرمول (مساحت بافت آلوده/مساحت کل برگ‌ها) $100 \times$ محاسبه شد (طلیعی و همکاران، ۱۳۹۱). شاهدها شامل گیاهان سالم تیمار شده با آب مقطر استریل، نانوذرات نقره، نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان و گیاه تلقیح شده با باکتری بیمارگر بودند.

آنالیز داده‌ها

در این مطالعه آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس با روش ANOVA و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در نرم‌افزار مینی‌تب^۱ و نمودارها با نرم‌افزارهای سیگماپلات و اکسل رسم شدند.

نتایج

در آزمون بیماریزایی که روی میوه و برگ گیاه گوجه‌فرنگی انجام شد، به ترتیب با گذشت هفت و 14 روز پس از مایه‌زنی باکتری به میوه‌های نارس و برگ-

² X-ray diffraction (XRD)

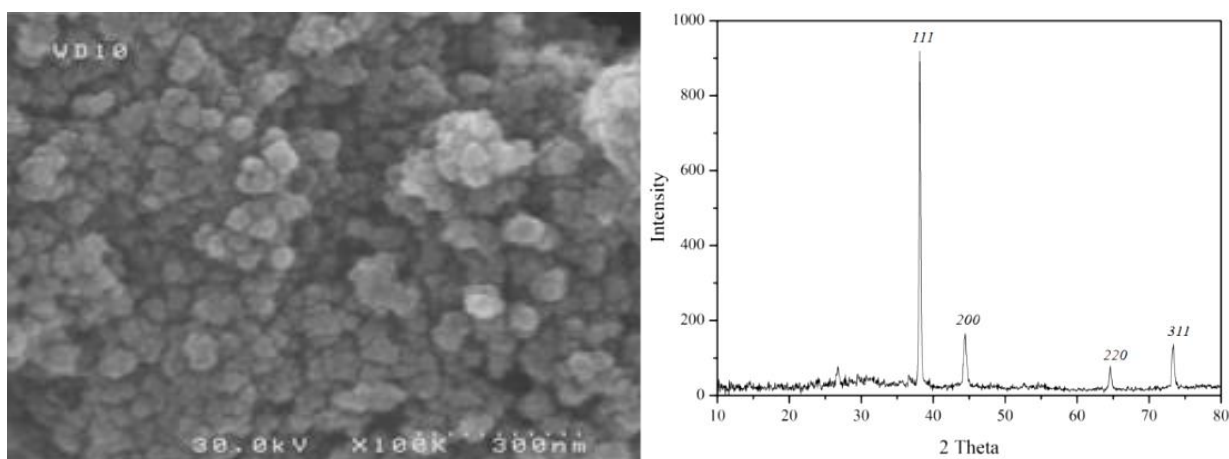
³ Scanning electron microscope (SEM)

³ Minitab version 17.1.0.F4CG



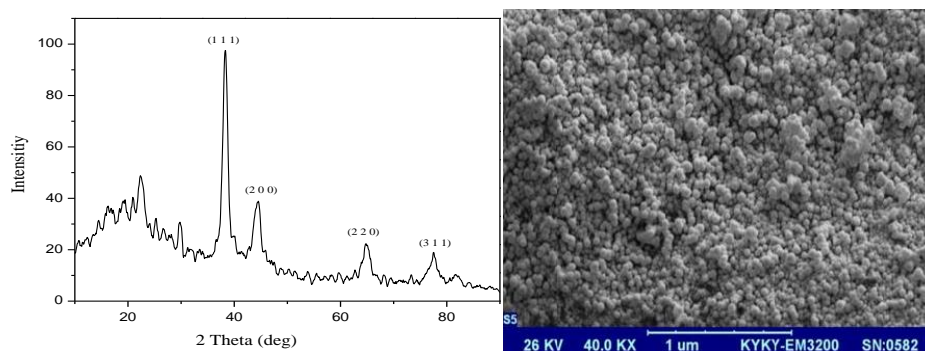
شکل ۱- آزمون بیماری‌زایی. تلقیح باکتری *Xanthomonas perforans* روی میوه نارسی گوجه‌فرنگی و بروز علائم و گسترش آن به داخل میوه هفت روز پس از مایه‌زنی (سمت چپ)، و روی برگ گوجه‌فرنگی و ظهور لکه‌های نکروزه ۱۴ روز پس از مایه‌زنی (سمت راست).

Figure 1. Pathogenicity test. Inoculation of *Xanthomonas perforans* on immature fruit and the presence of necrotic tissue and its spread into the fruit seven days after inoculation (left side), Inoculation of *X. perforans* on tomato leaves and the emergence of necrotic spots 14 days after inoculation (right side).



شکل ۲- الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات نقره (سمت راست) و تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره‌ی آبی سماق که نشان‌دهنده‌ی نانوذرات نقره‌شبه‌کروی و در اندازه‌ی متوسط ۳۵ نانومتر است (سمت چپ).

Figure 2. X-ray diffraction (XRD) pattern of silver nanoparticles (right side) and SEM image of silver nanoparticles synthesized with sumac aqueous extract shows that the silver nanoparticles have the quasi-spherical shape with the average size of about 35 nm (left side).

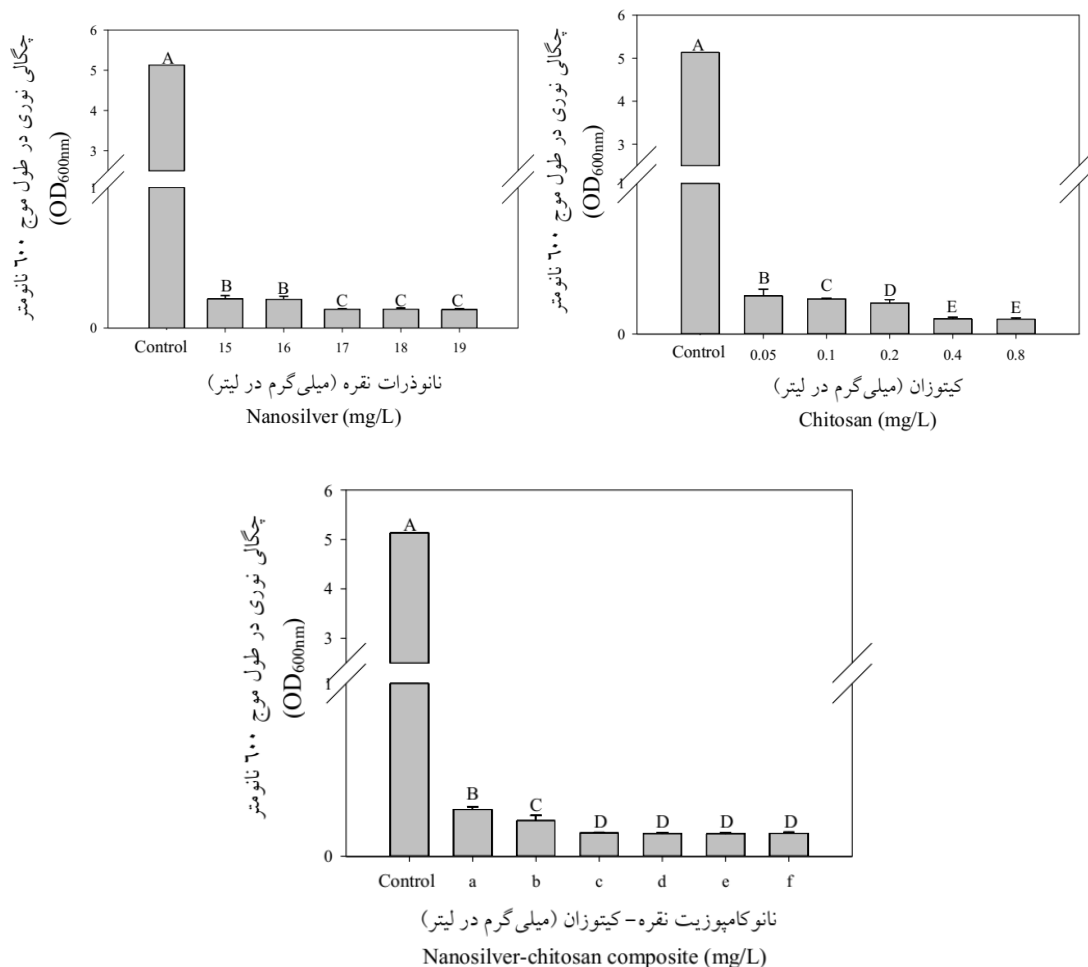


شکل ۳- الگوی XRD نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان (سمت راست) و تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان که نشان‌دهنده‌ی نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان شبه‌کروی در اندازه‌ی متوسط ۵۰ نانومتر است (سمت چپ).

Figure 3. X-ray diffraction (XRD) pattern of the synthesized Cs- Ag nanocomposite (right side) and SEM image of synthesized Cs- Ag nanocomposite shows that the nanocomposite has the quasi-spherical shape with the average size of about 50 nm (left side).

مهارکنندگی نانوذرات نقره و کیتوزان برای باکتری Xp به ترتیب ۱۷ و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر بود. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان برای این باکتری غلظت C (سه میلی‌گرم بر لیتر نانوذره نقره و ۶/۹۴ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان) تعیین شد (شکل ۴).

حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره، کیتوزان و نانوکامپوزیت در شرایط آزمایشگاه آزمون‌های آماری و مقایسه میانگین اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره، کیتوزان و نانوکامپوزیت نشان داد که تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ($P < 0.05$) با شاهد داشتند و در گروه‌های آماری مختلف قرار گرفتند. حداقل غلظت



شکل ۴- اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره‌ی آبی سماق، کیتوزان و نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان روی *Xanthomonas perforans* در شرایط آزمایشگاه. ستون‌هایی با حرف مشترک در یک گروه آماری قرار دارند. Error bars = mean \pm SD. مقادیر a, b, c, d, e, f به ترتیب غلظت‌های مختلف نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان (میلی‌گرم بر لیتر) می‌باشد (۱-۱/۳۱، ۲-۴/۶۳، ۳-۶/۹۴، ۴-۹/۲۶، ۵-۱۱/۵۷ و ۶-۱۳/۸۹).

Figure 4. Antibacterial effect of various concentrations of synthesized silver nanoparticles using sumac extract, chitosan and Cs- Ag nanocomposite on *Xanthomonas perforans* in vitro. Means in a column followed by the same letter are not significantly different ($P = 0.05$). Error bars = mean \pm SD. The letters of a, b, c, d, e, and f are different concentrations (mg/L) of silver-chitosan nanocomposite (a: 1- 2.31, b: 2- 4.63, c: 3-6.94, d: 4-9.26, e: 5-11.57, f: 6-13.89).

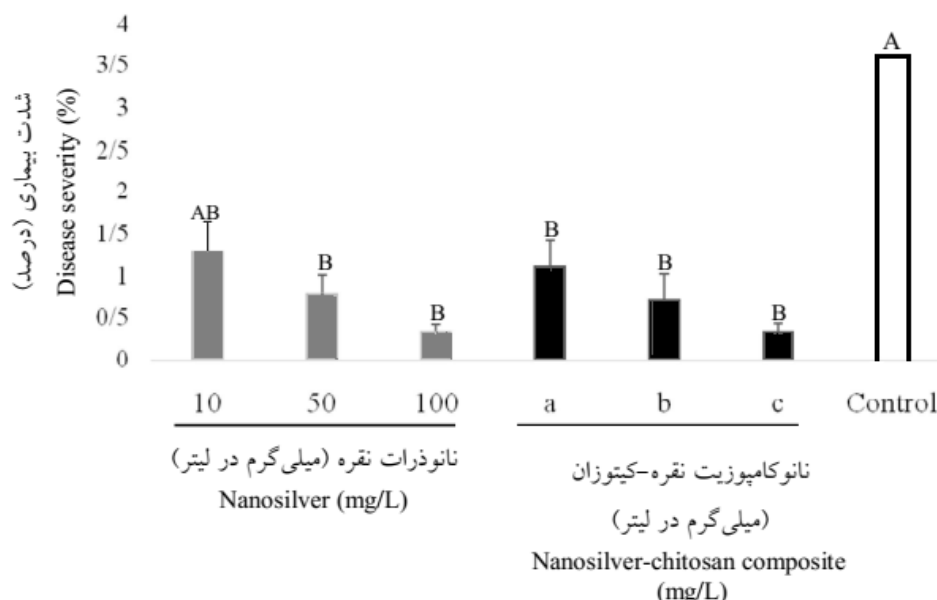
زمان مرگ باکتری‌ها

بعد از تلقیح سوسپانسیون باکتری با حداقل غلظت- های مهارکنندگی و نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف، تشکیل کلنی بعد از ۲۴ ساعت بررسی شد که زمان مرگ تمام سلول‌های باکتری در سوسپانسیون‌های حاوی نانوذرات نقره پس از پنج دقیقه، کیتوزان پس از ۲۰ دقیقه و نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان نیز پس از گذشت پنج دقیقه بود. در این زمان‌ها هیچ کلنی از باکتری در سطح محیط کشت رشد نکرد.

اثر نانوذرات نقره و نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان روی شدت بیماری لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه

آزمون‌های آماری داده‌های حاصل از اثر نانوذرات نقره ($F_{3,8} = 7.21, P < 0.05$) و نانوکامپوزیت ($F_{3,8} =$

($P < 0.05$)، 13.72 نشان داد که تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد دارند و با مقایسه میانگین‌ها تیمارها در گروه‌های آماری متفاوت قرار گرفتند. شدت بیماری لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی در شاهد $2/6$ درصد و در تیمارهای نانوذرات نقره با غلظت‌های 10 ، 50 و 100 میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب $1/3$ ، $0/81$ و $0/32$ درصد بود. بیشترین کاهش در شدت بیماری در غلظت 100 میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد. در تیمارهای نانوکامپوزیت در غلظت‌های a ، b و c شدت بیماری روی برگ‌ها به ترتیب $1/12$ ، $0/72$ و $0/33$ درصد و در شاهد $3/60$ درصد بود. نتایج نشان داد که غلظت c از پیشرفت علایم بیماری روی گیاه جلوگیری کرد (شکل ۵).



شکل ۵- اثر ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره‌ی سنتز شده با عصاره‌ی آبی سماق و نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان روی شدت بیماری لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی ناشی از باکتری *Xanthomonas perforans* در شرایط گلخانه. ستون‌های با حرف مشترک در یک گروه آماری قرار دارند. Error bars = mean \pm SD. حروف a ، b و c به ترتیب غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره-کیتوزان (a: $10-23.14$ ، b: $50-115.74$ ، c: $100-231.48$ میلی‌گرم بر لیتر) می‌باشد.

Figure 5. Antibacterial effect of various concentrations of synthesized silver nanoparticles using sumac extract, and Cs- Ag nanocomposite on the disease severity of tomato bacterial spot caused by *Xanthomonas perforans* in greenhouse conditions. Means in a column followed by the same letter are not significantly different ($P = 0.05$). Error bars = mean \pm SD. The letters of a, b, and c are different concentrations (mg/L) of silver-chitosan nanocomposite (a: 10- 23.14, b: 50- 115.74, and c: 100-231.48).

بحث

این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره بیوسنتز شده شبه کروی با اندازه متوسط ۲۵ نانومتر دارای خاصیت ضدباکتریایی موثری بودند. حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره علیه باکتری Xp در شرایط آزمایشگاه، ۱۷ میلی‌گرم بر لیتر بود. در پژوهشی نانوذرات نقره کروی سنتز شده با عصاره‌ی ساقه‌ی گیاه پنبه با اندازه‌های متفاوت ۲۰ تا ۱۰۰ نانومتر در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از رشد باکتری-های *X. campestris* pv. *campestris* و *X. axonopodis* pv. *malvacearum* در شرایط آزمایشگاه جلوگیری کردند (Vanti et al., 2019). ممانعت از رشد باکتری *C. michiganensis* subsp. توسط نانوذرات نقره در غلظت ۸۴ میلی‌گرم بر لیتر و مدت زمان انکوباسیون ۲۰ دقیقه گزارش شده است (Rivas-cáceres et al., 2018).

در پژوهش دیگری نانوذرات نقره با اندازه‌ی کمتر از ۲۰ نانومتر در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از رشد باکتری Xp در شرایط آزمایشگاه جلوگیری کردند (Ocsoy et al., 2013). همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره کروی سنتز شده با عصاره‌ی سیب با اندازه‌ی ۲۰ نانومتر برای باکتری‌های *S. Bacillus cereus* P. *aeruginosa* aureus و *Escherichia coli* و قارچ *Candida albican* به ترتیب ۷۸/۱، ۳۱۲/۵، ۱۲۵۰، ۲۵۰۰ و ۱۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بود (Lokina et al., 2014). فعالیت ضد قارچی نانوذرات نقره کروی با اندازه‌ی ۵۴/۲ نانومتر در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث کاهش ۵۰ درصدی رشد قارچ *Aspergillus flavus* شده است (Yassin et al., 2016). همچنین نانوذرات نقره با اندازه‌ی ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر در غلظت‌های ۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تشکیل کلنی قارچ *B. sorokiniana* را کاهش دادند در حالیکه فعالیت ضدقارچی این نانوذره برای قارچ *Magnaporthe grisea* در غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود که نشان‌دهنده‌ی حساسیت بیشتر قارچ دوم به نانوذرات نقره است (Jo et al., 2009).

ضدباکتریایی نانوذرات نقره علاوه بر غلظت به شکل، اندازه، انواع پوشش سطحی و بارهای سطحی آنها نیز بستگی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که با افزایش اندازه-ی نانوذره اثر ضدباکتریایی آن کاهش می‌یابد. همچنین با اینکه در بیشتر پژوهش‌ها از ذرات کروی شکل استفاده شده‌است، اما گزارشاتی مبنی بر اثر ضدباکتریایی بیشتر ذرات مثلثی در مقایسه با ذرات کروی و میله‌ای وجود دارد (Abdi et al., 2008; Pal et al., 2007). اما وابستگی سمیت به این فاکتورها مشکل اصلی استفاده از نانوذرات بدون پوشش است. مقایسه‌ی نتایج مطالعه‌ی حاضر و مطالعات ذکر شده نشان می‌دهد که کارایی ضدباکتریایی نانوذرات نقره علاوه بر فاکتورهای ذکر شده تحت تاثیر نوع میکروارگانیزم نیز است (Pal et al., 2007). بنابراین فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات با ویژگی‌های یکسان در میکروارگانیزم‌های مختلف متفاوت خواهد بود.

در این مطالعه حداقل غلظت مهارکنندگی کیتوزان علیه باکتری Xp، غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر بود. در پژوهش دیگری دو محلول کیتوزان با وزن مولکولی ۱۱۲۹ کیلودالتون و درجه‌ی داستیلاسیون کمتر از ۸۵ درصد و همچنین وزن مولکولی ۶۰۷ کیلودالتون و درجه‌ی داستیلاسیون بیشتر از ۷۵ درصد در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در شرایط آزمایشگاه از رشد باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae* جلوگیری کردند (Li et al., 2012). کیتوزان و مشتقات آن در غلظت‌های ۵۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر علیه *A. tumefaciens* و غلظت‌های ۲۰۰-۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر علیه *P. carotovorum* فعالیت ضدباکتریایی در شرایط آزمایشگاه نشان دادند و کیتوزان در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از گیاهچه‌های هندوانه علیه *Acidovorax citrulli* محافظت کردند (Xing et al., 2015). کیتوزان پلیمر طبیعی غیرسمی و تجزیه‌پذیر زیستی است که بارهای مثبت آن به اجزای آنیونی دیواره‌ی سلولی میکروارگانیزم‌ها متصل شده و باعث تغییراتی در نفوذپذیری دیواره‌ی سلولی آنها می‌شود (Li et al., 2011) و بعد از ورود به داخل سلول می‌تواند به DNA متصل شده و از ساخته شدن RNA و

نداشت. در نتیجه نانوکامپوزیت حاصل فعالیت ضدباکتریایی بیشتری نسبت به نانوذرات اولیه نداشت. پژوهش انجام شده با نانوکامپوزیت نقره (۱۸ نانومتر)-اکسید گرافن در شرایط گلخانه روی گیاه گوجه‌فرنگی در مرحله‌ی چهار برگی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر شدت بیماری لکه باکتریایی (تقریباً ۱۸ درصد) را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد (تقریباً ۵۳ درصد) کاهش داد. اما در غلظت‌های ۱۶ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش معنی‌داری در مقایسه با شاهد مشاهده نشد. در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از نانوکامپوزیت سنتز شده مقدار نانوذرات نقره در حدود ۲۶/۹ میلی‌گرم بر لیتر بود و خاصیت ضدباکتریایی نانوکامپوزیت نسبت به نانوذرات اولیه افزایش یافت (Ocsoy et al., 2013).

روش‌های متفاوتی از قبیل شیمیایی، اشعه ماوراء بنفش، میکروویو، تجزیه حرارتی و سنتز سبز برای سنتز نانوذرات وجود دارد. بیوسنتز نانوذرات با استفاده از عصاره‌ی گیاهی با توجه به غیر سمی بودن، زیست سازگاری، ارزانی، سادگی تهیه و نیز تولید نانوذرات با خلوص بالا مقرون به صرفه به نظر می‌رسد. از گیاهان متعددی از قبیل ریحان (*Ocimum sanctum*)، گیاه کور (*Capparis zeylanica*)، گیاه شعله زنبق (*Gloriosa superba*)، عصاره‌ی انگور (*Vitis vinifera*)، گیاه خرزهره (*Nerium oleander*)، یونجه، گردو، *Postia puberula* و غیره برای بیوسنتز نانوذرات استفاده می‌شود (ابراهیمی، ۱۳۹۷). در پژوهش حاضر نیز به منظور کاهش اثرات زیست محیطی، نانوذرات نقره به روش سنتز سبز و با استفاده از عصاره‌ی آبی سماق تهیه شد و از کیتوزان با هدف افزایش خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره استفاده شد. هر چند نانوذرات استفاده شده تغییرات مرفولوژیکی قابل مشاهده‌ای در گیاه نداشتند ولی برای اطمینان از بی‌اثر بودن آنها باید مطالعات بافتی، سلولی و مولکولی انجام شود. عملکرد نانوذرات در سطح مولکولی در سیستم‌های بیولوژیکی تا حد زیادی ناشناخته مانده است و درک کاملی از نقش نانوذرات مهندسی شده در فیزیولوژی گیاهی در سطح

تولید پروتئین‌های مختلف جلوگیری کند (Kong et al., 2010). فعالیت ضد میکروبی کیتوزان به گونه میکروارگانیزم، اسیدیته، وجود و عدم وجود کاتیون‌های فلزی، وزن مولکولی و درجه‌ی داستیلاسیون کیتوزان بستگی دارد (Xing et al., 2015).

همچنین نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان شبه کروی با اندازه‌ی متوسط ۵۰ نانومتر سنتز شده در این مطالعه، حداقل غلظت مهارکنندگی آن در حضور باکتری بیمارگر، غلظت ۶/۹۴ میلی‌گرم بر لیتر کیتوزان و سه میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره بود که باعث افزایش فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره در شرایط آزمایشگاه شد. در پژوهشی نانوکامپوزیت نقره-اکسید گرافن (۲۰۰ نانومتر) تولید شده با ذرات نقره تقریباً پنج و ۱۸ نانومتر نیز باعث افزایش خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره شد. نانوکامپوزیت سنتز شده با نانوذرات نقره ۱۸ نانومتر در غلظت‌های ۲۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از رشد باکتری Xp در شرایط آزمایشگاه جلوگیری کردند و حتی در پایین‌ترین غلظت نانوکامپوزیت (۲۰ میلی‌گرم بر لیتر)، بیش از ۹۵ درصد سلول‌های باکتری Xp از بین رفتند. همچنین نانوکامپوزیت سنتز شده با ذرات نقره پنج نانومتری نسبت به کامپوزیت اول خاصیت ضدباکتریایی بیشتری نشان داد و در غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر لیتر، ۱۰۰ درصد سلول‌های باکتری Xp از بین رفتند (Ocsoy et al., 2013). کامپوزیت نانوذرات کیتوزان-مس با اندازه‌ی ۲۹۵/۴ نانومتر، در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در شرایط آزمایشگاه از تشکیل کلنی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* جلوگیری کرد و در مقایسه با سولفات مس و کیتوزان موثرتر بود (Swati et al., 2017).

در آزمایشات گلخانه‌ای این پژوهش، غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و همچنین نانوکامپوزیت نقره-کیتوزان (غلظت‌های a, b و c) باعث کاهش موثر شدت بیماری لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی روی برگ‌های نشاء‌های گوجه‌فرنگی شدند. اما بین غلظت‌های استفاده شده تفاوت معنی‌داری وجود

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از آقای دکتر اسدانی (گروه بیماری‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز) به جهت اهداء جدایه باکتری بیمارگر تشکر و قدردانی می‌نمایند.

مولکولی وجود ندارد. مطالعات گسترده‌ای در ارتباط با استفاده از نانوذرات مختلف جهت کنترل عوامل بیماریزای گیاهی و ارائه‌ی راهکارهای مناسب به‌منظور افزایش خاصیت ضد میکروبی و کاهش سمیت و اثرات زیست‌محیطی آنها نیاز است.

منابع مورد استفاده

- ابراهیمی ک، ۱۳۹۷. بیوسنتز نانوذرات مس با استفاده از عصاره آبی گل *Postia puberula* و بررسی فعالیت ضدباکتری آن. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۳۱. صفحه‌های ۶۴۸ تا ۶۶۱.
- اصغری س، ابراهیمی سامانی س، سراج ز، خواجه خ، حسین خانی س، ۱۳۹۲. بهینه‌سازی سنتز نانوذرات کیتوزان. زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس. ۴، صفحه‌های ۲۱ تا ۲۹.
- نقش ن، سلیمانی ص و ترکان س، ۱۳۹۲. اثر مهارى نانوذرات نقره با عصاره اتانولی اکالیپتوس بر رشد باکتری *E. coli*. مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان. ۲، صفحه‌های ۶۰ تا ۶۴.
- طلیعی ف، صفایی ن و آقاجانی م، ۱۳۹۱. رابطه بین میزان شدت و وقوع بیماری پوسیدگی ذغالی سویا در استان گلستان. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی. ۳، صفحه‌های ۱۲۵ تا ۱۴۲.
- Abdi GH, Salehi H and Khosh-khui M, 2008. Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* l.) tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum* 30 (5): 709–714.
- Balouiri M, Sadiki M and Ibsouda SK, 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. *Pharmaceutical Analysis* 6(2):71-79.
- Chowdappa P and Gowdan S, 2013. Nanotechnology in crop protection: status and scope. *Pest Management in Horticultural Ecosystems* 19: 131–151.
- Constantin EC, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, Van Malderghem C, De Vos P and Cottyn B, 2016. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathology* 65: 792–806.
- El hadrami A, Adam LR, El hadrami I and Daayf F, 2010. Chitosan in plant protection. *Marine Drugs* 8(4): 968-987.
- Jo YK, Kim BH and Jung G, 2009. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Disease* 93(10):1037-1043.
- Khamhaengpol A and Siri S, 2017. Green synthesis of silver nanoparticles using tissue extract of weaver ant larvae. *Materials Letters* 192: 1-14.
- Kong M, Chen XG, Xing K and Park HJ, 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Food Microbiology* 144(1): 51-63.
- Li B, Liu B, Shan CH, Ibrahim M, Lou Y, Wang Y, Xie G, Lia HY and Sunb G, 2012. Antibacterial activity of two chitosan solutions and their effect on rice bacterial leaf blight and leaf streak. *Society of Chemical Industry* 69(2): 312–320.
- Li Z, Yang F and Yang R, 2011. Synthesis and for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today* 6: 446-65.

- Lokina S, Stephen A, Kaviyarasan V, Arulvasu C and Narayanan V, 2014. Cytotoxicity and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles. *European Journal of Medicinal Chemistry* 76: 256-263.
- Ocoy I, Paret ML, Ocoy MA, Kunwar S, Chen T, You M and Tan w, 2013. Nanotechnology in plant disease management: DNA-directed silver nanoparticles on graphene oxide as antibacterial against *Xanthomonas perforans*. *American Chemical Society Nano* 7(10): 1-16.
- Opara EU and Odibo FJC, 2009. Studies and characterization of bacterial spot pathogen of tomato *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Genetics* 1(2-4): 35-43.
- Osdaghi E, Taghavi SM, Hamzehzarghani H, Fazliarab A and Lamichhane JR, 2016. Monitoring the occurrence of tomato bacterial spot and range of the causal agent *Xanthomonas perforans* in Iran. *Plant Pathology* 66(6): 990-1002.
- Pal S, Tak YK and Song JM. 2007. Does the antimicrobial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1712-20.
- Paret LM, Vallad EG, Averett RD, Jones BJ and Olson MS, 2012. Photocatalysis: effect of light-activated nanoscale formulations of TiO₂ on *Xanthomonas perforans*, and control of bacterial spot of tomato. *Phytopathology*. 103: 228-236.
- Patel JK and Jivani NP, 2009. Chitosan based nanoparticles in drug deliver. *Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 2(2): 517-522.
- Potnis NS, Timilsina A, Strayer SH, Deepa K, Jeri B, Mathews P, Gary V and Jeffrey J, 2015. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology* 16(9): 907-20.
- Rivas-cáceres RR, Stephano-hornedo JL, Lugo J, Vaca R, Aguila PD, Yañez-ocampo G, Mora-herrera ME, Díaz L, Cipriano-salazar M and Alaba P, 2018. Bactericidal effect of silver nanoparticles against propagation of *Clavibacter michiganensis* infection in *Lycopersicon esculentum* mill. *Microbial Pathogenesis* 115: 358-362.
- Sadak MSH, 2019. Impact of silver nanoparticles on plant growth, some biochemical aspects, and yield of fenugreek plant (*Trigonella foenum-graecum*). *Bulletin of the National Research Center* 43. Doi.org/10.1186/s42269-019-0077-y
- Sadighian S, Hosseini-monfared H, Rostamizadeh K and Hamidi M, 2015. Ph-triggered magnetic-chitosan nanogels (mcns) for doxorubicin delivery: physically vs. chemically cross linking approach. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 5(1): 115-120.
- Salachna P, Byczyńska A, Zawadzka A, Piechocki R and Mizielińska M. 2019. Stimulatory effect of silver nanoparticles on the growth and flowering of potted oriental lilies. *Agronomy* 9. Doi:10.3390/agronomy9100610.
- Sharma VK, Yngard RA and Lin Y, 2009. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* 145(1-2): 83-96.
- Swati K, Choudhary M, Joshi A, and Saharan V, 2017. Assessment of Cu-chitosan nanoparticles for its antibacterial activity against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(11): 1335-1350.
- Tuomanen ED, Durack T and Tomasz A, 1986. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 30(4): 521-527.

- Vanti GL; Nargund VB, Basavesha KN, Vanarchi R, Kurjogi M, Mulla SI, Tubaki S and Patil RR, 2019. Synthesis of *Gossypium hirsutum*-derived silver nanoparticles and their antibacterial efficacy against plant pathogens. *Applied Organometallic Chemistry* 33, e4630. Doi.org/10.1002/aoc.4630
- Xing K, Zhu X, Peng X and Qin S, 2015. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 35(2): 569–588
- Yassin M, El-rahim A, El-samawaty AMA, Dawoud TM, Abd-elkader OH, Al maary KS, Hatamleh AA and Elgorban AM, 2016. Characterization and anti *Aspergillus flavus* impact of nanoparticles synthesized by *Penicillium citrinum*. *Biological Sciences* 24(6): 1243-1248.

Antibacterial Activity of Synthesized Silver Nanoparticles Using Sumac Aqueous Extract and Silver-Chitosan Nanocomposite against *Xanthomonas perforans*

Z Rabiei¹, F Shahryari^{*2} and S Sadighian³

¹Former M.Sc Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

²Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

³Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biomaterials, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

*Corresponding author: shahryari@znu.ac.ir

Received: 25 July 2019

Accepted: 2 March 2020

Abstract

One of the applications of nanotechnology is the use of different nanoparticles in the management of plant diseases. Bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas perforans* is a devastating disease of tomato that can reduce the quality and quantity of crop. This study aimed to evaluate the antibacterial effects of silver nanoparticles (AgNPs) and silver-chitosan nanocomposite against *X. perforans*. The nanoparticles were synthesized with sumac extract and the antibacterial activity of different concentrations of biosynthesized nanoparticles was evaluated with minimum inhibitory concentration method. The structure and physical properties of nanoparticles were investigated by scanning electron microscope and X-ray diffraction. The results showed that the AgNPs and nanocomposite had quasi-spherical shape in a uniform distribution with the average size about 35 and 50 nm respectively. Minimum inhibitory concentrations of green biosynthesized AgNPs and silver-chitosan nanocomposite were at concentrations of 17 mg/L, and 3 mg/L AgNPs/6.94 mg/L chitosan respectively. Also, in greenhouse experiments, nanoparticles at 10, 50 and 100 mg/L concentrations reduced the disease severity of the bacterial spot on seedlings when compared to the control. The greatest decrease in the disease severity was caused using 100 mg/L concentration of AgNPs (91.11%). The results of this study showed that synthesized nanoparticles had effective antibacterial activity against the causal agent of tomato bacterial spot.

Keywords: Bacterial spot of tomato, Disease severity, Minimum inhibitory concentration, Nanotechnology.