مجله زیست فناوری گیاهان دارویی

سال ششم، شماره اول، بهار و تابستان، ۱۳۹۹

سنتز نانو ذرات نقره به روش سبز با استفاده از عصاره گیاه حنا و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن

سعید قهاری[۱]*، سمیه قهاری[۲]، سجاد قهاری[۳]، قربانعلی نعمت زاده[۴]

چکیده

هر اندازه که بشر از عوارض جانبی آفت‌کش‌های شیمیایی مطلع می‌شود، میزان تقاضا برای جایگزین‌های طبیعی افزایش می‌یابد. این مطالعه با هدف بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی برگ گیاه حنا و نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه حنا بر پاتوژن‌های مهم گیاهی که معمولاً باعث آسیب‌های غیر قابل جبران به محصولات کشاورزی می‌شوند، مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، اثرات ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی برگ گیاه حنا (۰/۵۰، ۰/۲۵، ۰/۱۲، ۰/۰۶، ۰/۰۳ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO)) روی سه باکتری گرم مثبت (باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و راتایی باکتر توکسیکوس)، و پنج باکتری گرم منفی (اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، سودوموناس سیرینگه، سودوموناس ویریدی فلاوا و زانتوموناس کمپستریس) با استفاده از روش انتشار دیسک سنجیده شد. همچنین، سنتز نانو ذرات نقره در غلظت‌های مختلف نیترات نقره، مقادیر مختلف عصاره، دما، زمان و pH واکنش انجام شد. اندازه و شکل ظاهری ذرات سنتز شده توسط تکنیک‌های پراکندگی دینامیکی نور (DLS) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تعیین گردید. یافته‌ها نشان دادند که عصاره‌ی متانولی برگ گیاه حنا اثر ضد باکتریایی بسیار خوبی روی همه‌ی باکتری‌های مورد آزمایش به استثنای سودوموناس آئروژینوزا و ویریدی فلاوا دارد. علاوه بر این، فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات سنتز شده با غلظت ۰/۰۱ مولار بر باکتری‌های مورد آزمایش سنجیده شد و نتایج نشان داد که نانو ذرات بهینه شده در جهت خاصیت ضد باکتریایی مؤثر بوده است. همچنین، اندازه‌ی نانو ذرات در حضور عصاره‌ی آبی برگ گیاه حنا، ۸/۵ نانومتر به‌دست آمد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که نانو ذرات می‌توانند در حوزه‌ی کشاورزی ارگانیک مورد توجه قرار گیرند.

کلمات کلیدي: گیاه حنا، عصاره متانولی، نانو ذرات نقره، فعالیت ضد باکتریایی

[۱]* نویسنده مسئول: کارشناسی ارشد، گروه زراعت، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد تهران، تهران، ایران ، ایمیل: s.ghahary@gmail.com

[۲] دکتری شیمی آلی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

[۳] دانشجوی دکتری زیست فناوری میکروبی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۴] استاد تمام ژنتیک گیاهی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

مقدمه

از زمانی‌که انسان مبادرت به کشاورزی نمود همواره با چالش تهدید محصولات کشاورزی توسط آفات و بیماری‌های گیاهی مواجه بوده است (Brader, 1979). بشر در طول هزاران سال به دنبال یافتن روش‌های مؤثر در کنترل عوامل خسارت‌زا بر محصولات کشاورزی بوده است. به طوری‌که اولین روش‌های مبارزه با آفات و بیماری‌های گیاهی شامل روش‌های سنتی (روش‌های فیزیکی و مکانیکی) کنترل آفات بوده است. به دنبال این روش‌ها استفاده از روش‌های زراعی تغییر تاریخ کشت و تناوب از دیگر روش‌های مورد استفاده می‌باشد (Brader, 1979). تمامی روش‌های به کار برده شده تا حدی باعث کاهش میزان خسارت توسط آفات و بیماری‌های گیاهی گردید. اما با افزایش جمعیت، نیاز به تولید محصولات بیشتر برای پاسخگویی به نیازهای جمعیت در حال رشد، بیش از پیش احساس شد (طالبی جهرمی، ۱۳۹۱). روش‌های سنتی ذکر شده قادر به کنترل مؤثر عوامل خسارت‌زای گیاهی نبودند. در خلال جنگ جهانی دوم، تلاش برای یافتن روش‌های مؤثرتر در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی به ثمر نشست و ترکیبات آفت‌کش شیمیایی مختلفی بعد از سال‌ها شناسایی و وارد بازار مصرف شدند (Brader, 1979). این ترکیبات در ابتدا، کارایی بالایی در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی نشان دادند به طوری که تصور عموم بر این بود که، دیگر نیازی به سایر روش-های مرسوم در کنترل آفات و بیماری‌ها نیست و این ترکیبات به تنهایی مؤثر هستند. اما با گذشت زمان و نیز مصرف بی‌رویه، اثرات سوء مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی سنتزی را نشان دادند و منجر به بروز اثرات زیست محیطی جبران ناپذیری در محیط زیست، انسان، دام و سایر موجودات غیر هدف شدند (Farahani et al., 2018). بروز این مشکلات منجر به پیدایش دیدگاه استفاده از روش‌های کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی شد که علیرغم کنترل مؤثر این عوامل، تهدیدی برای محیط زیست و موجودات غیر هدف نداشته باشند (Isman, 2006). محققان به دنبال یافتن روش‌های جایگزین ایمن، دریافتند که گیاهان در طول میلیون‌ها سال تکامل خود در روی کره‌ی زمین همواره در حال کشمکش با گیاهخواران و پاتوژن‌های گیاهی بوده‌اند و در طول تکامل به طرق مختلف درصدد فائق آمدن بر این عوامل تهدید کننده هستند (Isman and Machial, 2006). گیاهان مکانیسم‌های دفاعی مؤثری دارند که زنده مانی آنها تحت شرایط سخت محیطی و حضور عوامل خسارت‌زا را تضمین می‌کند. در کنار مکانیسم‌های حفاظتی مورفولوژیکی، گیاهان دارای دفاع شیمیایی در برابر دشمنان نیز هستند. امروزه به دلیل توجه ویژه به سلامتی انسان، محیط زیست و همچنین مقاوم شدن گسترده‌ی آفات و بیمارگرهای گیاهی به سموم، انگیزه‌ها برای یافتن روش‌های جایگزین سموم، بسیار بیشتر شده است (Isman, 2016). از طرف دیگر تولید و مصرف گیاهان دارویی در صنایع دارویی و غذایی به علت دارا بودن ترکیبات فعال بیولوژیک رو به گسترش می‌باشد. علاوه بر این تحقیقات گسترده‌ای آغاز گردید که نشان می‌دهد، متابولیت‌های ثانویه‌ی برخی گیاهان دارویی در جلوگیری از فعالیت آفات انباری مؤثر بوده و

جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی هستند (Shaaya et al., 1997).

کاربردهای فناوری نانو در صنعت کشاورزی بی‌شمار بوده که از آن جمله می‌توان به مدیریت آفات از طریق فرمولاسیون سموم، دفع آفات و حشره‌کش‌های با پایه‌ی نانو مواد، همچنین استفاده از نانو مواد جهت تهیه‌ی انواع بیوسنسورهای کنترل تجهیزات سنجشی مورد نیاز برای کشاورزی دقیق اشاره نمود. امروزه استراتژی های مرسوم از جمله مدیریت تلفیقی آفات به کار رفته در صنعت کشاورزی کافی نبوده و کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی علیرغم کاهش حاصلخیزی خاک، اثرات جانبی بسیاری بر جانوران و انسان‌ها برجای می‌گذارد. بنابراین فناوری نانو جایگزین مؤثری برای مدیریت آفات در کشاورزی، بدون آسیب رساندن به محیط زیست می‌باشد (Ray et al., 2012). نانوتکنولوژی به کمک ابزارهای جدید توانایی لازم جهت درمان بیماری‌های گیاهی، تشخیص سریع پاتوژن‌ها با استفاده از نانوکیت‌ها و بهبود توانایی گیاهان برای جذب مواد غذایی را داراست. نانوحسگرهای زیستی و سایر سیستم‌های انتقال هوشمند از طریق مبارزه با پاتوژن‌های مختلف گیاهان زراعی، به صنعت کشاورزی کمک خواهند کرد. انتقال ژن توسط نانو ذارت برای توسعه‌ی ارقام مقاوم به حشرات جدید مفید خواهد بود. گمان بر این است که در آینده نزدیک کاتالیزورهای نانوساختار با هدف افزایش توانایی آفت‌کش‌ها و حشره‌کش‌های موجود در دسترس خواهد بود و میزان دُز مطلوب برای گیاهان زراعی را کاهش خواهد داد (Joseph and Morrison, 2006). فناوری نانو این پتانسیل را دارد که در تکنولوژی‌های مورد استفاده در بخش‌های مختلف از جمله کشاورزی انقلاب عظیمی برپا کند.

حنا با نام علمی *Lawsonia inermis*، گیاهی درختچه‌ای با برگ‌های سبز متمایل به خاکستری، بیضوی شکل و گل‌هایی به صورت خوشه گرزن بزرگ به رنگ سفید یا زرد بسیار خوشبو، با میوه‌های خشک و شکوفا حاوی دانه‌هایی خیلی کوچک می‌باشد. برگ‌های گیاه بخش دارویی آن را تشکیل می‌دهند. برداشت برگ حنا از سال دوم و سوم و کشت آن سالی دو بار صورت می‌گیرد. در مناطق جنوبی ایران و در استان‌های کرمان، هرمزگان و سیستان و بلوچستان کاشته می‌شود. انتشار عمومی این گیاه در مناطق حاره آفریقا و آسیاست (Arun et al., 2010). برگ‌های حنا حاوی ماده‌ای رنگی به نام لاوسون یا ۱- هیدروکسی نفتوکینون (۱/۳ - ۰/۲۲ درصد)، گلیکوزیدهای فنلی متعدد مانند کومارین (Coumarin)، گزانتون (Xanthone)، کینوئید (Quinoids)، گلیکوزید بتا سیتوسترول و فلاونوئیدهایی نظیر: لوتئولین (Luteolin) و مشتق ۵ - ۷ - گلوکوزیدی آن، چربی، رزین و تانن می‌باشند. حنا علاوه بر موارد مذکور دارای مانیتول و موسیلاژ است. وجود موسیلاژ باعث می‌گردد که برگ حنا به سهولت با آب به صورت خمیر درآید. حنا دارای ۱/۲% اسانس می‌باشد. حنا به صورت موضعی در درمان بیماری‌های قارچی پوستی به ویژه در قارچ‌های عامل کچلی و تخفیف دردهای روماتیسمی به کار می‌رود. همچنین به عنوان رنگ کننده به ویژه رنگ کردن پوست و مو کاربرد دارد. حنا از رنگ‌های طبیعی بی‌زیان می‌باشد. اثر ضد باکتری و ضد قارچی حنا را نیز

به لاوسون نسبت می‌دهند. حنا دارای اثر ضد باکتریایی خصوصاً در باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. همچنین دارای اثر ضد قارچی در قارچ‌های مولد کچلی تریکوفایتون، اسپوروتریکوم و کریپتوکوکوس است (Chaudhary et al., 2010).

کریتیگا و جایاچیترا (۲۰۱۲)، فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی اتانولی و آبی گیاه حنا را مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج بدست آمده، عصاره‌ی الکلی حنا خاصیت ضد باکتریایی بیشتری از عصاره‌ی آبی آن روی باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد (Krithiga and Jayachitra, 2012). کمال (۲۰۱۰)، فعالیت‌های فارماکولوژیکی گیاه حنا را مورد بررسی قرار داد (Kamal, 2010). ساروجینی و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی حنا را در حلال‌های هگزان، کلروفرم، اتیل استات و استونیتریل مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق آزمایشگاهی مشخص گردید که عصاره‌ی متانولی گیاه حنا اثرات مهاری قابل توجهی بر باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی دارد. در این بین اثرات مهاری برای باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی بود، به طوری که مشخص شد که از بین چهار باکتری استفاده شده، استافیلوکوکوس اورئوس حساس-ترین و سودوموناس آئروژینوزا مقاوم ترین باکتری‌ها در برابر عصاره‌ی گیاهی بودند (Sarojini et al., 2012). ال- دمی و همکاران (۲۰۱۶) فعالیت ضد باکتریایی برگ گیاه حنا را در پنج حلال متانول، اتانول، استون، اتیل استات و آب دو بار تقطیر مورد ارزیابی قرار دادند. در آزمایشات آنها استون به عنوان بهترین حلال که بیشترین فعالیت ضد میکروبی را دارد معرفی گردید (Al-Daamy et al., 2016).

در دهه‌های اخیر استفاده از نانو ذرات در زمینه‌ی درمان بیماری‌های انسانی و گیاهی کاربردهای بسیار زیادی پیدا کرده است. سالم و همکاران (۲۰۱۴) فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات نقره‌ی سنتز شده از عصاره‌ی برگ و شیرابه‌ی گیاه انجیر را روی ۹ پاتوژن بیماری‌زای انسانی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که این نانو ذرات دارای اثرات ضد باکتریایی روی پاتوژن‌های مورد آزمایش بودند (Salem et al., 2014). رامش و همکاران (۲۰۱۵) نانو ذرات اکسید روی گیاه تاجریزی را سنتز و فعالیت ضد باکتریایی آن را مورد ارزیابی قرار دادند (Ramesh et al., 2015). سورش و همکاران (۲۰۱۵) نانو ذرات اکسید روی را از گیاه فلوس (خیار چنبر) سنتز و خواص ضد باکتریایی آن را سنجیدند (Suresh et al., 2015). صدیقی و همکاران (۲۰۱۵) نقش نانو ذرات در گیاهان را مورد بررسی قرار دادند و بیان داشتند که نانو ذرات به دلیل خواص فیزیکی منحصر به فرد نظیر: سطح واکنش پذیری بالا و قابلیت تنظیم اندازه‌ی منافذ و مورفولوژی ذرات در کشاورزی کاربرد بسیاری دارند. با استفاده از نانو ذرات می‌توان علف‌کش‌های حاوی نانو ذرات، کودهای حاوی نانو ذرات آفت‌کش را سنتز یا از آنها می‌توان برای انتقال ژن به اندام‌های خاصی از گیاه یا جانور استفاده کرد (Siddiqui et al., 2015).

هدف از این پژوهش بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی برگ گیاه حنا، سنتز نانوذرات یکنواخت با توزیع اندازه همگون و پراکندگی مناسب و

بررسی اثر نانوذرات و عصاره بر رشد باکتری‌های مورد مطالعه در پژوهش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق تجربی و آزمایشگاهی طی تابستان ۱۳۹۷ در آزمایشگاه پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام پذیرفت. عصاره‌ی متانولی گیاه مورد بررسی به روش ماسراسیون تهیه گردید. برگ گیاه حنا از مراتع، باغات و مناطق طبیعی شهر بزمان استان سیستان و بلوچستان طی تابستان ۱۳۹۷ جمع آوری گردید. برگ‌های گیاه به دور از نور خورشید و در سایه خشک شدند. گیاه خشک شده توسط آسیاب برقی به صورت پودر درآمد و پودر حاصله در ظرف شیشه ای دربسته تیره، جهت آزمایشات بعدی در یخچال نگهداری گردید.

روش تهیه‌ی عصاره‌ی گیاهی

الف- عصاره‌ی متانولی

۱۰ گرم از پودر گیاه را در ۱۷۰ میلی لیتر متانول به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق توسط شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه با هم مخلوط نموده تا عصاره‌گیری انجام شود. مخلوط حاصل با استفاده از قیف شیشه‌ای، صاف و سپس محلول صاف شده توسط دستگاه تبخیر کن در خلاء با حرارت ۴۰ درجه‌ی سانتیگراد خشک گردید. در مرحله‌ی بعد از عصاره‌ی حاصله غلظت‌های ۰/۵۰، ۰/۲۵، ۰/۱۲، ۰/۰۶، ۰/۰۳ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر دی متیل سولفوکسید جهت استفاده در آزمون انتشار از دیسک تهیه گردید و میزان مهارکنندگی هر غلظت بر باکتری‌های مورد آزمایش سنجیده شد (علی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۵؛ حدادی و همکاران، ۱۳۹۷، Ghahari et al., 2015، Ghahari et al., 2017، Ghahari et al., 2017، Ghahari et al., 2018، Hadadi et al., 2020).

ب- عصاره‌ی آبی

به ازای هر بار سنتز نانو ذره، به یک گرم از پودر برگ گیاه حنا مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از آب دیونیزه شده اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق توسط شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه کاملاً هم زده شد. محلول حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر و سپس برای جداسازی هرگونه ذرات درشت و غیرقابل حل، با دور rpm ۸۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت فاز رویی برای سنتز نانو ذرات مورد استفاده قرار گرفت (Dong et al., 2017).

بررسی فعالیت ضد باکتریایی

باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش از آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان تهیه گردیدند. فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی مورد آزمایش روی سه باکتری گرم مثبت (باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و راتایی باکتر توکسیکوس) و پنج باکتری گرم منفی (اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، سودوموناس سیرینگه، سودوموناس ویریدی فلاوا و زانتوموناس کمپستریس) بر اساس روش

پیشنهادی کیربی - باور (Ghahari et al., 2015) به شرح ذیل اجرا شد: دیسک‌های کاغذی به قطر ۶ میلی-متر تهیه و استریل شدند. دیسک‌ها را با ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف تهیه شده از عصاره‌ی گیاهی آغشته و با پنس بر سطح آگار محیط کشت آغشته با سوسپانسیون میکروبی قرار داده و به آرامی به سمت پایین فشار داده تا دیسک کاملاً با سطح آگار تماس حاصل کند. پتری دیش‌ها برای سویه‌های استاندارد در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و برای باکتری‌های گیاهی در حرارت ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از گذشت زمان مورد نظر قطر هاله‌های عدم رشد با استفاده از کولیس بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شدند. برای باکتری‌های استاندارد از آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده‌ی جنتامایسین (۱۰ µg/disc) و کلرامفنیکل (۳۰ µg/disc) و برای باکتری‌های گیاهی از استرپتومایسین سولفات (۱۰ µg/mL) به عنوان کنترل مثبت و از دی متیل سولفوکسید و دیسک خالی به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. فعالیت‌های ضد باکتریایی در چهار تکرار، با اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) در سطح پلیت‌ها و با نرم افزار اکسل و به صورت میانگین ± انحراف معیار مورد بررسی قرار گرفتند.

سنتز نانو ذرات نقره

الف- تهیه محلول نیترات نقره

برای تهیه محلول نیترات نقره از نمک $AgNO_3$ شرکت سیگما آلدریچ استفاده گردید. برای تهیه محلول ۰/۰۱مولار، ۰/۱۶۹۸گرم پودر نیترات نقره به ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد.

ب- بررسی اثر فاکتورهای مختلف مؤثر بر سنتز نانو ذرات

به منظور بهینه سازی شرایط تولید و دست‌یابی به نانوذرات همگون، اثر عوامل شیمیایی و فیزیکی مختلف مانند؛ غلظت‌های مختلف نیترات نقره (۰/۰۲۵، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۴ مولار)، نسبت‌های مختلف عصاره (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌لیتر)، دمای واکنش (۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه) و pH (۲، ۴ و ۷) واکنش مورد مطالعه قرار گرفت.

ج- سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره‌ی گیاه حنا

۳۰ میلی‌لیتر از عصاره‌ی گیاه حنا با ۹۰ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره ۰/۰۱ مولار در دمای محیط (۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) و شرایط روشنایی و به مدت ۳۰ دقیقه در pH = ۷ با هم ترکیب شدند. به منظور تولید صحیح و کامل نانو ذرات نقره، قبل از اضافه نمودن عصاره به محلول نیترات نقره، یک عدد مگنت به منظور همگن نمودن و جلوگیری از توده‌ای شدن نانو ذرات در حال تولید، در محلول قرار داده شد.

د- تخلیص نانو ذرات

پس از اتمام واکنش‌ها و احیای نیترات نقره توسط عصاره‌ی گیاه، محلول واکنش در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. برای حذف کامل زیست‌مولکول‌ها

(مثل آنزیم‌ها و پروتئین‌های آزاد) و ترکیبات گیاهی آزاد موجود، سه بار سانتریفیوژ لازم است. پس از خارج نمودن فاز روئی، مقداری آب دوبار تقطیر به رسوب حاوی نانو ذرات افزوده و برای همگن‌سازی، نمونه ورتکس شد. برای آزمایش‌های تعیین ویژگی، نانوذرات خالص نقره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Ghosh et al., 2011).

آنالیز آماری

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ی گیاهی برگ حنا از نظر قطر هاله عدم رشد میکروارگانیسم مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات بعد از چهار تکرار به صورت نتایج ± انحراف معیار (SD) با استفاده از مایکروسافت اکسل گزارش شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام و مقایسه میانگین‌ها نیز به روش دانکن انجام گرفت.

نتایج

بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی حنا

با تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی برگ گیاه حنا بر باکتری‌های بیماری‌زا، مشخص گردید که این عصاره اثر بازدارندگی قابل ملاحظه‌ای روی باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی دارد و هر چقدر میزان غلظت عصاره‌ی متانولی افزایش می‌یابد اثر بازدارندگی نیز به صورت افزایش هاله، عدم رشد بیشتر و چشمگیرتر می‌شود.

این مطالعه نشان داد که اثرات مهاری عصاره‌ی متانولی بر باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی گیاه حنا به روش انتشار از دیسک و به صورت میانگین ± انحراف معیار بعد از ۴ تکرار در جدول ۱ آورده شده است. همچنین برای مقایسه‌ی نتایج، از آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و کلرامفنیکل به عنوان کنترل مثبت و از دی متیل سولفوکسید و دیسک خالی به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

جدول ۱- فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی برگ گیاه حنا بر روی باکتری‌های استاندارد

قطر هاله توقف رشد بر حسب میلی‌متر				
غلظت[الف] (mg/mL)	گرم مثبت		گرم منفی	
	باسیلوس سویتیلیس	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیاکلی	سودوموناس آئروژینوزا
۰/۵۰	۲۵/۰±۰/۰	۲۸/۰±۱/۰	۲۵/۵ ±۰/۵	-
۰/۲۵	۱۸/۵±۰/۵	۲۷/۵±۰/۵	۱۹/۰ ± ۱/۰	-
۰/۱۲	۱۶/۰±۰/۰	۲۵/۵±۰/۵	۱۴/۰ ±۰/۰	-
۰/۰۶	۱۵/۰±۰/۰	۱۹/۰±۱/۰	۱۱/۵ ± ۰/۵	-
۰/۰۳	۱۵/۵±۰/۵	۱۰/۰±۰/۰	۱۱/۵ ±۰/۵	-
۰/۰۱	۱۳/۰±۱/۰	۹/۵±۰/۵	۱۰/۵ ±۰/۵	-
جنتامایسین[ب]	۲۶/۰±۱/۷	۲۰/۳±۱/۵	۱۹/۶±۱/۱	۱۵/۶±۰/۵
کلرامفنیکل[ب]	۲۲/۳±۱/۲	۲۱/۷±۰/۶	۲۰/۷±۱/۵	-
DMSO	-	-	-	-

الف- ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت روی دیسک ریخته شد.

ب- از جنتامایسین با غلظت ۱۰ µg/mL و کلرامفنیکل با غلظت ۳۰ µg/mL به عنوان آنتی‌بیوتیک استاندارد استفاده شد.

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی متانولی برگ گیاه حنا بر باکتری‌های گیاهی به روش انتشار از دیسک و به صورت میانگین ± انحراف معیار بعد از ۴ تکرار در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد، عصاره‌ی متانولی برگ گیاه حنا اثر بازدارندگی قابل ملاحظه‌ای روی باکتری-های سودوموناس سیرینگه، راتایی باکتر توکسیکوس و زانتوموناس کمپستریس دارد و هر چقدر میزان غلظت عصاره افزایش می‌یابد اثر بازدارندگی بیشتر و چشمگیرتر می‌شود. همچنین برای مقایسه‌ی نتایج، از آنتی بیوتیک استرپتومایسین سولفات به عنوان کنترل مثبت و از دی متیل سولفوکسید و دیسک خالی به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

جدول ۲- فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی برگ گیاه حنا بر روی باکتری‌های گیاهی

قطر هاله توقف رشد بر حسب میلی‌متر				
غلظت[الف] (mg/mL)	گرم مثبت	گرم منفی		
	راتایی باکتر توکسیکوس	سودوموناس سیرینگه	ویریدی فلاوا	زانتوموناس کمپستریس
۰/۵۰	۲۳/۰±۰/۷	۲۶/۰ ±۰/۵	-	۲۲/۰±۰/۵
۰/۲۵	۱۷/۰±۰/۵	۲۰/۰ ± ۱/۰	-	۱۵/۵±۰/۲
۰/۱۲	۱۵/۵±۰/۷	۱۵/۰ ±۰/۵	-	۱۳/۰±۰/۰
۰/۰۶	۱۳/۰±۰/۲	۱۲/۰ ± ۰/۵	-	۱۲/۵±۰/۵
۰/۰۳	۱۲/۰±۰/۵	۱۰/۵ ±۰/۲	-	۱۱/۰±۰/۵
۰/۰۱	۱۰/۵±۱/۰	۱۰/۰ ±۰/۰	-	۱۰/۰±۰/۰
استرپتومایسین سولفات[ب]	-	۱۱/۰۰ ± ۰/۰۰	۱۰/۵۰ ± ۰/۵۰	۱۰/۵۰ ± ۰/۵۰
DMSO	-	-	-	-

الف- ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت روی دیسک ریخته شد.

ب- از استرپتومایسین سولفات با غلظت µg/mL ۱۰ به عنوان آنتی‌بیوتیک استاندارد استفاده شد.

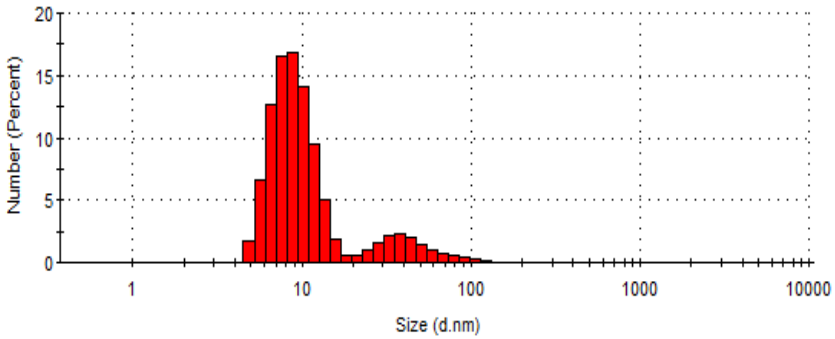
سنتز نانو ذرات نقره

پس از اضافه کردن محلول نیترات نقره به عصاره‌ی برگ گیاه حنا، با توجه به غلظت‌های مختلف نیترات نقره، مقادیر مختلف عصاره، دمای واکنش، زمان واکنش، pH محلول، با گذشت زمان رنگ محلول از سبز (عصاره برگ) به رنگ قهوه‌ای متمایل به سیاه تغییر می‌یابد (Aravinthan et al., 2015; Sudhakar et al., 2015). این تغییر رنگ بسته به شرایط آزمایش متفاوت است (Prabu and Johnson, 2015). با گذشت زمان شدت تغییر رنگ بیشتر خواهد بود که به علت بزگ‌تر شدن هسته نانو ذرات نسبت به لحظه نخست می‌باشد (Vivekanandhan et al., 2012). با توجه به استفاده از غلظت‌های مختلف نیترات نقره (۰/۰۲۵، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۴ مولار)، نسبت‌های مختلف عصاره (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی-لیتر)، دماهای مختلف واکنش (۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان‌های متفاوت (۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه) و pH های متغیر (۲، ۴ و ۷)، ترکیب ۳۰ میلی-لیتر از عصاره‌ی گیاه حنا با ۹۰ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره ۰/۰۱ مولار در دمای محیط (۲۵ درجه‌ی سانتی-گراد) و شرایط روشنایی و به مدت ۳۰ دقیقه در pH = ۷ به عنوان شرایط بهینه برای تولید و دست‌یابی به نانوذرات همگون انتخاب شد.

تعیین مشخصه های نانوذرات

الف- نتایج آنالیز به روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS)

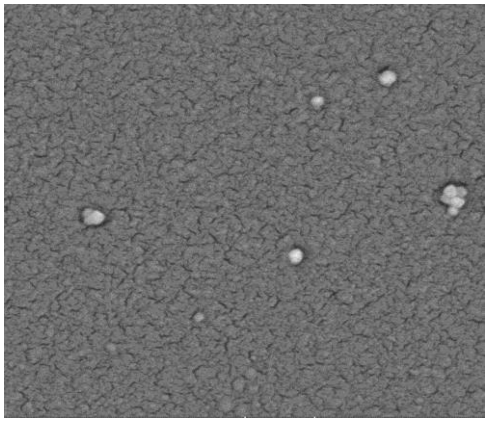
روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS) که گاهی طیف‌سنجی ارتباط فوتونی نیز نامیده می‌شود. برای تعیین توزیع اندازه ذرات در محیط مایع مورد استفاده قرار می‌گیرد. دستگاه DLS با استفاده از تابش نور مرئی با طول موج ۶۳۳ نانومتر به نمونه کلوییدی، می‌تواند برخی از خواص نمونه مثل توزیع اندازه پتانسیل زتا را محاسبه کند. اگر به یک ذره کوچک نور لیزر تابانده شود، ذره نور را در تمامی جهات پراکنده می‌سازد. میزان تغییر در فرکانس نور پخش شده، با اندازه ذرات مرتبط بوده و برای تعیین اندازه‌ی آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج DLS نشان می‌دهد که اندازه‌ی نانو ذرات در حضور عصاره‌ی آبی برگ گیاه حنا ۸/۵ نانومتر است. نتایج در شکل ۱ گزارش شده است.



شکل ۱: نتایج DLS نانو ذرات سنتز شده‌ی نقره با اندازه‌ی ۸/۵ نانومتر

ب- نتایج آنالیز به روش میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

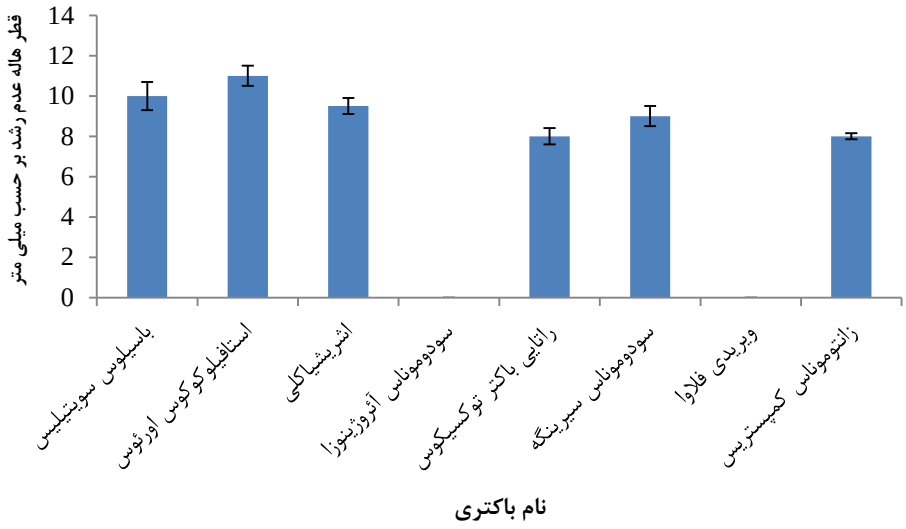
به منظور ارزیابی شکل و اندازه نانو ذرات، از میکروسکوپ الکترونی KV ۲۰ استفاده شد. برای این منظور، مقداری از پودر نانو ذرات نقره‌ی به دست آمده روی یک شبکه فلزی قرار گرفت و پس از پوشاندن با لایه‌ی نازکی از طلا برای تصویربرداری استفاده شد. نتایج حاصل در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: تصویر میکروگراف نانوذرات سنتز شده نقره

بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره‌ی آبی گیاه حنا

جهت بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات نقره‌ی سنتز شده، سه باکتری گرم مثبت (باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و راتایی باکتر توکسیکوس) و پنج باکتری گرم منفی (اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، سودوموناس سیرینگه، سودوموناس ویریدی فلاوا و زانتوموناس کمپستریس) انتخاب و با غلظت ۰/۰۱ مولار از نانو ذرات نقره تیمار شدند و میزان جذب نوری OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر پس از ۲۴ ساعت از تیمار باکتری‌ها با نانو ذرات ارزیابی گردید (شکل ۳). نتایج نشان داد که با گذشت زمان میزان OD کاهش یافت و این نتایج بیانگر تأثیر مهار کنندگی از رشد و یا کشندگی نانو ذرات سنتز شده بر اکثر باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق است. همچنین مشاهده گردید که نانو ذرات سنتز شده دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بودند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نانو ذرات بهینه شده در جهت خاصیت ضد باکتریایی مؤثر بوده است و با توجه به این که مقاومت باکتریایی یکی از مشکلات بسیار مطرح است، لذا نانو مواد به عنوان جایگزینی مناسب برای مهار و از بین بردن این باکتری‌ها می‌توانند مورد توجه قرار گیرند (Fortner et al., 2005).



شکل ۳: میزان بازدارندگی باکتری‌ها ۲۴ ساعت پس از از تیمار با نانو ذره نقره

بحث

کریتیگا و جایاچیترا (۲۰۱۲)، فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی اتانولی و آبی گیاه حنا را مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج بدست آمده عصاره‌ی الکلی حنا خاصیت ضد باکتریایی بیشتری از عصاره‌ی آبی آن بر باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد (Krithiga and Jayachitra, 2012). در مطالعه‌ی دیگری، کمال و جاواید (۲۰۱۰)، فعالیت‌های فارماکولوژیکی گیاه حنا را مورد بررسی قرار دادند (Kamal, 2010). ساروجینی و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی حنا را در حلال‌های هگزان، کلروفرم، اتیل استات و استونیتریل مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق آزمایشگاهی مشخص گردید که عصاره‌ی متانولی گیاه حنا اثرات مهاری قابل توجهی بر باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی دارد. در این آزمایش مشخص گردید که اثرات مهاری برای باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی بود، به طوری که که از بین چهار باکتری استفاده شده، استافیلوکوکوس اورئوس حساس‌ترین و سودوموناس آئروژینوزا مقاوم ترین باکتری‌ها در برابر عصاره‌ی گیاهی بودند (Sarojini et al., 2012). نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر با تحقیقات انجام شده توسط محققان مطابقت داشت. نتایج آزمایش نشان داد که عصاره‌ی متانولی گیاه حنا تاثیر متفاوتی روی باکتری‌ها داشته است. علت تآثیر متفاوت عصاره‌های متانولی گیاه حنا بر رشد باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت ممکن است به دلایل مختلفی از جمله: تفاوت ساختاری موجود بین دیواره این دو گروه از باکتری‌ها باشد. همان‌گونه که در بخش یافته‌ها مشخص گردید عصاره متانولی برگ گیاه حنا اثرات قابل توجهی علیه باکتری‌های گرم مثبت از جمله باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس داشته و از باکتری‌های گرم منفی بر سودوموناس آئروژینوزا اثری نداشت و فقط بر باکتری اشرشیاکلی اثر نشان داد که علت احتمالی آن

وجود لیپو پلی ساکاریدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که مانند سدی از عبور مولکول‌های بزرگ و آبگریز ممانعت می‌کنند و از آنجایی که اکثر ترکیبات مؤثر موجود در عصاره‌ها و اسانس‌ها ماهیت آبگریزی دارند. لذا می‌توان چنین نتیجه گرفت که این مواد امکان نفوذ و دسترسی به نقاط فعال داخل باکتری‌های گرم منفی را ندارند و معمولاً باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بیشتری نسبت به ترکیبات گیاه نشان می‌دهند.

در این تحقیق فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی برگ گیاه حنا روی سه باکتری گرم مثبت (باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و راتایی باکتر توکسیکوس) و پنج باکتری گرم منفی (اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، سودوموناس سیرینگه، سودوموناس ویریدی فلاوا و زانتوموناس کمپستریس) بر اساس روش انتشار دیسک مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده عصاره‌ی متانولی برگ گیاه حنا اثر ضد باکتریایی بسیار خوبی را بر کلیه‌ی باکتری-های مورد آزمایش به استثنای سودوموناس آئروژینوزا و ویریدی فلاوا نشان داد.

در ادامه نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره‌ی آبی گیاه حنا سنتز شدند و فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات سنتز شده با غلظت ۰/۰۱ مولار بر باکتری‌های مورد آزمایش سنجیده شد و نتایج نشان داد که نانو ذرات بهینه شده در جهت خاصیت ضد باکتریایی مؤثر بوده است. همچنین اندازه و شکل نانو ذرات با استفاده از روش‌های پراکندگی دینامیکی نور (DLS) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتایج نشان می‌دهد که اندازه‌ی نانو ذرات در حضور عصاره‌ی آبی برگ گیاه حنا ۸/۵ نانومتر است.

سپاسگزاری

از مجموعه مدیریت پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان و همکاران آن حوزه که امکانات مورد نیاز را در اختیار ما قرار دادند صمیمانه تشکر می-نماییم.

منابع

طالبی جهرمی، خ. (۱۳۹۱). سم شناسی آفتکش‌ها- حشره-کش‌ها- کنه‌کش‌ها- موش‌کش‌ها، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، ۵۰۰ صفحه.

علی‌نژاد، ح.، قهاری، س.، نعمت‌زاده، ق.ع.، تاجبخش، م.، بهارفر، ر. (۱۳۹۵). بررسی ترکیب‌های شیمیایی و اثرات ضد میکروبی عصاره‌ی متانولی دانه‌ی سویا، زیست فناوری گیاهان دارویی، سال دوم، شماره سوم، ۳۷-۴۷.

حدادی، ز.، نعمت‌زاده، ق.ع.، قهاری، س. (۱۳۹۷). بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس و اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانتی عصاره‌های متانولی و کلروفرمی گیاهان دارویی اُکالیپتوس، زوفا و اقاقیا، زیست فناوری گیاهان دارویی، سال چهارم، شماره دوم، ۷۰-۹۳.

Al-Daamy, A.A.H.K., Hassan, A.A. and Mahmood, A. (2016). Study of antibacterial activity of *Lawsonia inermis* leaf extract. Journal of Contemporary Medical Sciences, 2(7), 103-106.

Biochemical Composition, Antioxidant and Biological Activities of the Essential Oil and Fruit Extract of *Xanthium strumarium* Linn. From Northern Iran. Journal of Agricultural Science and Technology, 19, 1603-1616.

Ghahari, S., Alinezhad, H., Nematzadeh, G.A. and Ghahari, S. (2015). Phytochemical screening and antimicrobial activities of the constituents isolated from *Koelreuteria paniculata* leaves. Natural product research, 29(19), 1865-1869.

Ghahari, S., Alinezhad, H., Nematzadeh, G.A., Tajbakhsh, M. and Baharfar, R. (2017). Chemical Composition, Antioxidant and Biological Activities of the Essential Oil and Extract of the Seeds of *Glycine max* (Soybean) from North Iran. Current microbiology, 74(4), 522-531.

Ghahari, S., Alinezhad, H., Nematzadeh, G.A., Tajbakhsh, M. and Baharfar, R. (2018). Phytochemical, Antioxidant and Biological Activities of the Essential Oil of *Astragalus alopecurus* Pall. Fruits from Northern Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 21(1), 103-115.

Ghosh, S., Patil, S., Ahire, M., Kitture, R., Jabgunde, A., Kale, S., Pardesi, K., Bellare, J., Dhavale, D.D. and Chopade, B.A. (2011). Synthesis of gold nanoanisotrops using *Dioscorea bulbifera* tuber extract. Journal of Nanomaterials.

Hadadi, Z., Nematzadeh, G.A. and Ghahari, S. (2020). A study on the antioxidant and antimicrobial activities in the chloroformic and methanolic extracts of 6 important medicinal plants collected from North of Iran. BMC chemistry 14:1-11.

Isman, M.B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol., 51, 45-66.

Isman, M.B. (2016). Pesticides based on plant essential oils: Phytochemical and practical

Aravinthan, A., Govarthanan, M., Selvam, K., Praburaman, L., Selvankumar, T., Balamurugan, R., Kamala-Kannan, S. and Kim, J.-H. (2015). Sunroot mediated synthesis and characterization of silver nanoparticles and evaluation of its antibacterial and rat splenocyte cytotoxic effects. International journal of nanomedicine, 10, 1977.

Arun, P., Purushotham, K.G., Jayarani, J.J. and Vasantha, K. (2010). In vitro antibacterial activity and flavonoid contents of Lawsonia inermis (Henna). International Journal of PharmTech Research, 2(2), 1178-1181.

Brader, L. (1979). Integrated pest control in the developing world. Annual Review of Entomology, 24(1), 225-254.

Chaudhary, G., Goyal, S. and Poonia, P. (2010). *Lawsonia inermis* Linnaeus: a phytopharmacological review. Int J Pharm Sci Drug Res, 2(2), 91-98.

Dong, C., Cao, C., Zhang, X., Zhan, Y., Wang, X., Yang, X., Zhou, K., Xiao, X. and Yuan, B. (2017). Wolfberry fruit (*Lycium barbarum*) extract mediated novel route for the green synthesis of silver nanoparticles. Optik, 130, 162-170.

Farahani, S., Bandani, A. and Eslami, S. (2018). Comparison of susceptibility of two Iranian populations of Tetranychus urticae Koch (Acari: Tetranychidae) to spirodiclofen. Persian Journal of Acarology, 7(3).

Fortner, J.D., Lyon, D.Y., Sayes, C.M., Boyd, A.M., Falkner, J.C., Hotze, E.M., Alemany, L.B., Tao, Y.J., Guo, W., Ausman, K.D., Colvin, V.L. and Hughes, J.B. (2005). C60 in water: nanocrystal formation and microbial response. Environmental Science & Technology, 39(11), 4307-4316.

Ghahari, S., Alinezhad, H., Nematzadeh, G.A., Tajbakhsh, M. and Baharfar, R. (2017).

Industrial Crops and products, 62, 228-234.

Sarojini, N., Kanti, C.C., Manjari, S.A., usha Kumari, S. and Priyanka, J.. (2012). In vitro antibacterial activities of *Lawsonia inermis* leaf extracts. International Research Journal of Pharmacy, 3(7), 195-197.

Shaaya, E., Kostjukovski, M., Eilberg, J. and Sukprakarn, C. (1997). Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. Journal of Stored Products Research, 33(1), 7-15.

Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Firoz, M. and Al-Khaishany, M.Y. (2015). Role of nanoparticles in plants. Nanotechnology and Plant Sciences (pp. 19-35): Springer.

Sudhakar, C., Selvam, K., Govarthanan, M., Senthilkumar, B., Sengottaiyan, A., Stalin, M. and Selvankumar, T. (2015). Acorus calamus rhizome extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their bactericidal activity against human pathogens. Journal of genetic engineering and biotechnology, 13(2), 93-99.

Suresh, D., Nethravathi, P.C., Rajanaika, H., Nagabhushana, H. and Sharma, S.C. (2015). Green synthesis of multifunctional zinc oxide (ZnO) nanoparticles using *Cassia fistula* plant extract and their photodegradative, antioxidant and antibacterial activities. Materials Science in Semiconductor Processing, 31, 446-454.

Vivekanandhan, S., Venkateswarlu, M., Carnahan, D., Misra, M., Mohanty, A.K. and Satyanarayana, N. (2012). Functionalization of single-walled carbon nanotubes with silver nanoparticles using Tecoma stans leaf extract. Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures, 44(7-8), 1725-1729.

considerations Medicinal and aromatic crops: production, phytochemistry, and utilization (pp. 13-26): ACS Publications.

Isman, M.B. and Machial, C.M. (2006). Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. Advances in phytomedicine, 3, 29-44.

Joseph, T. and Morrison, M. (2006). Nanotechnology in agriculture and food: a nanoforum report: Nanoforum. org.

Kamal, M. (2010). Pharmacological activities of *lawsonia inermis* Linn.: a review. Molecules, 15(4), 2139-2151.

Krithiga, N. and Jayachitra, A. (2012). Antioxidant and antibacterial study on *Coleus aromaticus* and *Lawsonia inermis*. International Journal of Pharmacy & Life Sciences, 3(9).

Prabu, H.J. and Johnson, I. (2015). Plant-mediated biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by leaf extracts of *Tragia involucrata*, *Cymbopogon citronella*, *Solanum verbascifolium* and *Tylophora ovata*. Karbala International Journal of Modern Science, 1(4), 237-246.

Ramesh, M., Anbuvannan, M. and Viruthagiri, G.J.S.A.P.A.M. (2015). Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and their antibacterial activity. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 136, 864-870.

Ray, D.K., Ramankutty, N., Mueller, N.D., West, P.C. and Foley, J.A. (2012). Recent patterns of crop yield growth and stagnation. Nature communications, 3(1), 1-7.

Salem, W.M., Haridy, M., Sayed, W.F. and Hassan, N.H. (2014). Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized from latex and leaf extract of *Ficus sycomorus*.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 6, No 1, Spring & Summer 2020

Biosynthesis of silver nanoparticles in green way using aqueous extract of henna leaves and investigate its antibacterial activity

Saeid Ghahari[1,*], Somayeh Ghahari[2], Sajjad Ghahari[3], Ghorban Ali Nematzadeh[4]

Abstract

As much as human beings become aware of the side effects of chemical pesticides, the demand for natural alternatives increases. In this study, antibacterial effects of different concentrations of methanolic extract of henna leaves (0.50, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03 and 0.01 mg/mL DMSO) on three gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Rathayibacter toxicus*), and five gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae* subsp. syringae, *Pseudomonas viridiflava*, and *Xanthomonas campestris* pv. Campestris) was measured with disk diffusion method. Also, silver nanoparticles were synthesized at different amounts of silver nitrate, extract, temperature, time, and pH. The size and shape of the synthesized particles were determined by DLS and SEM techniques. The results showed that the methanolic extract of henna leaves has an excellent antibacterial effect on all tested bacteria except *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas viridiflava*. In addition, the antibacterial activity of the synthesized nanoparticles at a concentration of 0.01 M was measured on the tested bacteria and the results showed that the optimized nanoparticles were effective in terms of antibacterial properties. Also, the nanoparticle size in the presence of aqueous extract of henna leaves was 8.5 nm. The results of this study show that nanoparticles can be considered in the field of organic agriculture.

Keywords: Henna plant, Methanolic extract, Silver nanoparticles, Antibacterial activity

[1]* Corresponding author, Master's, Faculty of Agricultural Sciences, Department of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran. Email: s.ghahary@gmail.com
[2] PhD in Organic Chemistry, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
[3] Ph.D student, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
[4] Professor in Plant Genetic, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.