ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):23-27

# Toxicity Effect of Silver Nanoparticles on Two Plant Growth Promoting Streptomyces Spp. Strains, Phytopathogenic Fungi *Fusarium Solani* and Phytopathogenic Oomycetes *Pythium aphanidermatum* and *Pythium ultimum*

**ARTICLE INFO**

***Article Type***
Original Research

***Authors***
Karimi E.*[1] *MSc*,
Sadeghi A.[1] *PhD*

**How to cite this article**
Karimi E., Sadeghi A. Toxicity Effect of Silver Nanoparticles on Two Plant Growth Promoting Streptomyces Spp. Strains, Phytopathogenic Fungi *Fusarium Solani* and Phytopathogenic Oomycetes *Pythium aphanidermatum* and *Pythium ultimum*. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):23-27.

**ABSTRACT**

Silver nanoparticles have antimicrobial activity and are used in various commercially produced products. In this study, the effects of two types of nanosilver formulations, including LS2000 and L2000 on two strains of Streptomyces and three phytopathogenic agents, Pythium aphanidermatum, Pythium ultimum and Fusarium solani were investigated. Streptomyces and phytopathogenic agents were cultured on ISP2 and PDA medium respectively supplemented with 0, 5, 10, 25, 50 and 70ppm of LS2000 and L2000. The influence of LS2000 and L2000 on mycelium of Streptomyces was investigated by atomic force microscopy (AFM). Colony forming unit (cfu) of the bacteria decreased in response to elevated concentrations of L2000. LS2000 completely inhibited growth of both strains at a concentration of 5ppm. The inhibitory effects of LS2000 on the phytopathogenic agents were more than L2000. P. aphanidermatum showed the highest tolerance to L2000 and only at 75ppm of the nanoparticles, the diameter of the colonies was decreased. High susceptibility of F. solani to L2000 caused a decrease in fungal colony diameter in lowest concentration of the nanoparticles. The growth of all phytopathogenic agents was decreased by LS2000 and completely stopped in a concentration of 50ppm. The results showed that LS2000 destroyed mycelial networks of the both bacteria in all tested concentrations. Vesicles appeared on the surface of the mycelium branches, subsequent to treatment with L2000. Based on the results, the inhibitory effects of silver nanoparticles on the beneficial soil bacteria were more than on the phytopathogenic agents. Therefore, more caution should be taken in using silver nanoparticles as a fungicide in agriculture.

**Keywords** Streptomyces; Antifungal Agents; Atomic Force Microscopy; Nanoparticles

[1]Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

***Correspondence***
*Address*: Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Shahid Fahmideh Boulevard, Karaj, Iran. Postal Code: 3135933151
*Phone*: +98 (26) 32703536
*Fax*: +98 (26) 32701067
ekarimi@abrii.ac.ir

***Article History***
Received: December 07, 2016
Accepted: February 18, 2018
ePublished: March 16, 2019

**CITATION LINKS**

[1] Plant-growth-promoting rhizobacteria [2] Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture [3] Chitinolytic Streptomyces vinaceusdrappus S5MW2 isolated from Chilika lake, India enhances plant growth and biocontrol efficacy through chitin supplementation against Rhizoctonia solani [4] The family Streptomycetaceae, part I: Taxonomy [5] Vegetable diseases: A color handbook [6] Antimicrobial effects of silver nanoparticles [7] Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria [8] Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on Candida albicans [9] Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of Streptomyces under saline soil conditions [10] Biocontrol activity of salt tolerant Streptomyces isolates against phytopathogens causing root rot of sugar beet [11] Atomic force microscopy [12] The bactericidal effect of silver nanoparticles [13] Nanosilver against fungi: Silver nanoparticles as an effective biocidal factor [14] Antimicrobial activity of stable silver nanoparticles of a certain size [15] Atomic force microscopy investigation of the characteristic effects of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus epidermidis

*Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.*

# اثر سمی نانوذرات نقره بر دو سویه باکتری استرپتومایسس محرک رشد گیاهی، قارچ بیمارگر *فوزاریوم سولانی* و اوومیست‌های بیمارگر *پیتیوم آفانیدرماتوم* و *پیتیوم اولتیموم*

**ابراهیم کریمی* MSc**
بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
**اکرم صادقی PhD**
بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

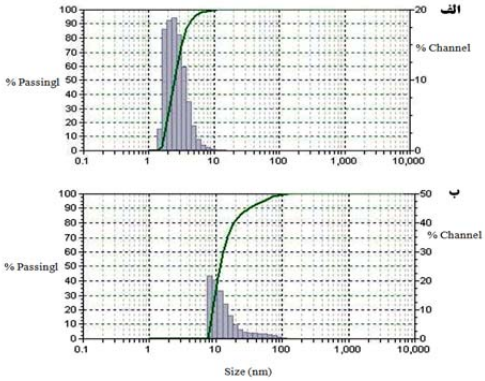
## چکیده
نانوذرات نقره خواص ضدمیکروبی دارند و در محصولات تجاری مختلف استفاده می‌شوند. در این مطالعه تاثیر دو نوع فرمولاسیون نانونقره L2000 و LS2000 بر دو سویه استرپتومایسس محرک رشد گیاهی و سه عامل بیمارگر گیاهی، *پیتیوم آفانیدرماتوم*، *پیتیوم اولتیموم* و *فوزاریوم سولانی* بررسی شد. استرپتومایسس‌ها و عوامل بیمارگر گیاهی به‌ترتیب روی محیط ISP2 و PDA حاوی غلظت‌های ۰ تا ۷۵پی‌پی‌ام از دو نوع فرمولاسیون نانوذرات نقره کشت شدند. تاثیر L2000 و LS2000 بر میسلیوم استرپتومایسس‌ها به‌وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی مطالعه شد. واحد تشکیل کلنی (cfu) باکتری‌ها در پاسخ به غلظت‌های افزایشی L2000 کاهش پیدا کرد. در مقابل LS2000 به‌طور کامل از رشد هر دو سویه حتی در غلظت ۵پی‌پی‌ام جلوگیری کرد. اثر ممانعت‌کننده LS2000 بر عوامل بیمارگر بیشتر از L2000 بود. *پیتیوم آفانیدرماتوم* بیشترین مقاومت را به L2000 نشان داد و تنها در غلظت ۷۵پی‌پی‌ام قطر کلنی کاهش پیدا کرد. حساسیت بالای *فوزاریوم سولانی* به L2000 موجب کاهش قطر کلنی قارچ در پایین‌ترین غلظت آن شد. رشد هر سه عامل بیمارگر توسط LS2000 کاهش پیدا کرد و در غلظت ۵۰پی‌پی‌ام به‌طور کامل متوقف شد. نتایج نشان داد که LS2000 شبکه میسلیومی باکتری‌ها را در تمام غلظت‌های آزمایش‌شده تخریب کرد. پس از تیمار با فرمولاسیون L2000 وزیکول‌هایی بر سطح شاخه‌های میسلیومی تشکیل شد. براساس نتایج، اثرات بازدارنده نانوذرات نقره بر باکتری‌های مفید خاک بیش‌تر از عوامل بیمارگر بود. بنابراین، برای استفاده از نانو ذرات نقره به‌عنوان ضدقارچ در کشاورزی باید بیشتر احتیاط شود.

**کلیدواژه‌ها:** استرپتومایسس، عوامل ضدقارچی، میکروسکوپ نیروی اتمی، نانوذرات

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹
*نویسنده مسئول: ekarimi@abrii.ac.ir

## مقدمه
باکتری‌های محرک رشد گیاهی یا PGPR با محلول‌کردن فسفات، تولید هورمون، تثبیت ازت، توسعه و گسترش سیستم ریشه‌ای و تولید مواد بازدارنده از رشد بیمارگرهای گیاهی موجب افزایش رشد، عملکرد و همچنین سلامت گیاه می‌شوند[1]. کودهای زیستی که به‌عنوان مهم‌ترین گزینه جایگزین یا کمکی برای کاهش مصرف کودهای شیمیایی معرفی می‌شوند حاوی مقادیر مناسبی از یک یا چند نوع از باکتری‌های محرک رشد گیاهی مانند باسیلوس، سودوموناس و استرپتومایسس هستند[2]. گونه‌هایی از جنس استرپتومایسس[3] به‌عنوان باکتری‌های محرک رشد و بیوکنترل شناخته شده‌اند. این باکتری‌های گرم مثبت تنوع بسیاری در محیط‌های طبیعی مانند خاک دارند. اغلب استرپتومایسس‌ها نسبت به شرایط نامساعد محیطی مانند مواد شیمیایی، حرارت، شوری و خشکی مقاوم هستند[4]. بوته‌میری و مرگ گیاهچه از مهم‌ترین بیماری‌های گیاهان جالیزی است که بیشترین خسارت را به این گیاهان وارد می‌کند. خسارت این بیماری به محصولات جالیزی تا ۱۰۰% نیز گزارش شده است. گونه‌های مختلفی از جنس فیتوفتورا، پیتیوم، رایزوکتونیا و فوزاریوم به‌عنوان عامل بیماری بوته‌میری و مرگ گیاهچه جالیز معرفی شده‌اند[5]. اخیراً استفاده از فرمولاسیون‌های حاوی نانوذرات نقره به‌عنوان سموم شیمیایی موثر علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی مورد توجه واقع شده است. با وجود خصوصیات ضدباکتریایی، قارچی و ویروسی این مواد بررسی‌های کمی در زمینه برهم‌کنش آن با فلور میکروبی موجود در محیط زیست انجام شده است. تاثیر کشنده نانوذرات نقره بر برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی توسط محققین نشان داده شده است[6, 7]. همچنین تاثیر مخرب این مواد بر ساختار غشای سلولی و بازداری از فرآیند طبیعی جوانه‌زنی برخی قارچ‌های بیماری‌زای انسانی گزارش شده است[8]. اگرچه استفاده از مواد ضدمیکروب جدید می‌تواند مشکل مقاومت قارچ‌ها و عوامل بیمارگر گیاهی به قارچ‌کش‌های موجود را برطرف کند اما خسارات زیست‌محیطی احتمالی استفاده از این محصولات و تاثیر مخربی که بر فلور خاک و به‌ویژه میکروب‌های مفید خاک دارند نیز باید به دقت مورد توجه قرار گیرد. در این مطالعه تاثیر دو فرمولاسیون حاوی نانوذرات نقره بر دو سویه استرپتومایسس PGPR که در برنامه‌های مدیریت بیماری‌های قارچی خاکزاد به‌عنوان عوامل کنترل زیستی استفاده می‌شوند (باکتری‌های مفید خاک) و سه بیمارگر گیاهی شامل *پیتیوم آفانیدرماتوم* (*Pythium aphanidermatum*)، *پیتیوم اولتیموم* (*Pythium ultimu*) و *فوزاریوم سولانی* (*Fusarium solani*) بررسی شده است.

## مواد و روش‌ها
**بررسی اندازه نانوذرات نقره:** در مطالعه تجربی حاضر از دو فرمولاسیون به نام‌های LS2000 و L2000 (نانونصب پارس؛ ایران) استفاده شد. ۲۵میلی‌لیتر از هر فرمولاسیون به‌مدت ۵دقیقه با سونیکاتور پروبی تیمار شد. فرمولاسیون همگن‌شده برای بررسی متوسط اندازه نانوذرات نقره با بهره‌برداری از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) توسط دستگاه تجزیه اندازه ذره StabiSizer 200 ( Particle Metrix؛ آلمان) مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور اطمینان از تکرارپذیری روش سنجش اندازه‌گیری سه‌بار تکرار شد. نتایج نشان داد متوسط اندازه ذرات در دو فرمولاسیون LS2000 و L2000 به‌ترتیب برابر با ۲/۱ و ۹/۹نانومتر است. همچنین محدوده توزیع اندازه ذرات فرمولاسیون LS2000 از ۱/۶نانومتر (۳/۰۵%) تا ۱۵/۱۹نانومتر (۰/۱%) و در فرمولاسیون L2000 از ۹/۰۳نانومتر (۲۱/۷۵) تا ۱۴۴/۵نانومتر (۰/۱%) بود (نمودار ۱).




**نمودار ۱)** محدوده توزیع اندازه نانوذرات نقره؛ الف) فرمولاسیون LS2000، ب) فرمولاسیون L2000

**باکتری و شرایط کشت:** در این مطالعه از دو سویه باکتری استرپتومایسس (*سویه* C و S2) که مقاومت به شوری، خصوصیات محرک رشد و کنترل زیستی آنها در مطالعات پیشین بررسی شده بود[9, 10] و دو بیمارگر گیاهی از رده اوومیست‌ها شامل *پیتیوم آفانیدرماتوم* و *پیتیوم اولتیموم* و یک قارچ بیمارگر گیاهی، *فوزاریوم سولانی* استفاده شد. در حال حاضر برای کنترل جمعیت این بیمارگرها از انواع سموم شیمیایی استفاده می‌شود. باکتری‌ها روی پلیت حاوی محیط کشت اینترنشنال استرپتومایسس پراجکت ۲ (ISP2؛ ۱۰گرم در لیتر عصاره مالت، ۴گرم در لیتر عصاره مخمر، ۴گرم در لیتر گلوکز و ۱۸گرم در لیتر آگار با اسیدیته ۷/۲) کشت و به‌مدت پنج روز در دمای ۲۹°C نگهداری شدند. برای تهیه کشت مایع سوسپانسیون کشت جوان باکتری در سرم فیزیولوژی (کلریدسدیم ۰/۹%) استریل با غلظت $10^6$واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر تهیه شد. یک‌میلی لیتر از این سوسپانسیون در ۵۰میلی‌لیتر محیط کشت ISP2 مایع در فلاسک‌های کشت ۲۵۰میلی‌لیتری کشت شد. فلاسک‌ها به‌مدت ۴ روز درون شیکر انکوباتور و در شرایط ۲۹°C و ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. قارچ‌ها روی محیط کشت جامد سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت و به‌مدت یک هفته در دمای ۲۳°C نگهداری شدند.

**بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر رشد باکتری و قارچ:** غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰پی‌پی‌ام از هر دو نوع نانوذرات نقره به محیط ISP2 و PDA اتوکلاوشده اضافه و سپس در پتری دیش پخش شدند. مقدار ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون هر سویه باکتری روی پتری‌دیش‌های محتوی ISP2 تیمارشده با نانوذرات نقره کشت شد. پس از ۴۸ساعت نگهداری در دمای ۲۹°C میزان رشد باکتری‌ها بررسی شد. برای کشت قارچ یک بلوک کوچک از هر سویه به‌طور وارونه روی سطح پتری‌دیش‌های محتوی PDA تیمارشده با نانوذرات نقره قرار داده شد. پس از یک هفته نگهداری در دمای ۲۳°C میزان رشد قارچ‌ها بررسی شد. با توجه به عدم رشد سویه‌های باکتریایی و عوامل بیمارگر در تیمارهای اعمال‌شده، غلظت‌های کمتر شامل صفر، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵پی‌پی‌ام از نانوذرات نقره تهیه و مطابق قبل به محیط کشت اضافه و رشد باکتری و عوامل بیمارگر بررسی شد. برای بررسی کمی تاثیر نانوذرات نقره بر رشد باکتری، غلظت‌های فوق به محیط کشت ISP2 مایع اضافه شد. پس از دو روز نگهداری درون شیکر انکوباتور و در شرایط ۲۹°C و ۱۵۰ دور در دقیقه مقدار ۱۰۰میکرولیتر از هر تیمار روی پتری‌دیش‌های محتوی ISP2 پخش و پس از ۴۸ساعت نگهداری در دمای ۲۹°C تعداد کلنی‌های تشکیل‌شده بر سطح محیط شمارش و واحد تشکیل کلنی (cfu) در واحد میلی‌لیتر محاسبه شد.

**تهیه لام و بررسی با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM):** از فلاسک‌های حاوی کشت استرپتومایسس تیمارشده با نانوذرات نقره مقدار ۲۰میکرولیتر روی لامل از جنس میکا پخش شد. پس از هوا خشک‌شدن نمونه لامل روی پایه دستگاه AFM (DME؛ دانمارک) با پروب نوع AC و روبشگر DS 95-50-E بارگذاری و پس از تنظیمات نرم افزاری، تصویربرداری به‌صورت خط‌به‌خط انجام شد[11].

**آنالیز آماری:** هر آزمون دارای سه تکرار و هر تکرار شامل سه پتری‌دیش یا فلاسک کشت هم‌اندازه بود. تجزیه واریانس داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SAS 9.4 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

## یافته‌ها

**تاثیر نانوذرات نقره بر رشد باکتری استرپتومایسس:** نتایج نشان داد هر دو سویه باکتری در درجه اول شدیداً تحت تاثیر اندازه ذرات و در درجه بعد تحت تاثیر غلظت نانوذرات نقره قرار گرفتند. کاهش جمعیت هر دو سویه باکتریایی روی محیط کشت کاملاً مشخص بود. جمعیت سویه C در هر میلی‌لیتر از کشت مایع تیمارشده با غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰ و ۲۵پی‌پی‌ام ذرات L2000 به‌ترتیب $1/2\times10^6$، $1/2\times10^6$، $8\times10^5$ و $4\times10^2$واحد تشکیل کلنی بود. در غلظت‌های بالاتر از این فرمولاسیون رشدی دیده نشد. جمعیت سویه S2 در غلظت‌های صفر، ۵ و ۱۰پی‌پی‌ام از این فرمولاسیون به‌ترتیب $1/3\times10^6$، $4/1\times10^5$ و $3\times10^5$ cfu در هر میلی‌لیتر از محیط بود. در غلظت‌های بالاتر از این فرمولاسیون باکتری رشد نکرد. هیچ‌یک از سویه‌های باکتری در تیمار با فرمولاسیون LS2000 رشد نشان ندادند (جدول ۱).

**جدول ۱)** تاثیر دو فرمولاسیون نانوذرات نقره بر جمعیت دو سویه استرپتومایسس (log10 واحد تشکلی کلنی بر میلی‌لیتر)

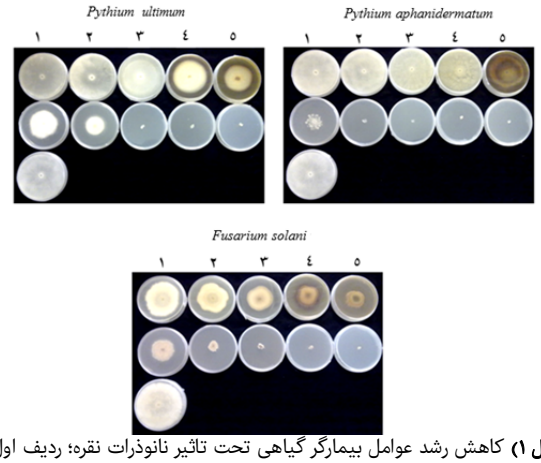
| نانوذرات نقره غلظت (پی‌پی‌ام) | کنترل | | L2000 | | | | | LS2000 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | صفر | ۵ | ۱۰ | ۲۵ | ۵۰ | ۷۵ | ۵ | ۱۰ | ۲۵ | ۵۰ | ۷۵ |
| سویه C | ۶/۰۸+۲/۱۷$^{a}$ | ۶/۱۶+۲/۰۲$^{a}$ | ۵/۰۹+۲/۰۴$^{b}$ | ۲/۰۶+۱/۳۰$^{c}$ | – | – | – | – | – | – | – |
| سویه S2 | ۶/۰۷+۲/۱۵$^{a}$ | ۵/۶۱+۲/۲۰$^{b}$ | ۵/۴۷+۲/۰۱$^{b}$ | – | – | – | – | – | – | – | – |

تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند براساس آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار نیستند ($p<0/05$)؛ -عدم رشد

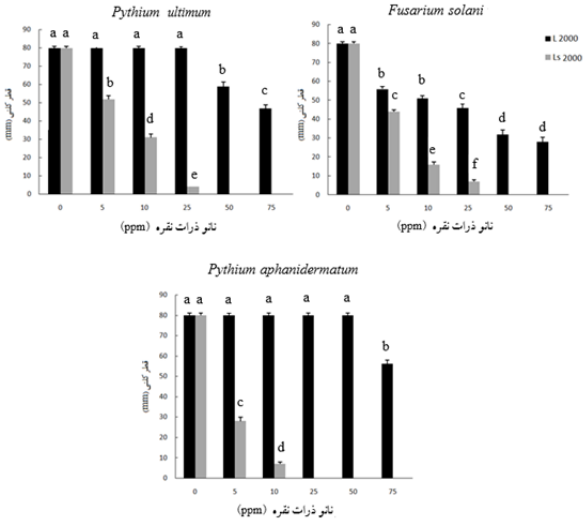
**تاثیر نانوذرات نقره بر رشد بیمارگرهای گیاهی:** یکی از اوومیست‌های مطالعه‌شده (*پیتیوم اولتیموم*) و قارچ *فوزاریوم سولانی* روی محیط حاوی ۲۵پی‌پی‌ام از فرمولاسیون LS2000 نانوذرات نقره رشد کرد. قارچ بیمارگر *پیتیوم آفانیدرماتوم* حساسیت بیشتری داشت و تنها تا غلظت ۱۰پی‌پی‌ام از این فرمولاسیون رشد کرد. هر دو بیمارگر اوومیستی مقاومت بیشتری نسبت به *فوزاریوم سولانی* در برابر غلظت‌های افزایشی از فرمولاسیون L2000 نشان دادند. به‌طوری که *پیتیوم اولتیموم* و *پیتیوم آفانیدرماتوم* به‌ترتیب تا غلظت‌های ۲۵ و ۵۰پی‌پی‌ام از این ماده سمی هیچ‌گونه کاهش رشدی نداشتند. در صورتی که رشد *فوزاریوم سولانی* از غلظت ۵پی‌پی‌ام تحت تاثیر قرار گرفت و کاهش قابل توجه‌ای نشان داد (شکل ۱ و نمودار ۲).

**بررسی با میکروسکوپ نیروی اتمی:** بررسی میسلیوم باکتری‌های تیمارشده با غلظت‌های مختلف از نانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی نشان داد به‌جز تیمار شاهد (صفرپی‌پی‌ام) در همه تیمارها تجزیه و تغییر شکل سلولی وجود داشت. همچنین با افزایش میزان غلظت نانوذرات نقره از هر دو فرمولاسیون بر شدت تجزیه و تغییر شکل سلولی اضافه شد. بررسی‌ها نشان داد شدت تغییرات یادشده در فرمولاسیون LS2000 بیشتر از L2000 بود. اگرچه فرمولاسیون LS2000 موجب تخریب کامل میسلیوم‌های باکتری شد (شکل ۲) و مراحل مختلف تخریب در تصویر مشخص نبود اما تشکیل وزیکول‌های غیرمعمول در تیمار با سمیت کمتر (L2000) کاملاً مشخص بود (شکل ۳). تاثیر نانوذرات نقره بر میسلیوم‌های هر دو سویه

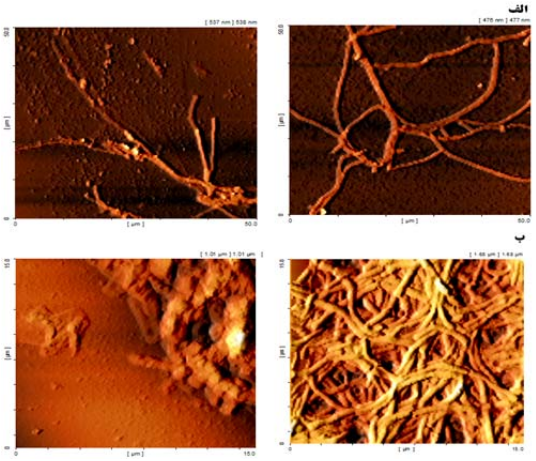
استرپتومایسس مشابه بود.



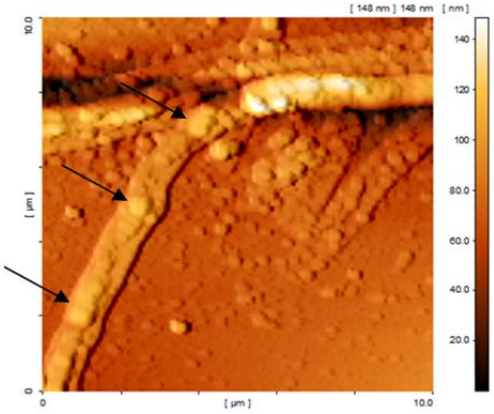

**شکل ۱)** کاهش رشد عوامل بیمارگر گیاهی تحت تاثیر نانوذرات نقره؛ ردیف اول) فرمولاسیون L2000، ردیف دوم) فرمولاسیون LS2000، ردیف سوم) شاهد (شماره‌های ۱ تا ۵ به‌ترتیب نمایشگر غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵پی‌پی‌ام از نانو ذرات نقره هستند)




**نمودار ۲)** تاثیر غلظت‌های مختلف از دو فرمولاسیون نانوذرات نقره (LS2000 و L2000) بر رشد (قطر کلنی) عوامل بیمارگر گیاهی (تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند براساس آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار نیستند؛ $p<۰/۰۵$)




**شکل ۲)** تاثیر نانوذرات نقره بر میسلیوم‌های استرپتومایسس؛ الف) سمت راست شاهد سمت چپ تیمار با فرمولاسیون L2000، ب) سمت راست شاهد سمت چپ تیمار با فرمولاسیون LS2000




**شکل ۳)** تاثیر تیمار نانوذرات نقره (L2000) بر میسلیوم باکتری استرپتومایسس (تشکیل وزیکول بر سطح میسلیوم *استرپتومایسس* با فلش سیاه‌رنگ نشان داده شده است)

## بحث

نتایج نشان داد غلظت‌های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰پی‌پی‌ام از هر دو نوع فرمولاسیون نانوذرات نقره (LS2000 و L2000) به‌طور کامل از رشد میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه شامل دو سویه باکتریایی و سه بیمارگر قارچی جلوگیری کرد. اگر چه کنترل کامل بیمارگرهای گیاهی برای کشاورزان مزایایی به همراه دارد اما توجه به این نکته که حتی سم‌پاشی در پایین‌ترین غلظت ممانعت‌کننده بررسی‌شده در این تحقیق (۱۰۰پی‌پی‌ام) ممکن است خسارات جبران‌ناپذیری را به فلور میکروبی خاک وارد کند، قابل توجه است. در حال حاضر فرمولاسیون L2000 با نام تجاری نانوسید L2000 در بازار ایران موجود و به‌عنوان یک باکتری‌کش و قارچ‌کش قوی معرفی شده است. نتایج این مطالعه با استفاده از غلظت‌های پایین‌تر (۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵پی‌پی‌ام) از ذرات نانونقره نیز نشان داد که فرمولاسیون LS2000 که ذرات نقره کوچکتری (متوسط قطر ۲نانومتر) نسبت به فرمولاسیون L2000 (متوسط قطر ۱۰نانومتر) دارد به‌مراتب کشنده‌تر است و حتی در غلظت ۵پی‌پی‌ام آن نیز رشد باکتری مشاهده نشد. سویه C تا غلظت ۲۵پی‌پی‌ام و سویه S2 تا غلظت ۱۰پی‌پی‌ام از فرمولاسیون L2000 رشد کرد. کاهش جمعیت سویه‌های باکتریایی از مضرب $۱۰^{۶}$ به مضربی از $۱۰^{۵}$ در غلظت ۱۰پی‌پی‌ام و کاهش شدید تا مضربی از $۱۰^{۲}$ در غلظت ۲۰پی‌پی‌ام از فرمولاسیون حاوی ذرات بزرگتر نقره مشاهده شد.

نتایج مطالعه‌ای که روی باکتری *اشریشیا کلی* انجام شد نشان داد که خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره کاملاً به اندازه ذرات وابسته است و تنها زمانی‌که از ذرات کوچکتر (۱ تا ۱۰نانومتر) استفاده می‌شود احتمال مرگ باکتری وجود دارد[12]. تاثیر کشنده غلظت‌های پایین از فرمولاسیون LS2000 بر بیمارگرهای گیاهی نیز بیشتر از فرمولاسیون L2000 بود. با وجود اینکه دو بیمارگر *پیتیوم اولتیموم* و *فوزاریوم سولانی* تا غلظت ۲۵ و *پیتیوم آفانیدرماتوم* تا غلظت ۱۰پی‌پی‌ام از فرمولاسیون LS2000 رشد کرد اما در غلظت‌های بالاتر از این ماده هیچ رشدی دیده نشد. حساسیت اوومیست‌های بیمارگر مطالعه‌شده به فرمولاسیون LS2000 کمتر از قارچ *فوزاریوم سولانی* بود. اوومیست‌ها تا غلظت ۵۰پی‌پی‌ام کاهش رشد نداشتند در حالی که کاهش رشد *فوزاریوم سولانی* از غلظت ۵پی‌پی‌ام شروع شد. اخیراً مطالعه‌ای روی تاثیر نانوذرات نقره بر رشد دو قارچ ساپروفیت متفاوت شامل *کلادوسپوریوم کلادوسپوریویدس* (*Cladosporium cladosporioides*) و *آسپرژیلوس نایژر* (*Aspergillus niger*)

انجام شد. نتایج این پژوهش نشان داد که مقاومت قارچ‌ها نسبت به نانوذرات بزرگ نقره (متوسط ۶۰نانومتر) متفاوت است. این نوع از نانوذرات نقره در غلظت ۵۰پی‌پی‌ام، رشد *آسپرژیلوس نایژر* و *کلادوسپوریوم کلادوسپوریویدس* را به‌ترتیب ۷۰ و ۹۰% کاهش دادند. تفاوت مقاومت قارچ‌های مختلف به یک نوع از نانوذرات نقره در این مطالعه به‌خوبی نشان داده شده است[13]. تخریب دیواره سلولی توسط نانوذرات نقره در مرحله اول و سپس نفوذ ذرات به داخل آن توسط پژوهشگران[14] گزارش شده است. هر چند چگونگی تخریب دیواره توسط ذرات نقره مشخص نیست. در مطالعه دیگری[15] تفاوت نحوه تخریب دیواره دو باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (*Staphylococcus epidermidis*) در تیمار نانوذرات نقره نشان داده شد. در نتیجه تیمار *اشریشیا کلی* با نانوذرات نقره، وزیکول‌هایی بر سطح دیواره پدیدار شد که با افزایش مدت‌زمان تیمار بر تعداد آن افزوده شد. در صورتی که پس از تیمار با نانوذرات نقره ایجاد شکاف بین سلول‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مهم‌ترین تغییری بود که مشاهده شد. نتایج تصویربرداری با استفاده از AFM نشان داد که در تیمار نانوذرات نقره میسلیوم‌های باکتری تجزیه‌شده و انسجام سلولی از بین می‌رود. همان‌گونه که در شکل ۲ دیده می‌شود برخلاف فرمولاسیون L2000 که موجب تجزیه تدریجی رشته‌های میسلیومی شده است در تیمار با فرمولاسیون LS2000، میسلیوم‌ها به‌صورت توده‌ای بی‌شکل و به‌طور کامل تجزیه شده‌اند. تشکیل وزیکول بر سطح میسلیوم استرپتومایسس تیمارشده با نانوذرات نقره در این پژوهش نیز قابل مشاهده است.

یکی از مواردی که نتایج این تحقیق به‌خوبی به آن اشاره دارد مقاومت بیشتر بیمارگرهای گیاهی یوکاریوتی نسبت به باکتری‌های مفید خاک که ساختار پروکاریوتی دارند، است. بنابراین خسارت استفاده غیراستاندارد و بی‌رویه از ذرات نانونقره به فلور باکتریایی بیشتر از فلور قارچی است.

در مطالعه حاضر تاثیر تنها دو نوع فرمولاسیون نانونقره بر دو سویه استرپتومایسس و سه بیمارگر گیاهی بررسی شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده پیشنهاد می‌شود با استفاده از روش‌های توالی‌یابی نسل جدید (NGS) تاثیر انواع فرمولاسیون‌های تجاری حاوی نانوذرات نقره موجود در ایران بر جمعیت‌های میکروبی اکوسیستم‌ها یا محیط‌های مورد استفاده مانند خاک و آب بررسی شود.

## نتیجه‌گیری

تاثیر تهاجمی نانوذرات نقره بر باکتری‌ها و قارچ‌ها بسیار زیاد است. بنابراین به غیر از مصارف کنترل‌شده در پزشکی و دامپزشکی، که مقاومت بیمارگرهای انسانی و دامی به آنتی بیوتیک‌های رایج خسارات جبران‌ناپذیری را به دنبال دارد، استفاده از این مواد به‌ویژه در حجم و وسعت زیاد مانند زمین‌های کشاورزی یا گلخانه باید قبل از بررسی‌های بیشتر متوقف شود.

**تشکر و قدردانی:** بدین‌وسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی به‌خاطر فراهم‌نمودن امکانات انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

**تاییدیه‌اخلاقی:** موردی از سوی نویسندگان گزارش نشد.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** ابراهیم کریمی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۶۵%)؛ اکرم صادقی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۳۵%)

**منابع مالی:** پژوهش حاضر تحت حمایت مالی پژوهشگاه بیوتکنولوژی و در قالب پروژه مصوب ۸۸۰۲۳-۰۵-۰۵-۴ انجام شد.

## منابع

1- Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu Rev Microbiol. 2009;63:541-56.

2- Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Appl Microbiol Biotechnol. 2009;84(1):11-8.

3- Yandigeri MS, Malviya N, Solanki MK, Shrivastava P, Sivakumar G. Chitinolytic Streptomyces vinaceusdrappus S5MW2 isolated from Chilika lake, India enhances plant growth and biocontrol efficacy through chitin supplementation against Rhizoctonia solani. World J Microbiol Biotechnol. 2015;31(8):1217-25.

4- Kämpfer P. The family Streptomycetaceae, part I: Taxonomy. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. The Prokaryotes. New York: Springer; 2006. pp. 538-604.

5- Koike ST, Gladders P, Paulus AO. Vegetable diseases: A color handbook. Burlington MA: Academic Press; 2007.

6- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine. 2007;3(1):95-101.

7- Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sci. 2004;275(1):177-82.

8- Kim KJ, Sung WS, Suh BK, Moon SK, Choi JS, Kim JG, et al. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on Candida albicans. Biometals. 2009;22(2):235-42.

9- Sadeghi A, Karimi E, Abbaszadeh Dahaji P, Ghorbani Javid M, Dalvand Y, Askari H. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of Streptomyces under saline soil conditions. World J Microbiol Biotechnol. 2012;28(4):1503-9.

10- Karimi E, Sadeghi A, Abbaszadeh Dehaji P, Dalvand Y, Omidvarib M, Kakuei Nezhad M. Biocontrol activity of salt tolerant Streptomyces isolates against phytopathogens causing root rot of sugar beet. Biocontrol Sci Technol. 2012;22(3):333-49.

11- Sadegh Hassani S, Afzali J, Khosravi M. Atomic force microscopy. Tehran: Gisoom; 2014. p. 548. [Persian]

12- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005;16(10):2346-53.

13- Pulit J, Banach M, Szczygłowska R, Bryk M. Nanosilver against fungi: Silver nanoparticles as an effective biocidal factor. Acta Biochim Pol. 2013;60(4):795-8.

14- Mukha IP, Eremenko AM, Smirnova NP, Mikhienkova AI, Korchak GI, Gorchev VF, et al. Antimicrobial activity of stable silver nanoparticles of a certain size. Appl Biochem Microbiol. 2013;49(2):199-206.

15- Yang X, Yang W, Wang Q, Li H, Wang K, Yang L, et al. Atomic force microscopy investigation of the characteristic effects of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus epidermidis. Talanta. 2010;81(4-5):1508-12.