

مطالعه اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره پوشش دار شده با آلجينات *Dulcicalothrix alborzica* بیوسنتز شده توسط

بهاره نوروزی^{*}، حسن بیرانوند^۱

مقاله پژوهشی

مقدمه: امروزه، سیانوباکتری‌ها یکی از کاندیدهای مهم در بیوسنتز سبز نانوذرات هستند. با توجه به مضرات استفاده از نانوذرات ساخته شده به روش شیمیایی، هدف از این مطالعه بیوسنتز و مطالعه فعالیت ضد میکروبی نانوذرات توسط سیانوباکتریوم آبزی می‌باشد.

روش بررسی: بیوسنتز نانوذرات نقره توسط سیانوباکتری *Dulcicalothrix alborzica* با سه روش مختلف بیومس‌تر، جوشاندن و پلی‌ساقاریدهای خارج سلولی انجام شد. برای افزایش پایداری، پوشش دارسازی نانوذرات با استفاده از آلجينات انجام شد. مشخصه‌یابی نانوذرات با استفاده از طیف‌سنجی جذب - UV-vis، آنالیز تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و پتانسیل زتا انجام شد. در نهایت، خواص ضد میکروبی نانوذرات روی پاتوژن‌های بیماری‌زای ماهی انجام شد. آنالیزهای آماری با نرمافزار SPSS version 16 آزمون توکی انجام گردید و تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه با حدود اطمینان ۹۵٪ و آزمون توکی انجام گردید و نتایج به صورت نمودار با نرمافزار Excel رسم شد.

نتایج: نتایج طیف‌سنجی، تشکیل نانوذرات نقره از عصاره سیانوباکتری در هر سه روش را تأیید کرد. نتایج FTIR نشان داد که هر سه طیف با هم مطابقت دارند که نشان‌دهنده برابری خلوص و تولید ترکیبات مشابه است. شکل‌های میکروسکوپ الکترونی، کروی بودن نانوذرات تهیه شده با روش جوشاندن را نشان دادند و نانوذرات بدون پوشش و پوشش آلجينات به ترتیب به طور میانگین قطر ۳۸ و ۱۸۰/۰۰ نانومتر داشتند. پتانسیل زتا بار مثبت روی سطح نانوذرات را نشان داد. بیشترین قطر هاله رشد در نانوذرات سنتز شده به روش جوشاندن و پوشیده شده با آلجينات مشاهده شد. نتایج مشابهی در بررسی خواص ضد قارچی نانوذرات مشاهده شد و *Saprolegnia* در بین دو گونه مورد مطالعه حساسیت بیشتری به نانوذرات سنتز شده نشان داد.

نتیجه‌گیری: جنس جدید *Dulcicalothrix alborzica* به عنوان یک سویه بالقوه در تولید نانوذرات نقره، خواص و کارایی منحصر به فردی برای استفاده در بیوتکنولوژی میکروبی خواهد داشت.

واژه‌های کلیدی: اثرات ضد میکروبی، نانوذرات نقره پوشش دار شده، آلجينات، *Dulcicalothrix alborzica*، پاتوژن‌های ماهی

ارجاع: نوروزی بهاره، بیرانوند حسن. مطالعه اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره پوشش دار شده با آلجينات بیوسنتز شده توسط *Dulcicalothrix alborzica*. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی بزد ۱۴۰۳؛ ۳۲: ۴۰-۸۱۱۸.

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۹۱۳۷۱۰۹۵۶، پست الکترونیکی: bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir، صندوق پستی: ۱۴۷۷۸۹۳۸۵۵

زیادی از نقاط خردۀ فروشی قرار دارند و فراوانی تجزیه ماهی و عدم قطعیت فروش آن‌ها در بازار وجود دارد. هنگامی که ماهی به مقدار زیاد، بیشتر از نیاز بازار برداشت می‌شود، نگهداری و فرآوری آن‌ها برای کاربردهای آینده آن‌ها ضروری می‌شود. بنابراین نگهداری و فرآوری اجزای آبزیان ضروری هستند. این روش‌ها با این هدف انجام می‌شوند که ماهی‌ها برای مدت طولانی‌تر، با حداقل از دست دادن ویژگی‌های کیفی ضروری، ارزش غذایی و قابلیت هضم گوشت آن‌ها تازه و ایمن باقی‌مانند. برای جلوگیری از فاسد شدن ماهی و افزایش ماندگاری غذاهای دریابی، تکنیک‌های نگهداری زیادی مورد نیاز است. این تکنیک‌ها برای مهار رشد، تکثیر باکتری‌های فاسد و تغییرات متابولیکی که منجر به از دست دادن کیفیت ماهی می‌شود، طراحی شده‌اند^(۴). در صنایع آبزیپروری و غذاهای دریابی، فناوری نانو پتانسیل گستردگی برای کاربرد دارد. از جمله، فناوری می‌تواند به طور موثر از بیماری‌ها و عوامل برخی از کاربردهای نانوتکنولوژی برای سلامت ماهی، سطوح ضد باکتری یا ضد قارچی هستند که با استفاده از نانوساختارهای متخلخل و نانوحس‌گرها در سیستم‌های آبزیپروری برای تشخیص عوامل بیماری‌زا در آب و تأمین محصولات نانو دامپزشکی و داروهای ماهی از طریق غذاهای ماهی توسعه یافته‌اند^(۵). کنترل ویروس، باکتری و قارچ مستلزم تشخیص زودهنگام است و از بین بردن پاتوژن‌ها می‌تواند از طریق نانومواد امکان‌پذیر باشد، زیرا آن‌ها در مقیاسی مشابه ویروس یا بیماری آلوده کننده ذرات عمل می‌کنند^(۶). با این حال، نگرانی‌های مرتبط با اینمی نانو هنوز وجود دارد و باید قبل از اجرای کامل آن‌ها برطرف شود. اثرات سمی نانوذرات به عوامل مختلفی از جمله تعامل پیچیده بین گرفتن در معرض، ماهیت نانوذرات، ترکیب محیط، مسیر تزریق ذرات و سیستم اینمی گونه‌های هدف بستگی دارد. بنابراین، جالب است که بررسی کنیم که چگونه با کمک تکنولوژی نانو می‌تواند بر مشکلات فساد آبزیان غلبه کرد^(۷). بیوسترنز نانو

مقدمه

رشد، تکامل و سلامت بدن انسان تحت تأثیر غذایی است که می‌خورد در حقیقت رژیم غذایی به عنوان عامل محیطی موثر برای رشد بدن انسان در نظر گرفته می‌شود. صید و پرورش ماهی یکی از مهم‌ترین منابع غذایی در سراسر جهان است و از نظر اقتصادی نیز اهمیت زیادی دارد. با این حال، صنعت آبزیپروری با چالش‌های متعددی از جمله بیماری‌های عفونی ماهی مواجه است که می‌تواند منجر به مرگ و میر گسترده ماهی‌ها و خسارات اقتصادی قابل توجهی شود. بیماری‌های عفونی ماهی را می‌توان به سه دسته کلی باکتریایی (استرپتوكوکوس، آئروموناس هیدروفیلا، سودوموناس و ویبریو) که شایع‌ترین آن‌ها هستند، قارچی و انگلی تقسیم‌بندی کرد^(۱). کنترل سنتی بیماری‌های ماهی عمده‌اً به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها متکی است. با این حال، نگرانی‌های فزاینده‌ای در مورد مقاومت ضد میکروبی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و اثرات مخرب زیست‌محیطی آن‌ها وجود دارد. در مقابل، نانوذرات نقره سنتر شده با سیانوباکتری‌ها جایگزینی امیدوارکننده و سازگار با محیط زیست برای آنتی‌بیوتیک‌ها ارائه می‌دهند. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که نانوذرات نقره سنتر شده با سیانوباکتری‌ها فعالیت ضد باکتریایی قوی در برابر طیف گسترده‌ای از پاتوژن‌های ماهی، از جمله باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند. به عنوان مثال، Ameen و همکاران گزارش Spirulina platensis که نانوذرات نقره سنتر شده با فعالیت ضد باکتریایی قوی در برابر Aeromonas parahaemolyticus و Vibrio hydrophila نشان دادند^(۲) علاوه بر این، Younis و همکاران نشان دادند که نانوذرات نقره سنتر شده با Phormidium cyanobacterium علاوه بر فعالیت ضد میکروبی، خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی نیز نشان دادند که می‌تواند به طور بالقوه به بهبود سلامت ماهیان آسیب‌دیده از بیماری‌های عفونی کمک کند^(۳). حفظ ماهی یک جنبه فرآوری بسیار مهم در شیلات است. به طور معمول، مزارع پرورش ماهی یا سایر سایت‌های صید ماهی در فواصل

توسط یک سورفیکانت یا پلیمر پوشش داده می‌شوند. پوشش دار کردن نانو ذرات با گروه‌های آمینه، سیلیس، سورفکتانت‌های پلیمری یا ترکیبات آلی دیگر معمولاً به منظور دستیابی به خواص فیزیکی و شیمیایی بهتر ارائه شده است. علاوه بر این بسیاری از گروه‌های عاملی پلیمرهای سطحی می‌توانند برای افزایش کاربرد به منظور دستیابی به ویژگی‌های مختلف مورد استفاده قرار بگیرند (۱۱).

نانو ذرات نقره به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود، از جمله سطح ویژه بالا و پایداری، و فعالیت ضد میکروبی قوی، به عنوان مواد ضد میکروبی در حوزه‌های مختلف، از جمله صنایع آبزی‌پروری، مورد توجه قرار گرفته‌اند. پوشش دارسازی نانوذرات نقره مزایای متعددی از جمله بهبود پایداری، کاهش سمیت و افزایش زیست سازگاری نانوذرات را به همراه دارد. نانو ذرات نقره در مقابل بسیاری از پاتوژن‌ها فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی داشتند (۱۲). برای پوشش دار سازی نانوذرات، از طیف وسیعی از نانوکامپوزیت‌ها و پلی‌ساقاریدها استفاده می‌شود. انتخاب ماده پوشش‌دهی به عوامل مختلفی از جمله خواص مورد نظر نانوذره، کاربرد نهایی و روش‌های تولید بستگی دارد. علاوه بر کاربرد در بسیاری از روش‌های زیستی، آلجينات و نانوکامپوزیت‌های حاصل از آن به دلیل اثرات ضد میکروبی، دارای کاربردهای پزشکی قابل توجهی در مقابل بسیاری از میکروارگانیسم‌ها هستند. پوشش دار سازی نانوذرات با آلجينات، مسمومیت بسیار کمتری در مقایسه با سایر پلی‌ساقاریدهای طبیعی دیگر دارد و کاربردهای بسیار وسیعی در زیست پزشکی دارد (۱۳). عصاره سیانوباکتری‌ها حاوی ترکیبات فعال زیستی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، پلی‌ساقاریدها، روغن‌ها، ویتامین‌ها، ترپن‌ها، استرها، پلی‌فنل‌ها، کاروتئین‌ها دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی هستند که در توسعه داروهای جدید ضروری هستند. در این مطالعه، اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره پوشش دار شده با آلجينات بیوسنتز شده توسط سویه *Dulcicalothrix alborzica* که به عنوان گونه جدید اولین بار توسط نوروزی و شالگین در سال ۲۰۲۱ از

ذرات از روش‌های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی و همچنین از طریق مسیرهای درون سلولی و خارج سلولی توسط انواعی از میکروارگانیسم‌ها انجام می‌شود. در حال حاضر، بیشتر روش‌های سنتز شیمیایی نانو ذرات به استفاده از مواد احیا کننده سمی مثل بوروهیدرید سدیم و حلال‌های آلی مضر متکی هستند. این مواد شیمیایی خطرات بالقوه بیولوژیکی و محیطی را نشان می‌دهند. بنابراین، امروزه دانشمندان را بر آن داشت تا از رویکردهای شیمیایی سبز، روش‌های زیست سازگار، تمیز، دوستدار محیط زیست و اینم برای سنتز نانو مواد استفاده کنند (۸). بیوسنتز نانوذرات با استفاده از گیاهان به مساحت وسیع و دوره‌های رشد نسبتاً طولانی نیاز دارد که در نهایت امکان‌سنجی فرآیند سنتز را محدود می‌کند. در حال حاضر، در میان رویکردهای شیمی سبز، سیانوباکترها، یکی از بزرگترین، متنوع‌ترین و مهم‌ترین گروه‌های باکتری‌های فوتواتوتروف روی زمین به دلیل سرعت رشد بالا و بهره‌وری زیست توده، توجه ویژه‌ای را برای سنتز نانومواد به خود جلب کرده‌اند (۹). در سال‌های اخیر، نانو ذرات نقره با افزایش تقاضا به دلیل طیف وسیعی از کاربردهای آن در الکترونیک، نانوپزشکی، انرژی، حسگرهای زیستی، کاتالیزور و فعالیت‌های ضد باکتریایی و ضد قارچی در کانون توجه قرار گرفته‌اند (۱۰). هم‌چنین، در مقایسه با روش‌های سنتی، روش‌های سبز امکان ساخت اشکال مختلف نانوذرات را فراهم می‌کنند که با ویژگی‌های منحصر به فرد در شرایط فشار و دمای ملایم متمایز می‌شوند. در بین روش‌های بیولوژیکی، سنتز نانوذرات نقره توسط باکتری‌ها به دلیل پایداری، زیست سازگاری، مقرر به صرفه بودن، غیررسمی بودن آن در حال افزایش است و به راحتی می‌توان از آن برای تولید انبوه استفاده کرد. تعدادی از گونه‌های سیانوباکتری متعلق به راسته Synchococcales و Oscillatoriales Nostocales مطالعات مختلف برای سنتز نانو ذرات نقره استفاده شده‌اند (۹). توسعه سریع نانوتکنولوژی و نانومواد منجر به نیاز به اصلاح سطح نانوذرات برای کاربردهای مختلف شده است. نانو ذرات به دلیل تمایلشان به متراکم شدن بر اساس نیروی واندروالس، نیازمند پایدار شدن در مایع حامل می‌باشند. برای این منظور، نانو ذرات

Cyanobacteria culture collection (Ccc) جمع آوری، در محیط کشت BG-11 کشت داده شد. پس از اطمینان از خلوص و عاری بودن کشت از هرگونه آلودگی، آن‌ها به ارلن‌های کشت در اتاقک رشد منتقل شدند. شرایط کشت شامل شدت نور ۴۰ تا ۶۰ میکرومول فوتون/امتربع/ثانیه و دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود (۱۵).

آبهای روان از کوههای البرز جمع‌آوری و خالص‌سازی شده است، در مقابل پاتوژن‌های ماهی مورد بررسی قرار گرفت (۱۴).

روش بررسی

کشت *Dulcicalothrix alborzica* سیانوباکتری *Dulcicalothrix alborzica* از مجموعه کشت سیانوباکتری‌های دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات



شکل ۱: کشت سیانوباکتری *Dulcicalothrix alborzica*

۴۵۰ نانومتر به عنوان سویه‌های تولیدکننده نانوذرات شناسایی شدند (۱۶).

۲: روش جوشاندن

کشت‌های سیانوباکتر به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت rpm ۲۵۰۰، تا تشکیل بیومس سانتریفیوژ شدند. سپس باقی‌مانده سیانوباکتری‌ها در آون با دمای 60°C خشک شدند. ۱ گرم از زیست توده خشک در ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 100°C جوشانده شدند. پس از سرد شدن مخلوط، مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت جمع‌آوری و در دمای 4°C نگهداری شدند. عصاره‌های فاقد سلول سویه‌های سیانوباکتری برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شدند. برای این منظور، ۲ میلی‌لیتر از عصاره مذکور، درون ۱۰ میلی‌لیتر محلول نقره ۱ میلی‌مolar ریخته و به طور مداوم در دمای 100°C همزده شدند. محلول بی‌رنگ به تدریج به قهقهه‌ای مایل به زرد تبدیل و سپس به آرامی به قهقهه‌ای تبدیل شد (بعد از ۴۵ دقیقه). نانوذرات نقره سنتز شده، به کمک سانتریفیوژ با سرعت rpm ۱۵۰۰۰، ۲۰ دقیقه در دمای 4°C جمع‌آوری

بیوسنتز نانوذرات نقره

۱: روش استفاده از بیومس تر

کشت‌های فاز لگاریتمی سیانوباکتری *Dulcicalothrix alborzica* با سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 20°C جدا شدند و ۳ بار با آب قطره استریل شسته شدند. سپس یک گرم از بیومس وزن مرطوب درون فلاکس‌های ۵۰۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول آبی ۱، ۲ و ۳ میلی‌مolar نیترات نقره، با $\text{pH}=7$ تلقیح شد. در نهایت مخلوط در دمای 25°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. به عنوان شاهد از محیط کشت تازه BG11 با افزودن نیترات نقره استفاده شد. شرایط تاریکی با بسته‌بندی فلاسک‌ها به کمک فویل آلومینیومی فراهم شد (۱۶).

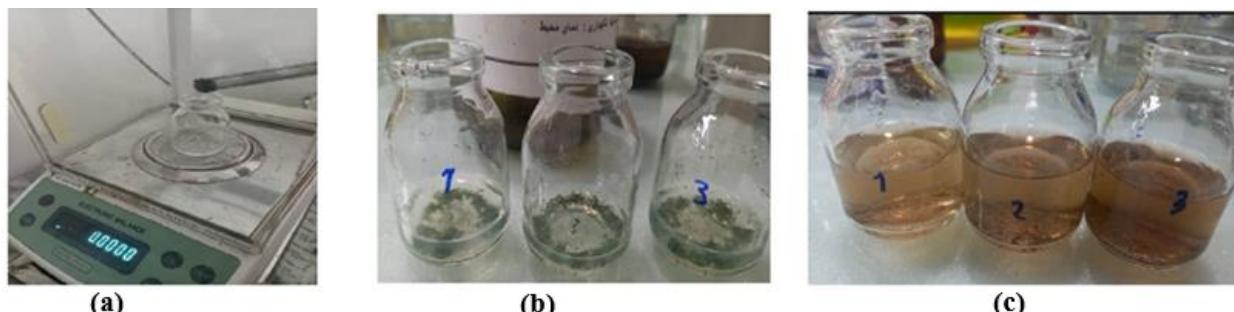
طیفسنجی نانوذرات نقره سنتز شده به روش بیومس تر: نمونه‌برداری از هر محلول در دوره‌های زمانی مختلف (۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) انجام گرفت. نمونه‌های ۱ میلی‌لیتری هر ۱۲ ساعت، به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و جذب طیف UV-vis با وضوح ۱ نانومتر بین ۳۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر گرفته شد. سویه‌هایی که پیک بین ۴۰۰ تا

پلیساکاریدهای خارج سلولی استفاده شد. مساوی با حجم سوپرناتانت، اتانول ۹۵٪ به آن اضافه گردید و یکشبانه روز درون فریزر (۲۰°C) قرار داده شد. پس از سپری شدن ۲۴ ساعت، پلیساکاریدها رسوب کرده و به کمک سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm جداسازی شدند. رسوب به دست آمده به کمک خشک انجامدادی، خشک و وزن کل آن محاسبه شد. در نهایت، ۱/۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر پلیساکارید خشک شده، در ۱ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره ۱ میلی‌مولار با $\text{pH} = 7$ تلقیح شد و در دو لوله آزمایش تقسیم شدند. محلول به دست آمده در دمای 25°C و نور فلورسنت قرار گرفت. سپس طیفسنجی در هر ۱۲ ساعت انجام شد.

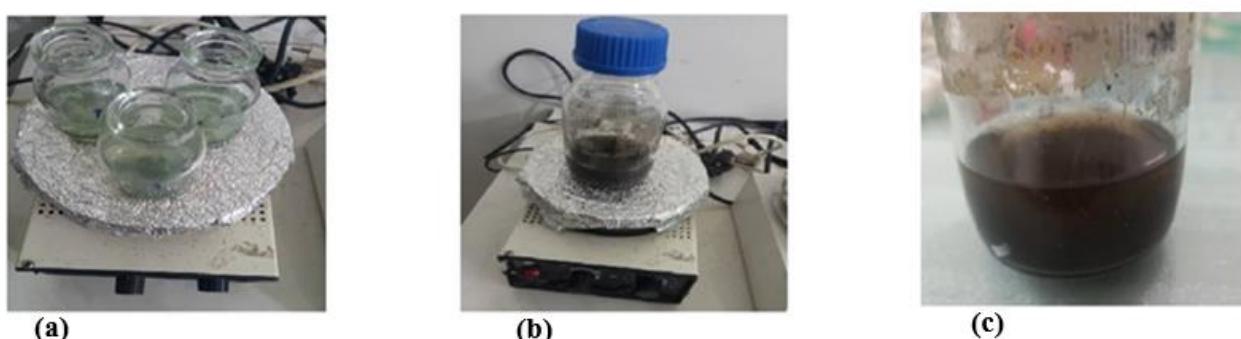
شدند. پلت به دست آمده با آب قطره چندین بار شسته شد و از اتانول ۹۰٪ برای حذف ناخالصی‌ها و تهیه نانوذره نقره خالص استفاده شد (۱۷).

طیفسنجی نانوذرات نقره سنتز شده: برای طیفسنجی، ۱ میلی‌گرم نانوذره در ۴ میلی‌لیتر آب قطره حل شد. طیفسنجی در طول موج ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر با استفاده از طیفسنجی UV-vis تعیین شد. از آب قطره به عنوان نمونه شاهد استفاده گردید (۱۶).

۳: سنتز نانوذرات نقره با استفاده از پلیساکاریدهای خارج سلولی زیست توده در فاز لگاریتمی، به کمک سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm جداسازی شد و از سوپرناتانت برای جداسازی



شکل ۲: سنتز نانوذرات نقره با استفاده از روش جوشاندن (a) وزن کردن عصاره سیانوپاکتری. (b) محلول بی رنگ نقره ۱ میلی‌مولار قبل از اضافه کردن عصاره. (c) تغییر رنگ محلول از بی رنگ به قهوه‌ای مایل به زرد و سپس قهوه‌ای، نشان دهنده تولید نانوذرات نقره.



شکل ۳: سنتز نانوذرات نقره با استفاده از پلیساکاریدهای خارج سلولی (a) محلول پلیساکارید شفاف (b) محلول پلیساکارید بعد از اضافه کردن محلول نیترات نقره (قهوه‌ای رنگ به دلیل تشکیل نانوذرات نقره) (c) محلول حاوی نانوذرات نقره سنتز شده (قهوه‌ای رنگ)

دستگاه زتا سایزر در دمای 25°C تعیین شد. اندازه گیری مستقیماً در سلول زتا یکبار مصرف شفاف انجام شد (۲۱).

بررسی فعالیت آنتی باکتریال نانوذرات نقره پوشش دار و فاقد پوشش

۱: معرفی و کشت پاتوژن‌های مورد بررسی: ایزوله‌های باکتریایی پاتوژنی ماهی مرتبط با *Pseudomonas*, *Escherichia coli* و *Edwardsiella*, *Yersinia* هستند که حساسیت این باکتری‌ها در برابر نانوذرات تهیه شده سنجیده شد. تمامی سویه‌های مورد بررسی روی محیط کشت آگار مولر هیلتون کشت شدند و به مدت ۵ روز در دمای 22°C گرمخانه گذاری شدند (۱۸).

۲: آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC): از روش کدورت سنجی با غلظت‌های مختلف نانوذره پوشش دار شده برای ارزیابی میزان حداقل غلظت مهارکنندگی برای هر سویه باکتری استفاده گردید. در ابتدا یک لوله آزمایش شامل ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون ($1\text{ ml}\text{ g}\text{m}$ بر میلی‌لیتر) در محیط کشت مایع MH آماده گردید، سپس جهت رقت‌سازی در هر لوله آزمایش $6\text{ ml}\text{ l}\text{i}\text{t}\text{r}$ محیط MH آماده و سوسپانسیون باکتری‌ها در غلظت نهایی $CFU/ml = 1 \times 10^5$ به هر لوله اضافه شد. غلظت‌های مشابه از نانوذرات پوشش دار شده به عنوان کنترل استفاده شد. کمترین غلظتی که از رشد هر سویه باکتری جلوگیری کرد به عنوان MIC در نظر گرفته و گزارش شد (۲۲).

۳: آزمون حداقل غلظت کشنندگی (MBC): ابتدا $100\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر از هر مخلوط نانوذره پوشش دار شده به همراه باکتری‌های پاتوژن که رشد قابل مشاهده‌ای را در طول تست MIC نشان ندادند، انتخاب و روی پلیت‌های آگار بصورت خطی کشت داده شدند و درون انکوباتور گرمخانه گذاری شدند. عدم وجود کلنجی در صفحات نشان دهنده فقدان باکتری‌های زنده و اثر باکتری کشی نانوذرات در آن غلظت بود. از سوی دیگر، رشد کلنجی بر روی صفحات نشان دهنده وجود باکتری‌های زنده و اثر باکتریو استاتیک نانوذره در آن غلظت بود (۲۲).

پایدارسازی و پوشش دار کردن نانوذره تولید شده: نانوذرات نقره با استفاده از روش احیای شیمیایی نیترات نقره با سدیم بوراید هیدرید در ماتریکس سدیم آلجينات 4% وزنی/حجمی پایدار شدند. 100 ml/liter محلول آبی سدیم آلجينات با 1 ml/liter نانوذرات نقره سنتر شده به مدت 60 دقیقه با سرعت 200 دور در دقیقه با استفاده از همزن معناطیسی مخلوط شد. سپس، 1 ml/liter محلول آبی 60 ml/liter سدیم بوراید هیدرید به صورت قطره قطره در عرض 10 دقیقه به مخلوط اضافه شد و به مدت 2 ساعت هم زدن ادامه یافت. دمای واکنش در طول فرآیند در 25 درجه سانتی‌گراد حفظ شد. تغییر رنگ محلول از قهوه‌ای کمرنگ به قهوه‌ای پرنگ با طیف‌های مایل به سبز نشان‌دهنده پوشش دهی نانوذرات نقره با آلژینات بود. در نهایت، محلول کلئیدی حاصل در دمای 4 درجه سانتی‌گراد برای جلوگیری از تخریب زیستی نگهداری شد (۱۸).

مشخصه یابی نانوذرات سنتر شده

۱: آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): تجزیه و تحلیل TEM با استفاده از $3\text{ }\mu\text{m}$ میکرولیتر از محلول نمونه قرار داده شده بر روی شبکه‌های مسی با پوشش کربن انجام شد. یک لایه نازک از نمونه روی شبکه ساخته شد و نمونه های اضافی با استفاده از یک مخروط کاغذ لکه‌برداری برداشته شد و به طور متوالی در یک جعبه توری نگهداری شد و تصاویر TEM تهیه شد. ولتاژ 200 KV بود. اندازه میانگین نانوذرات نقره با اندازه گیری حداقل 100 nm تعیین شد (۱۹).

۲: آنالیز تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR): شیمی و تغییرات گروه‌های عاملی متصل به سطح نانوذرات نقره با یک طیف‌سنج FTIR شناسایی شدند. نانوذرات خشک شده با برومید پتابسیم به نسبت $1/100$ مخلوط شدند. نمونه $100\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتری در آنالایزر بازتاب کلی ضعیف قرار داده شد. محلول نانوذرات نقره توسط ATR-FTIR آنالیز شد. طیف پرتوهای IR در طول $4000-4000\text{ cm}^{-1}$ سانتی‌متر، با حالت بازتاب منتشر در 4 cm^{-1} اسکن شد (۲۰).

۳: آزمون پتانسیل زتا: پتانسیل زتا سوسپانسیون‌های آبی نانوذرات نقره بیوسنتر شده با قرار دادن 2 ml/liter از نمونه‌ها در یک کووت پلاستیکی شفاف چهار وجهی در

۱۰ دیسک *Pseudomonas* و *E.coli* میکروگرم برای آزمون با سویه های *Yersinia* و *Edwardsiella* به کار رفته است.

۵: جذب UV-vis: برای تایید ممانعت رشد باکتری ها، تراکم نوری (OD) در محیط مایع لوله های MIC با استفاده از اسپکتروفوتومتری UV-vis در ۶۰۰ نانومتر (در غلظت ۰ تا ۲۰۰ ppm) سنجیده شد. جذب کمتر، رشد کمتر باکتری ها را نشان داد. نمونه شاهد در این آزمایش همان نمونه شاهد آزمایش بود. اثرات آنتی باکتریال هر دز از نانوذرات سنتز شده به صورت درصد ممانعت کنندگی (%) رشد باکتری بر طبق معادله زیر تعیین گزارش شد (۲۴).

$$P(GI\%) = \frac{1 - OD_{sample}}{OD_{control}} \times 100$$

$$\text{Growth Inhibit Percentage (GI\%)} = 1 - \frac{\frac{OD_{sample}}{OD_{blank}}}{100} \times 100$$

۶: بررسی فعالیت ضد قارچی نانوذرات نقره پوشش دار: توانایی فعالیت ضد قارچی نانوذرات پوشش دار شده در ممانعت از رشد دو سویه قارچ از خانواده اوومیستها (*Aphanomyces*) (بررسی شد. برای *Saprolegnia parasitica* و *(invadans)* این منظور، ابتدا *Aphanomyces invadans* روی محیط کشت پپتون گلوکز حاوی آگار برای در دمای ۲۶ °C به مدت ۵ روز و *Saprolegnia parasitica* روی محیط کشت مخمر گلوکز در دمای ۲۱ °C به مدت ۲ گرمخانه گذاری شدند. اثرات ممانعت کنندگی از رشد غلظت های ۱ تا ۱۰ میلی گرم/ میلی لیتر نانوذره پوشش دار شده و فاقد سنجیده شدند. برای این منظور، از پلیت های ۲۴ چاهکی استفاده گردید. ۱ میلی لیتر از محیط کشت ها درون هر چاهک ریخته شد سپس یک تکه کوچک ۱ میلی متری از میسلیوم های در حال رشد از هر قارچ درون هر چاهک قرار داده شد. سپس همه پلیت ها گرمخانه گذاری شدند. کمترین غلظت که سبب مهار ۹۰٪ رشد میسلیوم ها شد، برای هر سویه قارچی به عنوان MIC در نظر گرفته و گزارش شد (۲۵).

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیزهای آماری داده های حاصل از هر آزمایش با نرم افزار SPSS version 16 انجام شد. تمام داده ها حاصل از نتایج سه

۴: ارزیابی حساسیت پاتوزن های منتخب به نانوذرات نقره: مقایسه نانوذرات پوشش دار و بدون پوشش با روش انتشار دیسک: ارزیابی ویژگی های ضد میکروبی با روش انتشار دیسک بر طبق روش نوروزی و همکاران انجام گرفت (۲۳). این روش بر دیدن هاله بدون رشد در پیرامون دیسک های دارای خاصیت ضد میکروبی استوار است. در این پژوهش سویه های *Yersinia*, *Pseudomonas* و *Escherichia coli* و *Edwardsiella* سنجش شدند. سویه های خالص میکروبی به گونه لیوفیلیز شده، بسترهای کشت آماده مولر هینتون آگار، TSB و همچنین محلول استاندارد نیم مک فارلند از شرکت زیست رویش خردباری شدند. دیسک های آنتی بیوتیک و دیسک های خام نیز از شرکت پادتن طب فراهم شدند. سویه های لیوفیلیزه بر پایه آینین نامه شرکت زیست رویش برای بازیابی شدن در بسترهای کشت مایع TSB نهاده شده و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۵°C ۳۵ جای گرفته است. پس از گذشت ۲۴ ساعت با استفاده از TSB دارای سویه های بازیابی شده بر روی بسترهای کشت های بلا د آگار کشت شده و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۵°C ۳۵ جای گرفته است. تعداد اندکی از کلنی های ناب از پلیت های آگار خوندار برداشت شده و در لوله های تمیز و سترون سرم فیزیولوژیک پراکنده شدند. تیرگی این محلول های دارای باکتری های ناب با استاندارد نیم مک فارلند سنجش و با آن برابر شدند. پس از آماده شدن محلول های باکتریایی با غلظت نیم مک فارلند با سوآپ های استریل از محلول نیم مک فارلند برداشت شده و به گونه کشت چمنی بر روی بسترهای مولر هینتون آگار کشت داده شدند. بر روی هر پلیت مورد آزمون در کنار شعله با استفاده از پنس استریل، ۳ دیسک جایگذاری شد. یک دیسک آنتی بیوتیک به عنوان شاهد مثبت، یک دیسک آغشته شده به نانوذره و یک دیسک برای کنترل منفی و بدون نانوذره بود. برای ارزیابی نانوذرات سنتز شده از دیسک دارای عصاره بدون نانوذرات نقره برای کنترل منفی بهره گیری شد. دیسک های سیپروفلوكسازین ۵ میکروگرم برای آزمون با سویه های

سلولی) نشان داده شده است. با بررسی طیفها مشخص شد، هر سه طیف بریکدیگر منطبق هستند که نشان دهنده تساوی در میزان تخلیص آن‌ها و تولید ترکیبات مشابه است. تفاوت اندکی در شدت پیک وجود دارد که به دلیل تفاوت در تعداد گروههای عاملی و اتم‌های تشکیل دهنده هر طیف است.

نتایج آزمون پتانسیل زتا: نتایج دیاگرام پتانسیل زتا نانو ذرات تولید شده (شکل ۶) نشان داد پتانسیل زتا نانوذرات تولید شده به روش بیومس تر (شکل ۶ a) برابر $24/7 \text{ mV}$ بود و ذرات تحرک الکتروفورتیک برابر با cm^2/Vs $0/000\ 192$ داشتند. بررسی اندازه ذرات به دست آمده (شکل ۶ b)، میانگین اندازه ذرات نانو نقره nm $75/7 \pm 0/0$ $115/4$ به دست آمد. پتانسیل زتا نانو ذرات تولید شده به روش جوشاندن (شکل ۶ c) برابر $27/5 \text{ mV}$ بود و ذرات تحرک الکتروفورتیک برابر با cm^2/Vs $0/000\ 199$ داشتند. بررسی اندازه ذرات به دست آمده (شکل ۶ d)، میانگین اندازه ذرات نانو نقره nm $687/0 \pm 0/6$ $160/0$ به دست آمد. پتانسیل زتا نانو ذرات تولید شده با کمک پلی‌ساقاریدهای خارج سلولی (شکل ۶ e) برابر $22/5 \text{ mV}$ بود و ذرات تحرک الکتروفورتیک برابر با cm^2/Vs $0/000\ 175$ داشتند. بررسی اندازه ذرات به دست آمده (شکل ۶ f)، میانگین اندازه ذرات نانو نقره nm $612/0 \pm 0/6$ $238/9$ به دست آمد.

تفاوت معنی دار بین عوامل اندازه گیری شده با آنالیز واریانس یک طرفه با حدود اطمینان ۹۵٪ و مقایسه میانگین ها با آزمون توکی انجام گردید و نتایج مربوط به مقایسه ها به صورت نمودار با نرم افزار Excel رسم شد.

نتائج

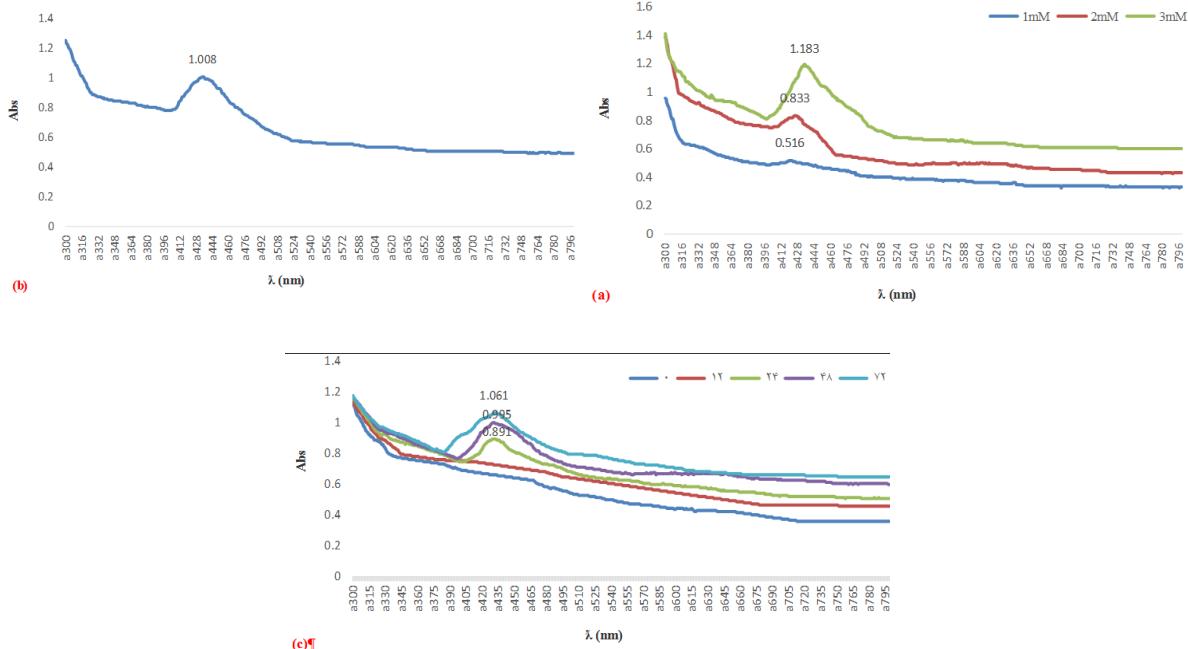
نتایج طیف‌سنجی نانو ذرات تولید شده به سه روش مختلف: بررسی طیف‌سنجی نانو ذرات تهیه شده به روش بیومس در سه غلظت مختلف نیترات نقره (۱، ۲ و ۳ mM) در شکل ۴ (a) نشان داده شده است. به ترتیب λ_{max} نانو ذرات نقره در طول موج nm ۴۲۵، ۴۳۴ و ۴۲۰ مشاهده شد. طی بررسی طیف‌سنجی (λ_{max}) نانو ذرات تهیه شده به روش جوشاندن (شکل ۴ b) در طول موج nm ۴۲۸ مشاهده شد. بررسی طیف سنجی (λ_{max}) نانوذرات تهیه شده به کمک پلی‌ساکارید عصاره (شکل ۴ c) در زمان‌های ۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب λ_{max} نانو ذرات نقره در طول موج nm ۴۳۳، ۴۳۳، ۴۳۳ و ۱۲ ساعت پیک نمودار λ_{max} مشاهده نشد.

نتایج آزمون FTIR: نتایج طیف‌سنجی FTIR نانو ذرات نقره سنتز شده به سه روش مختلف در شکل ۵ (به ترتیب (a) طیف‌سنجی نانو ذرات تولید شده به روش بیومس تر، (b) به روش جوشاندن، (c) با استفاده از پلی‌ساکاریدهای خارج

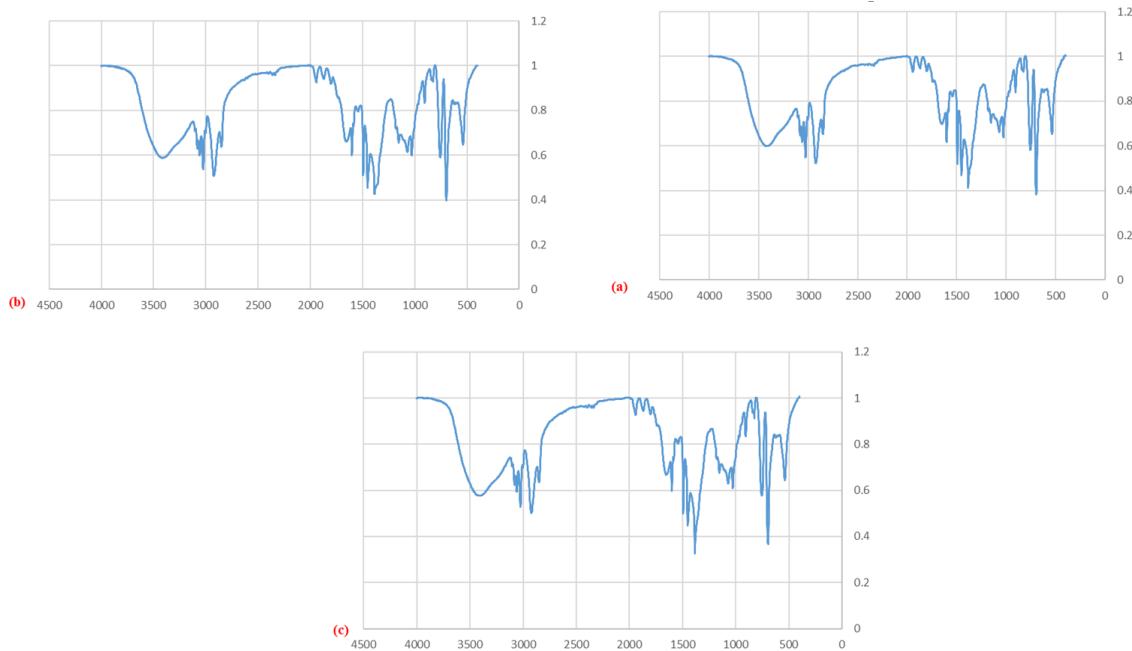
جدول ۱: پیک های متناظر با گروه های عاملی تغییر در گروه های عاملی نانوذرات تولید شده به روش های مختلف

پیکهای متناظر با گروه‌های عاملی	بیومس تر	روش جوشاندن	با استفاده از پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی	
پیوندهای آلکینی	۳۰۲۸/۰۴۷	۳۰۲۸/۰۴۷	۳۰۲۸/۰۴۷	عدم تغییر
پیوندهای OH	۲۸۴۸/۶۷۹	۲۸۴۸/۶۷۹	۲۸۴۸/۶۷۹	عدم تغییر
پیوند ارتعاشی O-H	۳۰۶۲/۷۶۴	۳۰۴۵/۴۰۶	۳۰۶۰/۸۳۵	تغییر دارد
پیوند N-H	۱۵۹۸/۸۸۶	۱۵۹۸/۸۸۶	۱۵۹۸/۸۸۶	عدم تغییر
آمید، I، II و III	۱۴۹۲/۸۰۸	۱۴۹۲/۸۰۸	۱۴۹۲/۸۰۸	عدم تغییر
پیوند ارتعاشی آمین آروماتیک	۱۳۸۴/۸۰۱	۱۳۸۴/۸۰۱	۱۳۸۴/۸۰۱	عدم تغییر
پیوند ارتعاشی C-N	۱۰۲۲/۲۰۷	۱۰۲۷/۹۹۲	۱۱۵۳/۳۵۸	تغییر دارد
پیوند C-C	۷۸۱/۱۲۰۵	۷۸۱/۱۲۰۵	۷۸۱/۱۲۰۵	عدم تغییر
پیوند C-O	۷۵۶/۰۴۷۵	۷۵۶/۰۴۷۵	۷۵۶/۰۴۷۵	عدم تغییر
پیوند الکل اولیه C-O	۵۳۸/۱۰۵۲	۵۳۸/۱۰۵۲	۵۳۸/۱۰۵۲	عدم تغییر
پیوند ارتعاشات کششی C-O	۶۹۶/۲۵۸	۶۹۶/۲۵۸	۶۹۶/۲۵۸	عدم تغییر

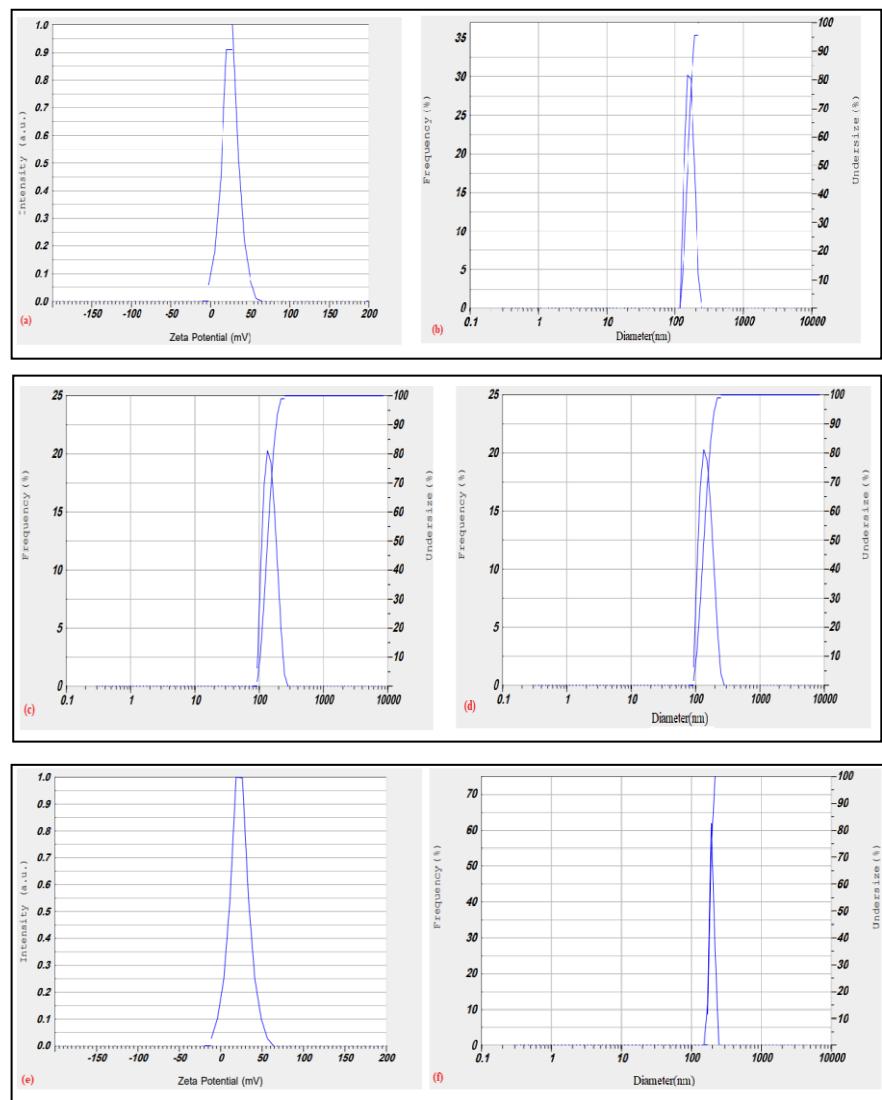
مطالعه اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره پوشش دار شده با آلجینات بیوسنتز شده توسط Dulcicalothrix alborzica



شکل ۴: نتایج طیفسنجی UV.Vis نانوذرات نقره سنتز شده به سه روش مختلف (a) طیف سنجی نانوذرات تولید شده به روش بیومس تر، (b) به روش جوشاندن، (c) با استفاده از پلیساکاریدهای خارج سلولی



شکل ۵: نتایج طیفسنجی FTIR نانوذرات نقره سنتز شده به سه روش مختلف (a) طیفسنجی نانوذرات تولید شده به روش بیومس تر، (b) به روش جوشاندن، (c) با استفاده از پلیساکاریدهای خارج سلولی



شکل ۶: نتایج دیاگرام پتانسیل زتا نانوذرات نقره سنتز شده به سه روش مختلف (a-b) طیف سنجی نانوذرات تولید شده به روش بیومس تر، (c-d) به روش جوشاندن، (e-f) با استفاده از پلی‌ساقاریدهای خارج سلولی

نتایج آزمون TEM: میکروگراف نانوذرات نقره سنتز شده به روش جوشاندن در شکل ۸ نشان داده شده است. استفاده از این تکنیک کروی بودن نانوذرات سنتز شده را تأیید کرد. نتایج نشان دهنده این بود که نانوذرات حالت آگلومره داشتند.

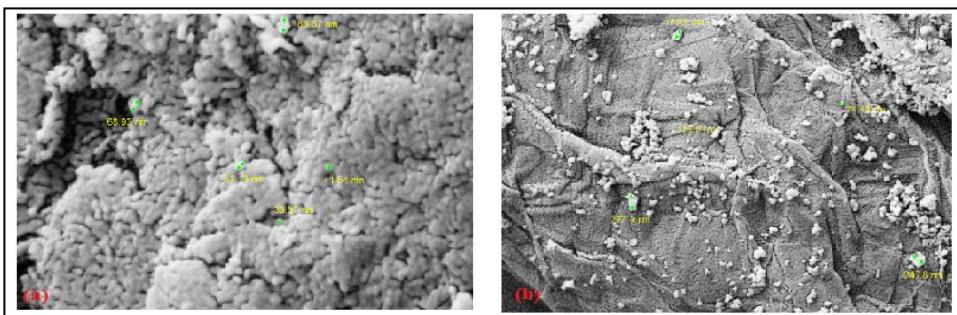
نتایج آزمون میکرووی

بررسی قطر عدم هاله رشد نانوذرات تهیه شده بر روی باکتری‌های پاتوژن ماهی مورد بررسی: بررسی میزان قطر عدم هاله رشد نانوذرات تهیه شده با روش بیومس تر در سه غلظت مختلف نیترات نقره (۱، ۲ و ۳ mM)، جوشاندن و با استفاده از

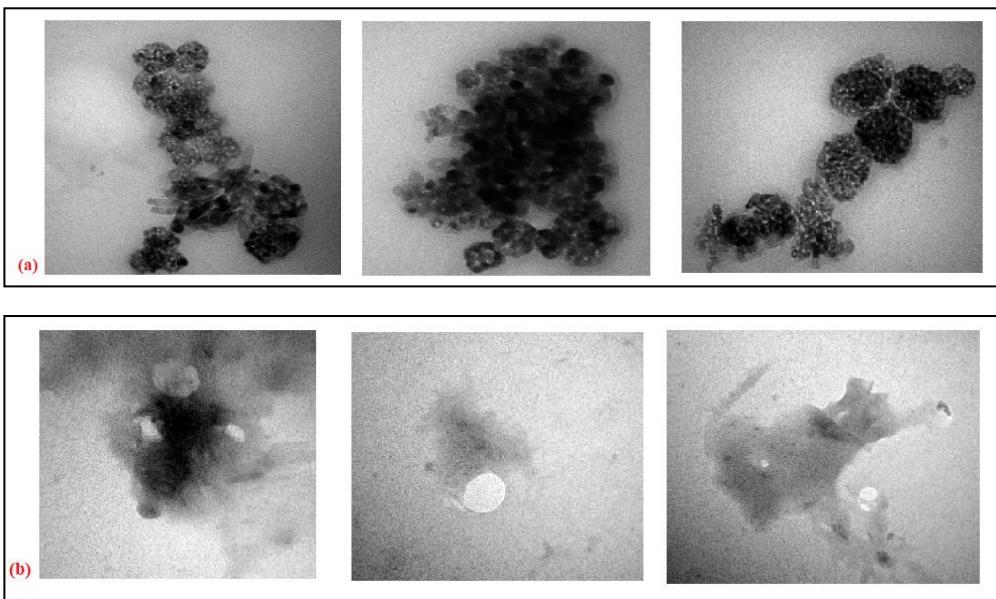
نتایج آزمون SEM: نتایج عکس SEM نانوذرات بدون پوشش و پوشش دهی شده با آلجينات بیوسنتز شده به روش جوشاندن در شکل ۷ نشان داده شده است. در (شکل ۷ a) مورفولوژی نانوذرات سنتز شده بدون پوشش نشان داده شده است. نتایج نشان داد نانوذرات سنتز شده به صورت کروی بوده و اندازه ذراتی $33/57 \text{ nm}$ تا $80/67 \text{ nm}$ داشتند. بررسی مورفولوژی نانوذرات پوشش داده شده با آلجينات (شکل ۷ b) نیز نشان داد نانوذرات نقره -آلژینات عمدهاً یک شکل نامنظم کروی و با تغییرات اندازه بین $74/43$ تا $277/9$ داشتند.

دنبال آن در غلظت ۲ mM و ۱ mM مشاهده شد. (P<0.05). برای باکتری *Edwardsiella* بیشترین میزان مهار بازدارنگی توسط نانوذرات تهیه شده به روش بیومس تر در غلظت ۳ mM و به دنبال آن در غلظت ۲ mM مشاهده شد (P<0.05). در سایر روش‌های سنتز نانو ذرات تأثیر معناداری گزارش نشد (*Pseudomonas aeruginosa*) (P>0.05). بر روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* مطابق با نتایج روش‌های مختلف سنتز نانو ذرات تأثیر معناداری بر قطر عدم هاله رشد نداشت (P>0.05). تمامی نانوذرات به یک میزان حساسیت رشد نشان دادند.

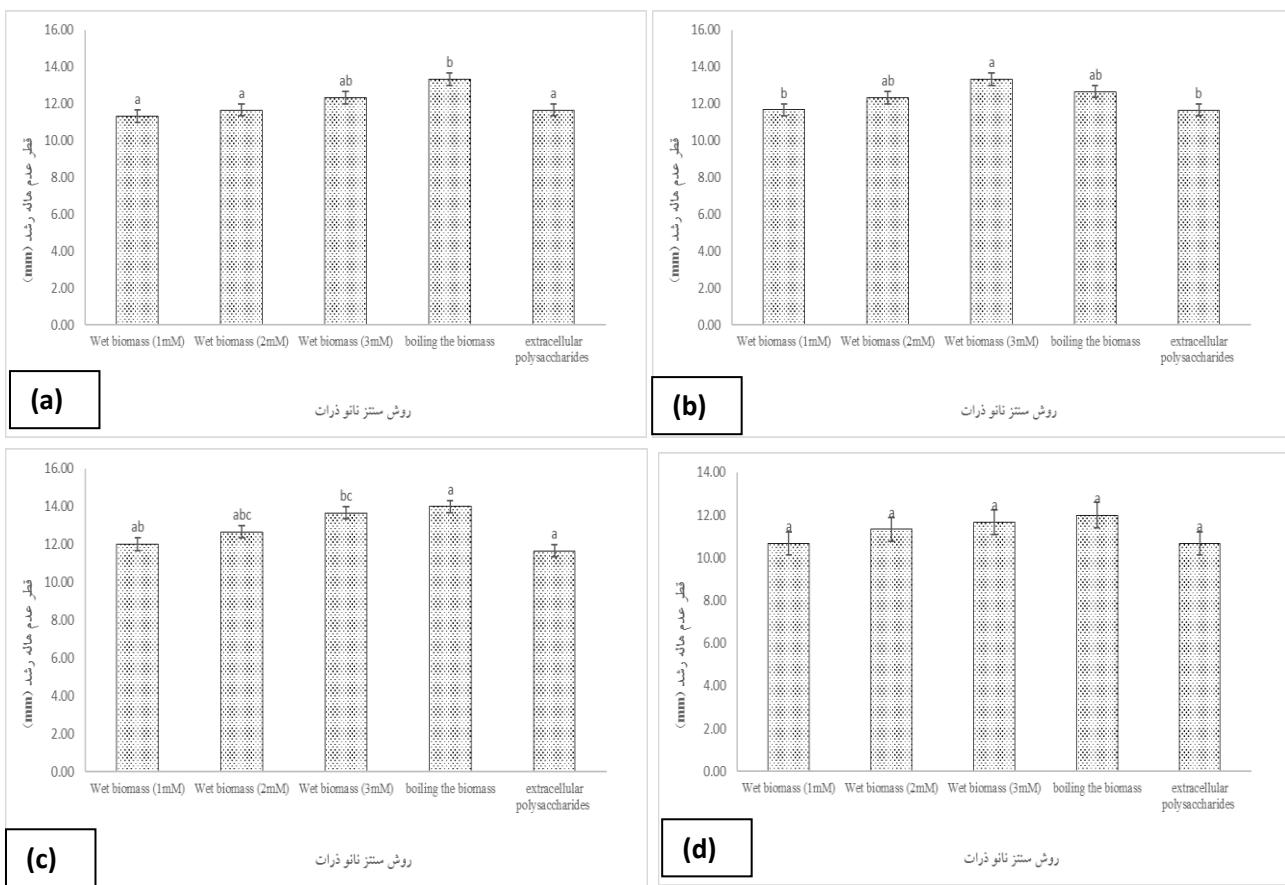
پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی در جدول ۲ بر روی باکتری‌های *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* و *Edwardsiella* مطابق با نتایج روش‌های مختلف سنتز نانو ذرات مورد بررسی (P<0.05) بود. قطر عدم هاله رشد تأثیر معنی‌داری داشت (P<0.05). بیشترین میزان مهار بازدارنگی توسط نانو ذرات تهیه شده به روش جوشاندن برای باکتری‌های *Yersinia enterocolitica* و *Escherichia coli* بود سپس بیشترین مهارکنندگی در نانوذرات تهیه شده به روش بیومس تر در غلظت ۳ mM و به



شکل ۷: عکس‌های SEM نانوذرات (a) بدون پوشش (b) پوشش دار شده با آلجينات



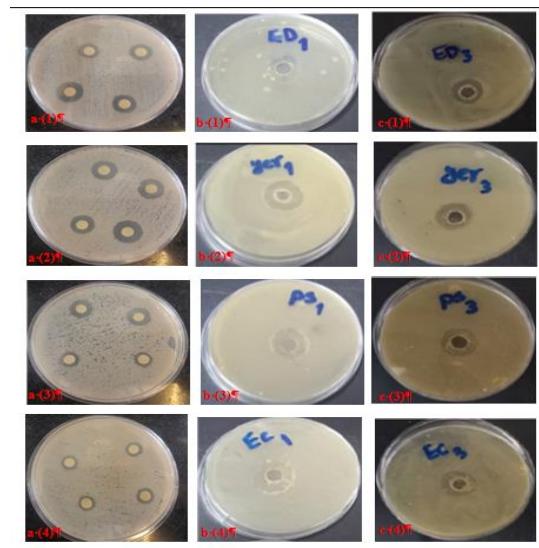
شکل ۸: میکروگراف الکترون عبوری (TEM) نانوذرات (a) بدون پوشش (b) پوشش دار شده با آلجينات

(b) *Escherichia coli* (a) *Yersinia enterocolitica* (c) *Edwardsiella*(d) *Pseudomonas aeruginosa*

جدول ۲ : میانگین نتایج قطر عدم رشد نانو ذرات تهیه شده (mm) بر روی پاتوژن های ماهی

روش های تهیه نانو ذرات	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	قطر عدم رشد (mm) باکتری
روش بیومس تر (1 Mm)	12/00 ± 0/00 ^{ab}	11/33 ± 0/58 ^a	11/67 ± 0/58 ^b	10/67 ± 0/33 ^a	11/33 ± 0/58 ^a
روش بیومس تر (2 Mm)	12/00 ± 0/00 ^{ab}	11/67 ± 0/58 ^a	12/33 ± 0/58 ^{ab}	11/33 ± 0/33 ^a	12/00 ± 0/00 ^{ab}
روش بیومس تر (3 Mm)	12/00 ± 0/00 ^{ab}	12/33 ± 0/58 ^a	13/33 ± 0/58 ^a	11/67 ± 0/33 ^a	12/00 ± 0/00 ^{ab}
روش جوشاندن	14/00 ± 1/00 ^a	13/33 ± 0/58 ^b	12/67 ± 0/58 ^{ab}	12/00 ± 0/00 ^a	11/67 ± 0/58 ^a
با استفاده از پلیساکارید خارج سلولی	11/67 ± 0/58 ^a	11/67 ± 0/58 ^b	11/67 ± 0/58 ^c	10/67 ± 0/33 ^a	11/67 ± 0/58 ^a

* حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵ است.



شکل: ۱۰: هاله عدم رشد باکتری در برابر نانوذرات نقره سنتز شده به سه روش مختلف a بیومس تر b جوشاندن c پلی ساکارید های خارج سلوی، (1) باکتری *Escherichia coli*، (2) باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، (3) باکتری *Yersinia enterocolitica*، (4) باکتری *Edwardsiella*

باکتری های *Yersinia* و *Pseudomonas aeruginosa* نداشتند ($P>0.05$). مطابق با نتایج روش های مختلف سنتز نانوذرات تأثیر معناداری بر MBC تأثیر معنی داری باکتری *Edwardsiella* داشت ($P<0.05$). بیشترین مهار کشندگی توسط نانوذرات سنتز شده با استفاده از پلی ساکارید های خارج سلوی و به دنبال آن نانوذرات سنتز شده به روش بیومس تر با غلظت Mm_1 و Mm_3 گزارش شد ($P<0.05$). کمترین میزان کشندگی توسط نانوذرات سنتز شده به روش جوشاندن و بیومس تر با غلظت Mm_3 گزارش شد ($P<0.05$).

نتایج تأیید ممانعت از رشد باکتری ها (OD): جدول ۵ نتایج تأیید ممانعت از رشد میکرو اگانیسم های مورد مطالعه اندازه گیری شده با UV را نشان می دهد. در طول اندازه گیری های OD، مشخص شد که مرگ باکتری ها ارتباط مستقیمی با غلظت نیترات نقره، پوشش دهنده نانوذرات دارد ($P<0.05$). مطابق با نتایج افزایش غلظت نیترات نقره در سنتز نانوذرات سبب افزایش درصد مهار کشندگی رشد باکتری های مورد بررسی شد ($P<0.05$)

بررسی میزان MIC نانوذرات نقره

بررسی میزان MIC بر روی باکتری های پاتوژن ماهی مورد بررسی: بررسی میزان MIC نانوذرات تهیه شده با روش بیومس تر در سه غلظت مختلف نیترات نقره (۱، ۲ و ۳ mM)، جوشاندن و با استفاده از پلی ساکارید های خارج سلوی در جدول ۳ بر روی *Yersinia*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* و *Edwardsiella enterocolitica* نشان داده شده است. مطابق با نتایج روش های مختلف سنتز نانوذرات تأثیر معناداری بر MIC تأثیر معنی داری باکتری *Yersinia enterocolitica*، *Pseudomonas aeruginosa* (۰.۰۵) *Escherichia coli* و *Edwardsiella* نداشتند ($P>0.05$)

بررسی میزان MBC نانوذرات نقره

بررسی میزان MBC بر روی باکتری های پاتوژن ماهی مورد بررسی: بررسی میزان MBC نانوذرات تهیه شده با روش بیومس تر در سه غلظت مختلف نیترات نقره (۱، ۲ و ۳ mM)، جوشاندن و با استفاده از پلی ساکارید های خارج سلوی در جدول ۴ بر روی *Yersinia*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* و *Edwardsiella enterocolitica* نشان داده شده است. مطابق با نتایج روش های مختلف سنتز نانوذرات تأثیر معناداری بر MBC تأثیر معنی داری

(P<0.05). پوشش دار کردن نانوذرات با آجینات نیز به طور قابل توجه‌ای خاصیت ضد قارچی را افزایش داد (P<0.05). در مقایسه روش‌های مختلف تهیه نانوذرات، نانوذرات نقره سنتز شده به روش جوشاندن و به دنبال آن نانوذرات سنتز شده با روش بیومس تر در غلظت ۳ mM بالاترین خاصیت ضد قارچی را نشان دادند (P<0.05). کمترین میزان فعالیت ضد قارچی در نانوذرات سنتز شده به روش بیومس تر در غلظت ۱ mM گزارش شد (P<0.05).

نتایج خاصیت ضد قارچی نانوذرات سنتز شده (قطر عدم هاله رشد)

نتایج خاصیت ضد قارچی بر روی قارچ‌های *Saprolegnia* و *Aphanomyces*: جدول ۶ بررسی نتایج خاصیت ضد قارچی نانوذرات سنتز شده به روش‌های مختلف را روی قارچ‌های *Saprolegnia* و *Aphanomyces* را نشان می‌دهد. مطابق نتایج روش‌های مختلف سنتز تأثیر معنادار بر خاصیت ضد قارچی داشت (P<0.05). نانوذرات سنتز شده در غلظت بالاتر نیترات نقره خاصیت ضد قارچی بالاتری داشتند

جدول ۳: میانگین نتایج MIC نانوذرات تهیه شده (بر حسب mg/ml) بر روی پاتوژن‌های ماهی

MIC (mg/ml) <i>Escherichia coli</i>	MIC (mg/ml) <i>Edwardsiella</i>	MIC (mg/ml) <i>Yersinia enterocolitica</i>	MIC (mg/ml) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	روش‌های تهیه نانوذرات
۶/۶۷ ± ۱/۶۷ ^a	۱۳/۳۳ ± ۳/۳۳ ^a	۶/۶۷ ± ۱/۶۷ ^a	۱۶/۶۷ ± ۲/۳۳ ^a	روش بیومس تر (۱ Mm)
۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^a	۱۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^a	۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^a	۱۳/۳۳ ± ۲/۳۳ ^a	روش بیومس تر (۲ Mm)
۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^a	۸/۳۳ ± ۱/۶۷ ^a	۴/۱۷ ± ۰/۸۳ ^a	۱۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^a	روش بیومس تر (۳ Mm)
۴/۱۷ ± ۰/۸۳ ^a	۶/۶۷ ± ۱/۶۷ ^a	۳/۳۳ ± ۰/۸۳ ^a	۶/۶۷ ± ۱/۶۷ ^a	روش جوشاندن
با استفاده از پلی‌ساکارید خارج سلولی				
۸/۳۳ ± ۱/۶۸ ^a	۱۶/۶۷ ± ۳/۳۳ ^a	۶/۶۷ ± ۱/۶۷ ^a	۱۶/۶۷ ± ۲/۳۳ ^a	

*حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵ است

جدول ۴: میانگین نتایج MBC نانوذرات تهیه شده (بر حسب mg/ml) بر روی پاتوژن‌های ماهی

MBC (mg/ml) <i>Escherichia coli</i>	MIC (mg/ml) <i>Edwardsiella</i>	MBC (mg/ml) <i>Yersinia enterocolitica</i>	MBC (mg/ml) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	روش‌های تهیه نانوذرات
۲/۰۸ ± ۰/۴۲ ^a	۳/۳۳ ± ۰/۸۳ ^{ab}	۰/۸۳ ± ۰/۲۱ ^a	۳/۳۳ ± ۰/۸۳ ^a	روش بیومس تر (۱ Mm)
۱/۶۷ ± ۰/۴۲ ^a	۱/۶۷ ± ۰/۴۲ ^{ab}	۰/۵۲ ± ۰/۱۰ ^a	۲/۰۸ ± ۰/۴۲ ^a	روش بیومس تر (۲ Mm)
۱/۰۴ ± ۰/۲۱ ^a	۱/۲۵ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۳۶ ± ۰/۱۴ ^a	۲/۰۸ ± ۰/۴۲ ^a	روش بیومس تر (۳ Mm)
۰/۸۳ ± ۰/۲۱ ^a	۰/۸۳ ± ۰/۲۱ ^b	۰/۴۲ ± ۰/۱۰ ^a	۱/۰۴ ± ۰/۲۱ ^a	روش جوشاندن
۱/۶۷ ± ۰/۴۲ ^a	۴/۱۷ ± ۰/۸۳ ^a	۱/۰۴ ± ۰/۲۱ ^a	۳/۳۳ ± ۰/۸۳ ^a	با استفاده از پلی‌ساکارید خارج سلولی

*حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵ است.

جدول ۵ : نتایج درصد زنده مانی میکروارگانیسم ها در غلظت های مختلف نانو ذرات سنتز شده به روش جوشاندن

غله (ppm)	Viability (%)
۰/۰۰	۱۰۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^k
۰/۲۰	۱۰۰/۰۰ ± ۰/۰۰ ^k
۰/۳۹	۹۶/۶۰ ± ۰/۰۶ ^g
۰/۷۸	۹۴/۱۰ ± ۰/۰۹ ⁱ
۱/۵۶	۹۲/۶۷ ± ۰/۰۹ ^h
۲/۱۲	۸۴/۴۰ ± ۰/۰۶ ^g
۶/۲۵	۸۱/۴۷ ± ۰/۰۹ ^f
۲۵	۷۶/۳۳ ± ۰/۲۳ ^e
۵۰	۷۲/۰۷ ± ۰/۱۳ ^d
۱۰۰	۶۰/۴۳ ± ۰/۰۳ ^c
۲۰۰	۴۸/۳۳ ± ۰/۱۲ ^b
۲۰۰	۳۸/۱۷ ± ۰/۰۹ ^a

*حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵ است

جدول ۶ : میانگین نتایج فعالیت ضد قارچی نانو ذرات سنتز شده (بر حسب mm) بر وری قارچ ها

نوع نانو ذرات	قطر عدم هاله رشد (mm)	
	<i>Saprolegnia</i>	<i>Aphanomyces</i>
بیومس تر	۸/۶۶ ± ۰/۴۷ ^d	۷/۶۶ ± ۰/۴۷ ^c
۳ mM	۹/۳۳ ± ۰/۴۷ ^c	۸/۳۳ ± ۰/۴۷ ^b
۲ mM	۱۰/۶۶ ± ۰/۴۷ ^b	۹/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{ab}
۳ mM	۹/۶۶ ± ۰/۴۷ ^a	۱۱/۶۶ ± ۰/۴۷ ^a
پلی ساکارید	۸/۳۳ ± ۰/۴۷ ^b	۱۰/۶۶ ± ۰/۴۷ ^b

*حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵ است.

شدت پیک تابعی از زمان آزمایش افزایش یافت. در زمان های ۰ و ۱۲ ساعت پیکی گزارش نشد. در حالی که در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب λ_{max} نانو ذرات نقره در طول موج nm ۴۳۳، ۴۳۴ nm، ۴۳۴ nm مشاهده شد. گزارش شده است که طیف جذب نانو ذرات حداقل ارتفاع پیک بین nm ۴۲۰ تا ۴۵۰ را همراه با جابجایی آبی یا قرمز با افزایش اندازه ذرات دارد (۲۷). پیشنهاد می شود که اگزوپلیساکاریدها نقش کاهش دهنده و تثبیت کننده را ایفا کنند، زیرا این پلیمرهای پیچیده همچنین می توانند حاوی بخش های آمینو قند استیله شده و همچنین ترکیبات غیر کربوهیدراتی مانند فسفات،

بحث

نتایج مشخصه یابی نانو ذرات تهیه شده به روش بیومس تر (شکل ۴ a) در سه غلظت مختلف نیترات نقره (۱، ۲ و ۳ mM) نانو ذرات نقره در طول موج nm ۴۲۰ تا ۴۳۴ مشاهده شد. که مربوط به جذب پلاسمون نانو ذرات نقره است که نشان می دهد که عصاره سیانوبacterیابی مسئول سنتز نانوذرات نقره است (۲۶). در سنتز نانوذرات نقره به روش جوشاندن نیز یک پیک در طول موج nm ۴۲۸ مشاهده شد که تأیید تشکیل نانوذرات نقره است. طی بررسی مشخصه یابی نانوذرات با کمک پلی ساکاریدهای خارج سلولی مشاهده شد

سایر روش‌ها به دلیل گروه عاملی اکترونگاتیو آلجینات مورد استفاده در پایداری نانوذرات نقره است (۳۳). بررسی اندازه ذرات به دست آمده نشان داد کمترین به بیشتری اندازه در نانوذرات سنتز شده به روش بیومس تر > جوشاندن < با کمک پلی‌ساکارید خارج سلولی بود که به ترتیب اندازه‌ای برابر با nm ۱۱۵/۴، ۱۶۰ و ۲۳۸/۹ داشتند. Casals و همکاران (۲۰۱۰) طی بررسی پوشش‌دهی نانو ذرات طلا با پروتئین نتایج مطابق با این مطالعه را نشان دادند. همچنین Faried و همکاران (۲۰۱۷)، طی بررسی تولید نانوذرات نقره و بررسی افزایش پایداری آن با آلجینات نشان دادند نانوذرات تولید شده پایداری بالایی داشتند (۳۴). در مقایسه بین نتایج SEM نانو ذرات بدون پوشش و پوشش‌دار تجمع کمتر نانو ذرات نقره پوشش داده شده با آلجینات مشاهده شد. با این تفاوت که شکل نانوذرات اندکی خشن‌تر بود که می‌تواند تأیید کننده برهمکنش نانوذرات با ماتریس آلجینات باشد. Yalçın و همکاران (۲۰۲۲) نیز نشان دادند نانوذرات سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره سیانوباکتر *Oscillatoria princeps* اندازه ذرات برابر با ۳۸ nm و تقریباً کروی و بصورت آگلومره گزارش کردند. Kuraganti و همکاران نیز طی سنتز نانوذرات نقره از عصاره *Characium typicum* شده را بین ۲۲ تا ۳۴ nm و به شکل بیضی گزارش کردند (۳۵، ۳۶). TEM روش ارجح برای اندازه‌گیری مستقیم اندازه نانوذرات، اندازه دانه، توزیع اندازه و مورفولوژی است. میکروگراف‌های به دست آمده از TEM کروی بودن نانوذرات سنتز شده از عصاره سیانوباکتری‌ها توسط مطالعات مختلف گزارش شده است (۳۷). Hanna و همکاران نیز شکل کروی نانوذرات *Phormidium* نقره سنتز شده از عصاره سیانوباکتر *Desertifilum tharensis* و *ambiguum* دادند (۳۸). در این مطالعه، فعالیت ضد باکتری نانوذرات نقره بر روی میکروگانیسم پاتوژن‌زای ماهی شامل (*Edwardsiella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*) و (*Escherichia coli*) مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق با نتایج

لاکتات، استات و گلیسرول باشند (۲۸). تفاوت در پتانسیل سنتز نانوذرات سیانوباکتری‌ها ممکن است به دلیل تفاوت‌های کمی و کیفی در مواد پروتئینی در عصاره‌های سلولی باشد. از نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌توان گفت نانوذرات به دست آمده کروی بودند و با افزایش زمان و غلظت عصاره اندازه بزرگ‌تری داشتند که مطابق با نتایج به دست آمده از مرفوولوژی نانو ذارت (SEM) بود. همراستا با نتایج، Tomer و همکاران طی بررسی سنتز سبز نانوذرات با عصاره سیانوباکتر *Haloleptolyngbya alcalis* نشان دادند پیک SPR ذرات در محدوده ۴۵۰-۴۰۰ nm مشاهده شد و گزارش کردند تشخیص تک پیک در ۴۴۰ nm با نانوذرات کروی شکل مطابقت دارد و ترکیبات زیست فعال موجود در عصاره را Sahoo مسئول سنتز نانو ذرات گزارش کردند (۱۰). همچنین، گزارش کروی شکل پیک تیز در محدوده ۴۲۰ nm را گزارش کردند و اظهار نمودند کاکتیلیس یون‌های Ag و تبدیل به (0) به دلیل ترکیبات زیست فعال در سیانوباکتر طی ۵۶ ساعت عمل کرد (۲۹). Wei و همکاران نشان دادند افزایش نیترات نقره تا ۵۲ mM سبب افزایش باند SPR شد که نشان دهنده تشکیل بیشتر نانوذرات نقره بود (۲۹). داده‌های FTIR بر اساس مطالعات Supeng و همکاران، Mallikarjuna و همکاران (۲۰۱۴) آنالیز (۲۰۱۱) همچنین Kanipandian و همکاران (۲۰۱۴) شدند. مطابق با نتایج، هر سه طیف بربکدیگر منطبق هستند که نشان دهنده تساوی در میزان تخلیص آن‌ها و تولید ترکیبات مشابه است. تفاوت اندکی در شدت پیک وجود دارد که به دلیل تفاوت در تعداد گروه‌های عاملی و اتم‌های تشکیل دهنده هر طیف است (۳۰) (۳۱) (۳۲). نتایج پتانسیل زتا نانو ذرات نقره تولید شده به روش‌های مختلف، تحرک و اندازه آن‌ها در شکل ۶ گزارش شده است. نتایج پتانسیل زتا در هر سه روش مثبت بود که نشان دهنده بار مثبت ذرات پراکنده در سوسپنسیون می‌باشد. طی مقایسه سه روش تولید نانو ذرات مشخص شد تولید نانو ذرات با کمک جوشاندن پایداری بالاتری (mV) (۲۷/۵) نسبت به سایر روش‌ها داشتند. کاکتیلیس یون‌های پتانسیل زتا در

Nostoc M5094-IBRC نانوذرات سنتز شده توسط سویه بودند (۴۳). محققان اینگونه نتیجه‌گیری کردند که که نانوذرات Ag_3PO_4 در خواص ضد باکتریایی بسیار مهم هستند. هم‌چنین فعالیت باکتری کشی این دو نوع نانوذره را نشان داند و اظهار کردند غلظت MBC با غلظت MIC یکسان بود. Karageorgou و همکاران نیز نشان دادند نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره سیانوباکتر *Pseudanabaena/Limnothrix sp* اثر آنتی‌باکتریایی در غلظت‌های پایین و در مدت زمان کوتاهی را علیه سلول‌های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی داشتند (۴۴). در تأیید خاصیت ضد میکروبی نانوذرات تهیه شده میزان تراکم نوری با استفاده از اسپیکتوفتومتر اندازه‌گیری شد (۴۲). مطابق با نتایج ارائه شده در (جدول ۵) مرگ باکتری‌ها ارتباط مستقیمی با غلظت نیترات نقره، پوشش‌دهی نانوذرات و روش سنتز نانو ذرات دارد. فعالیت ضد قارچی نانوذرات نقره ناشی از تشکیل ترکیبات نامحلول با گروه‌های سولفیدریل در دیواره سلولی قارچ‌ها و اختلال در آنزیم‌ها و لیپیدهای متصل به غشاء است که باعث لیز سلولی می‌شود. آسیب به دیواره سلولی و غشاء منجر به افزایش نفوذپذیری غشا و آزاد شدن یون‌های پتابسیم (K^+) می‌شود. علاوه بر این، نانوذرات نقره فرآیندهای سلولی را که در جوانه زدن مخمر نقش دارند، احتمالاً از طریق اختلال در یکپارچگی غشاء مهار می‌کنند. میکروسکوپ الکترونی عبوری برهمنکش بین نانوذرات نقره و ساختار غشا را تایید می‌کند (۴۵). Hamida و همکاران طی بررسی خاصیت ضد قارچی نانوذرات نقره از دو عصاره سیانو باکتری دادند نانوذرات تهیه شده از سویه *Desertifilum sp* و *Nostoc Bahar_M* نشان دادند نانوذرات تهیه شده از سویه *Desertifilu sp* خاصیت ضد قارچی بالاتری را نشان دادند و علت آن را به الگوهای متفاوت رابط نانو/سلول ناشی از تفاوت در گروه‌های عاملی احاطه کننده نانوذرات نقره، که از سویه‌های سیانوباکتری مختلف مشتق شده‌اند، نسبت دادند (۴۶). Elkomy و همکاران طی بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال نانو ذرا تهیه شده از عصاره سیانوباکتری *Phormidium formosum* نشان دادند نانوذرات سنتز شده فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی

افزایش غلظت نیترات نقره برای سنتز نانوذرات سبب افزایش حساسیت باکتری‌ها شد. مطابق با نتایج بالاترین حساسیت در باکتری *Yersinia enterocolitica* گزارش شد. در روش‌های مورد بررسی بالاترین عدم هاله رشد در نانو ذرات سنتز شده به روش جوشاندن و پوشش داده شده با آلجینات مشاهده شد (۳۹). نتایج مشابه در بررسی میزان MIC و MBC نانوذرات گزارش شد. در تمامی آزمایشات مورد بررسی تأثیر مثبت پوشش‌دهی و روش جوشاندن برای سنتز نانوذرات در خاصیت ضد میکروبی نانوذرات را نشان داد (۳۴). در رابطه با استفاده از پوشش برای پایداری نانوذرات، اینگونه می‌توان گفت، عوامل پوشاننده به عنوان تثبیت کننده مانع از رشد بیش از حد نانوذرات می‌شوند و از تجمع/انعقاد آن‌ها در سنتز کلوفیدی جلوگیری می‌کنند که بسیار مهم است. هم‌چنین، لیگاندهای پوشاننده سطح مشترک را که در آن نانوذرات با محیط آماده‌سازی خود برهمنکش می‌کنند، را تثبیت می‌کنند (۴۰). El-Naggar و همکاران، در رابطه با فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره تهیه شده از عصاره فیکوبیلی پروتئینی سیانوباکتری اعلام کردند وجود مولکول‌های زیستی فیکوبیلی پروتئین ممکن است توانایی لنگر انداختن نانوذرات پوشش داده بر روی غشای سلولی باکتری‌ها را ارائه دهد و آن‌ها را قادر می‌سازد تا به فعالیت ضدباکتریایی دست یابند (۲۶). Seku و همکاران، طی بررسی سنتز سبز نانوذرات نقره با پوشش صمع کندر گوگو کربوکسی متیله نشان دادند اثر ضد باکتریایی راروی باکتری *Bacillus* و *Bacillus subtilis* ، *Escherichia coli* نشان دادند (۴۱). Hamida و همکاران طی بررسی خاصیت ضد باکتری نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره *Bacillus* *Desertifilum sp* در برابر ۵ باکتری (سیانوباکتری *Shigella* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *cereus* *Bacillus subtilis* و *Salmonella enterica* ، *flexneri*) نشان دادند (۴۲). Aletayeb و همکاران طی بررسی خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره $\text{AgCl}/\text{AgPO}_4$ از دو سویه متفاوت سیانوباکتر *Nostoc* نشان دادند نانوذرات ساخته شده توسط سویه *Nostoc pruniforme* در مهار رشد باکتری موثرتر از

می توانند به عنوان یک جایگزین *Dulcicalothrix alborzica* بالقوه برای آنتی بیوتیک های سنتی در درمان عفونت های باکتریایی در ماهیان استفاده شوند. این نانوذرات دارای مزایایی مانند طیف وسیع فعالیت ضد میکروبی، بی سمیت بودن برای سلول های ماهی و قابلیت تولید به روش ساده و کم هزینه هستند. پیشنهاد می شود در تحقیقات آینده، سایر عوامل پوشش دهنده جهت تکمیل بانک اطلاعاتی و بررسی خواص آنتی باکتریال و آنتی- فانگال نانوذرات نقره سنتز شده در این مقاله بر روی عوامل پاتوژن- زای انسانی بررسی شوند. همچنین سنتز نانوذرات نقره از دیگر سویه های سیانوباکتر در مقایسه با عملکرد این مطالعه بررسی شود. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می دهد که نانوذرات نقره پوشش دار شده با آجینات بیوسنتر شده توسط *Dulcicalothrix alborzica* دارای پتانسیل قوی برای استفاده به عنوان یک عامل ضد میکروبی در صنعت آبزی پروری هستند.

سپاس‌گزاری

نتایج موجود در این مقاله مستخرج از پایان نامه می باشد، به این وسیله از کلیه افراد تشکر و قدردانی می شود.
حامی مالی: ندارد
تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تایید شده است (کد اخلاقی: IR.IAU.B.REC.1401.030).

مشارکت نویسندها

دکتر بهاره نوروزی در ارائه ایده و در طراحی مطالعه، حسن بیرانوند در جمع آوری داده ها و دکتر بهاره نوروزی در تجزیه و تحلیل داده ها مشارکت داشته و همه نویسندها در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

در برابر طیف وسیعی از باکتری های بیماری زا داشتند (۴۷). در این مطالعه، فقط از یک نوع سیانوباکتری (*Dulcicalothrix alborzica*) برای سنتز نانوذرات نقره با استفاده از سایر گونه های سیانوباکتری می تواند اطلاعات مفیدی در مورد تاثیر تنوع زیستی سیانوباکتری ها بر خواص نانو ذرات نقره به دست دهد. همچنین اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره بر روی چهار نوع باکتری گرم منفی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره بر روی سایر میکرووارگانیسم ها مانند قارچ ها، ویروس ها و باکتری های گرم مثبت می تواند کاربردهای بالقوه این نانوذرات را گسترش دهد.

نتیجه گیری

نتایج، نشان ویژه سازی نانوذرات نقره سنتز شده را در هر سه روش تأیید کرد. حضور تنها یک باند SPR در طیف جذب FTIR نشان دهنده سنتز نانو ذرات کروی بود. نتایج طیف سنجی به دست آمده نشان داد هر سه طیف بربکدیگر منطبق بودند که نشان دهنده تساوی در میزان تخلیص آن ها و تولید ترکیبات مشابه است. تفاوت اندکی در شدت پیک وجود دارد که به دلیل تفاوت در تعداد گروه های عاملی و اتم های تشکیل دهنده هر طیف است. پتانسیل زتا نانوذرات سنتز شده در هر سه روش مثبت بود که نشان دهنده بار مثبت ذرات پراکنده در سوسپانسیون می باشد. طی مقایسه سه روش تولید نانوذرات مشخص شد تولید نانوذرات با کمک جوشاندن پایداری بالاتری (۲۷/۵ mV) نسبت به سایر روش ها داشتند. همچنین نانو ذرات تهیه شده به روش بیومس تحرک بالاتری داشتند. بررسی مورفولوژی نانو ذرات TEM و SEM کروی بودن نانوذرات سنتز شده را تأیید کرد. همچنین تجمع کمتر نانوذرات نقره پوشش داده شده با آرژینات در بررسی SEM مشاهده شد. بررسی خاصیت آنتی باکتریال و آنتی فانگال نانوذرات بر روی پاتوژن های ماهی نشان دهنده فعالیت خوب ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده به روش جوشاندن و پوشش دار شده با آرژینات نسبت به سایر روش ها بود. این مطالعه نشان می دهد که نانوذرات نقره پوشش دار شده با آجینات بیوسنتر شده توسط

References:

- 1-Nasr-Eldahan S, Nabil-Adam A, Shreadah MA, Maher AM, El-Sayed Ali T. *A Review Article on Nanotechnology in Aquaculture Sustainability as a Novel Tool in Fish Disease Control.* Aquaculture International 2021; 29: 1459-80.
- 2-Ameen F, Abdullah MM, Al-Homaidan AA, Al-Lohedan HA, Al-Ghanayem AA, Almansob A. *Fabrication of Silver Nanoparticles Employing the Cyanobacterium Spirulina Platensis and Its Bactericidal Effect Against Opportunistic Nosocomial Pathogens of The Respiratory Tract.* Journal of Molecular Structure 2020; 1217: 128392.
- 3-Younis NS, El Semary NA, Mohamed ME. *Silver Nanoparticles Green Synthesis Via Cyanobacterium Phormidium Sp.: Characterization, Wound Healing, Antioxidant, Antibacterial, and Anti-Inflammatory Activities.* Eur Rev Med Pharmacol Sci 2021; 25(7): 3083-96.
- 4-Qiu L, Zhang M, Bhandari B, Yang C. *Shelf-life extension of aquatic products by applying nanotechnology: A review.* Crit Rev Food Sci Nutr 2022; 62(6): 1521-35.
- 5-Muruganandam M, Chipps SR, Ojasvi PR. *On The Advanced Technologies to Enhance Fisheries Production and Management.* ASAG 2019; 3(8): 216-22.
- 6-Shah BR, Mraz J. *Advances in Nanotechnology for Sustainable Aquaculture and Fisheries.* Reviews in Aquaculture 2020; 12(2): 925-42.
- 7-Sarkar B, Mahanty A, Gupta SK, Choudhury AR, Daware A, Bhattacharjee S. *Nanotechnology: A Next-Generation Tool for Sustainable Aquaculture.* Aquaculture 2022; 546: 737330.
- 8-Nowruzi B, Hashemi N. *A Review on the Antimicrobial Effects of Nanoparticles and Atmospheric Cold Plasma Technology.* Journal of Isfahan Medical School 2023; 41(729): 631-42.
- 9-Tomer AK, Rahi T, Neelam DK, Dadheech PK. *Cyanobacterial Extract-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and their Application in Ammonia Sensing.* International Microbiology 2019; 22: 49-58.
- 10-Javaid A, Oloketyl SF, Khan MM, Khan F. *Diversity of Bacterial Synthesis of Silver Nanoparticles.* BioNanoScience 2018; 8: 43-59.
- 11-Aslam H, Shukrullah S, Naz MY, Fatima H, Hussain H, Ullah S, Assiri MA. *Current and Future Perspectives of Multifunctional Magnetic Nanoparticles Based Controlled Drug Delivery Systems.* Journal of Drug Delivery Science and Technology 2022; 67: 102946.
- 12-Nowruzi B, Beiranvand H. *A Review of Medical Applications of Cyanobacteria.* Journal of Isfahan Medical School 2024; 42(755); 69-83. [Persian]
- 13-Anvar SA, Nowruzi B, Afshari G. *A Review of The Application of Nanoparticles Biosynthesized by Microalgae and Cyanobacteria in Medical and Veterinary Sciences.* Iranian Journal of Veterinary Medicine 2023; 17(1): 1-18. [Persian]
- 14-Nowruzi B, Shalygin S. *Multiple Phylogenies Reveal a True Taxonomic Position of Dulcicalothrix Alborzica Sp. Nov. (Nostocales, Cyanobacteria).* Fottea 2021; 21(2): 235-46.

- 15-Raj R, Kumari M. *Blue Green Algae (BGA) and Its Application.* Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2020; 9(2): 287-96.**
- 16-Garg D, Sarkar A, Chand P, Bansal P, Gola D, Sharma S, et al. *Synthesis of Silver Nanoparticles Utilizing Various Biological Systems: Mechanisms and Applications—A Review.* Prog Biomater 2020; 9(3): 81-95.**
- 17-Geetha S, Vijayakumar K, Aranganayagam KR, Thiruneelakandan G. *Biosynthesis, Characterization of Silver Nanoparticles and Antimicrobial Screening by Oscillatoria Annae.* AIP Conf Proc 2020; 2270(1); 110026.**
- 18-Ahmed F, Soliman FM, Adly MA, Soliman HA, El-Matbouli M, Saleh M. *In Vitro Assessment of the Antimicrobial Efficacy of Chitosan Nanoparticles Against Major Fish Pathogens and their Cytotoxicity to Fish Cell Lines.* J Fish Dis 2020; 43(9): 1049-63.**
- 19-Al-Dhafri K, Ching CL. *Phyto-Synthesis of Silver Nanoparticles and Its Bioactivity Response Towards Nosocomial Bacterial Pathogens.* Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 2019; 18: 101075.**
- 20-Kashyap M, Samadhiya K, Ghosh A, Anand V, Shirage PM, Bala K. *Screening of Microalgae for Biosynthesis and Optimization of Ag/Agcl Nano Hybrids Having Antibacterial Effect.* RSC Advances 2019; 9(44): 25583-91.**
- 21-Ismail GA, El-Sheekh MM, Samy RM, Gheda SF. *Antimicrobial, Antioxidant, and Antiviral Activities of Biosynthesized Silver Nanoparticles by Phycobiliprotein Crude Extract of the Cyanobacteria Spirulina Platensis and Nostoc Linckia.* Bionanoscience 2021; 11: 355-70.**
- 22-Little RF, Hertweck C. *Chain Release Mechanisms in Polyketide and Non-Ribosomal Peptide Biosynthesis.* Nat Prod Rep 2022; 39(1): 163-205.**
- 23-Nowruzi B, Blanco S, Nejadsattari T. *Chemical and Molecular Evidences for the Poisoning of a Duck by Anatoxin-A, Nodularin and Cryptophycin at the Coast of Lake Shoormast (Mazandaran Province, Iran).* International Journal on Algae 2018; 20(4): 359-76.**
- 24-Divya M, Vaseeharan B, Abinaya M, Vijayakumar S, Govindarajan M, Alharbi NS, et al. *Biopolymer Gelatin-Coated Zinc Oxide Nanoparticles Showed High Antibacterial, Antibiofilm and Anti-Angiogenic Activity.* Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 2018; 178: 211-8.**
- 25-Gulick AM, Aldrich CC. *Trapping Interactions between Catalytic Domains and Carrier Proteins of Modular Biosynthetic Enzymes with Chemical Probes.* Nat prod Rep 2018; 35(11): 1156-84.**
- 26-El-Naggar NE, Hussein MH, El-Sawah AA. *Phycobiliprotein-Mediated Synthesis of Biogenic Silver Nanoparticles, Characterization, In Vitro and in Vivo Assessment of Anticancer Activities.* Sci Rep 2018; 8(1): 8925.**
- 27-Husain S, Afreen S, Yasin D, Afzal B, Fatma T. *Cyanobacteria as A Bioreactor for Synthesis of Silver Nanoparticles-An Effect of Different Reaction Conditions on the Size of Nanoparticles and their Dye Decolorization Ability.* J Microbiol Methods 2019; 162: 77-82.**

- 28-**Yadav S, Chandra S, Amardeep, Kumar A, Awasthi M. *Green Synthesis of Silver Nano-Particle from Cyanobacteria and Effect on Microalgal Growth and Production of Exopolysaccharide (EPS)*. Cyanobacteria - Recent Advances and New Perspectives [Working Title]. IntechOpen; 2022. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.106039>
- 29-**Sahoo CR, Maharana S, Mandhata CP, Bishoyi AK, Paidesetty SK, Padhy RN. *Biogenic Silver Nanoparticle Synthesis with Cyanobacterium Chroococcus Minutus Isolated from Baliharachandi Sea-Mouth, Odisha, and in Vitro Antibacterial Activity*. Saudi J Biol Sci 2020; 27(6): 1580-6.
- 30-**Supeng L, Guirong B, Hua W, Fashe L, Yizhe L. *TG-DSC-FTIR Analysis of Cyanobacteria Pyrolysis*. Physics Procedia 2012; 33: 657-62.
- 31-**Mallikarjuna K, Narasimha G, Dillip GR, Praveen B, Shreedhar B, Lakshmi CS, et al. *Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Ocimum Leaf Extract and their Characterization*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 2011; 6(1): 181-6.
- 32-**Kanipandian N, Kannan S, Ramesh R, Subramanian P, Thirumurugan R. *Characterization, Antioxidant and Cytotoxicity Evaluation of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using Cleistanthus Collinus Extract as Surface Modifier*. Materials Research Bulletin 2014; 49: 494-502.
- 33-**Shao Y, Wu C, Wu T, Yuan C, Chen S, Ding T, Ye X, Hu Y. *Green Synthesis of Sodium Alginate-Silver Nanoparticles and their Antibacterial Activity*. International Journal of Biological Macromolecules 2018; 111: 1281-92.
- 34-**Manosalva N, Tortella G, Cristina Diez M, Schalchli H, Seabra AB, Durán N, et al. *Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Effect of Synthesis Reaction Parameters on Antimicrobial Activity*. World J Microbiol Biotechnol 2019; 35(6): 1-9.
- 35-**Yalçın D, Erkaya İA, Erdem B. *Antimicrobial, Antibiofilm Potential, and Anti-Quorum Sensing Activity of Silver Nanoparticles Synthesized from Cyanobacteria Oscillatoria Princeps*. Environ Sci Pollut Res Int 2022; 29(59): 89738-52.
- 36-**Kuraganti GS, Edla S, Dasari T, Reddy M. *Characterization, In Vitro Cytotoxic and Antibacterial Exploitation of Green Synthesized Freshwater Cyanobacterial Silver Nanoparticles*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2020; 10(9): 088-98.
- 37-**Vanlalveni C, Rajkumari K, Biswas A, Adhikari PP, Lalfakzuala R, Rokhum L. *Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Nostoc Linckia and Its Antimicrobial Activity: A Novel Biological Approach*. Bionanosci 2018; 8: 624-31.
- 38-**Hanna AL, Hamouda HM, Goda HA, Sadik MW, Moghanm FS, Ghoneim AM, et al. *Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Produced by Phormidium Ambiguum and Desertifilum Tharensense Cyanobacteria*. Bioinorg Chem Appl 2022; 2022: 9072508.
- 39-**Wu Y, Yang Y, Zhang Z, Wang Z, Zhao Y, Sun L. *A Facile Method to Prepare Size-Tunable Silver Nanoparticles and Its Antibacterial Mechanism*. Advanced Powder Technology 2018; 29(2): 407-15.
- 40-**Javed R, Zia M, Naz S, Aisida SO, Ain NU, Ao Q. *Role of Capping Agents in the Application of*

Nanoparticles in Biomedicine and Environmental Remediation: Recent Trends and Future Prospects.
Nanobiotechnol 2020; 18: 1-5.

41-Seku K, Gangapuram BR, Pejjai B, Kadimpatti KK, Golla N. *Microwave-Assisted Synthesis of Silver Nanoparticles and their Application in Catalytic, Antibacterial and Antioxidant Activities.* Journal of Nanostructure in Chemistry 2018; 8: 179-88.

42-Hamida RS, Abdelmeguid NE, Ali MA, Bin-Meferij MM, Khalil MI. *Synthesis of Silver Nanoparticles Using a Novel Cyanobacteria *Desertifilum Sp.* Extract: Their Antibacterial and Cytotoxicity Effects.* International Journal of Nanomedicine 2020; 49-63.

43-Aletayeb P, Ghadam P, Mohammadi P. *Green Synthesis of AgCl/Ag₃PO₄ Nanoparticle Using Cyanobacteria and Assessment of Its Antibacterial, Colorimetric Detection of Heavy Metals and Antioxidant Properties.* IET Nanobiotechnology 2020; 14(8): 707-13.

44-Karageorgou D, Zygouri P, Tsakiridis T, Hammami MA, Chalmpes N, Subrati M, et al. *Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles with High Antibacterial Activity Using Cell Extracts of Cyanobacterium *Pseudanabaena/Limnothrix Sp.** Nanomaterials 2022; 12(13): 2296.

45-Rozhin A, Batasheva S, Kruychkova M, Cherednichenko Y, Rozhina E, Fakhrullin R. *Biogenic Silver Nanoparticles: Synthesis and Application as Antibacterial and Antifungal Agents.* Micromachines 2021; 12(12): 1480.

46-Hamida RS, Ali MA, Goda DA, Redhwan A. *Anticandidal Potential of Two Cyanobacteria-Synthesized Silver Nanoparticles: Effects on Growth, Cell Morphology, and Key Virulence Attributes of *Candida Albicans*.* Pharmaceutics 2021; 13(10): 1688.

47-Elkomy RG. *Antimicrobial Screening of Silver Nanoparticles Synthesized by Marine Cyanobacterium *Phormidium Formosum*.* Iran J Microbiol 2020; 12(3): 242-8.

Studying the Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles Coated with Alginate Biosynthesized by *Dulcicalothrix alborzica*

Bahareh Nowruzi^{*1}, Hassan Beyranvand¹

Original Article

Introduction: Nowadays, Cyanobacteria are one of the important candidates in the green biosynthesis of nanoparticles. Considering the detrimental effects of chemically synthesized nanoparticles, the aim of this study was the biosynthesis and antimicrobial activity of nanoparticles by aquatic cyanobacterium.

Methods: Silver nanoparticles (AgNPs) were biosynthesized using three different approaches: wet biomass, boiling, and extracellular polysaccharides (EPS). Alginate coating was employed to enhance the nanoparticles' stability. Characterization of the nanoparticles was performed using UV-vis spectroscopy, Fourier transform infrared (FTIR) analysis, scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), and zeta potential measurements. The antimicrobial properties of the nanoparticles were evaluated against fish pathogenic bacteria and fungi. Statistical analyzes were performed with SPSS version 16 software, and the significant difference between the means was performed with one-way analysis of variance with 95% confidence limits and Tukey's test, and the results were drawn as a graph with Excel software.

Results: The UV-vis spectroscopy results confirmed the synthesis of AgNPs in all three methods. FTIR analysis revealed similar spectra for all three methods, indicating comparable purity and production of similar compounds. Electron microscope images showed the sphericity of nanoparticles prepared by boiling method, and the average diameter of uncoated and alginate coated nanoparticles was 38 and 180.04 nm, respectively. Zeta potential analysis indicated a positive surface charge on the nanoparticles. The highest zone of inhibition was observed for AgNPs synthesized by the boiling method and coated with alginate. Similar results were obtained for the antifungal activity, with *Saprolegnia* exhibiting higher sensitivity to the synthesized nanoparticles compared to the other species studied.

Conclusion: The novel strain *Dulcicalothrix alborzica* demonstrated potential as a potent producer of AgNPs with unique properties and promising applications in microbial biotechnology.

Keywords: Antimicrobial activity, Alginate-coated silver nanoparticles, *Dulcicalothrix alborzica*, Fish pathogens.

Citation: Nowruzi B, Beyranvand H. Studying the Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles Coated with Alginate Biosynthesized by *Dulcicalothrix alborzica*. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2024; 32(8): 8118-40.

¹Department of Biotechnology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09113710956, email: bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir