

(مقاله پژوهشی)

بررسی اثر نانو ذرات نقره تولیدی از مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر باکتری‌های بیماری‌زای شاخص

علی سرداریان^۱، اسماعیل عطای صالحی^{۲*}، اکرم آریانفر^۲، رضا صفری^۳

۱-دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

۳- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۲

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثر نانو ذرات نقره تولیدی لاکتوباسیلوس پلانتاروم به دست آمده از دستگاه گوارش ماهی قزل آلاهی رنگین کمان بر باکتری‌های بیماری‌زای شاخص انجام شد. بدین منظور پس از جداسازی، شناسایی و تایید جنس و گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم، اثرات مهارکننده دو غلظت از نانو ذرات نقره (۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر) استخراج شده از مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم، نیترات نقره و آنتی‌بیوتیک‌های سیروفلوکساسین و آمیکاسین بر باکتری‌های بیماری‌زای شاخص استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرتوس، باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس آئروجینوزا و اشرشیا کلی به روش انتشار در محیط آگار و ماکرودایلوشن (تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC و کشندگی یا MBC) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیشترین جذب نوری برای نانو ذرات نقره در طول موج ۵۱۰ نانومتر بود که تأیید کننده تولید نانو ذره می باشد (با ۳ تکرار). شکل نانو ذره نقره به صورت کروی و اندازه آن بین ۳/۵۸-۵/۲۷ نانومتر بود. اختلاف بین اثرات ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌های منتخب و نانو ذرات نقره معنی دار بود ($P < 0.05$). به طوری که تیمار آمیکاسین بیشترین تعداد و نیترات نقره و غلظت ۵۰ نانوذرات نقره کمترین تعداد باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس آئروجینوزا، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرتوس را دارا بودند. در خصوص تأثیر ضد باکتریایی نانو ذره نقره در بین باکتری‌های مورد بررسی استافیلوکوکوس اورئوس حساس ترین و سودوموناس آئروجینوزا مقاوم ترین باکتری بودند به طوری که کمترین غلظت مهارکننده نانو ذرات نقره برای استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا به ترتیب ۲/۵ و ۱۰ و کمترین غلظت کشندگی نیز به ترتیب ۱۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود با توجه به اثرات ضد میکروبی نانو ذره نقره می توان از آن به عنوان مواد ضد میکروبی در فرمولاسیون انواع مواد ضد عفونی کننده و آنتی سپتیک‌ها استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات نقره، مایع رویی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، باکتری‌های بیماری‌زا.

۱- مقدمه

باتوجه به استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش مقاومت در برابر باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های مولد فساد غذایی و افزایش مسمومیت‌ها گوارشی، یافتن جایگزین‌های مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری است. بنابراین مطالعات گسترده‌ای در مورد پتانسیل استفاده از ترکیبات ضد میکروبی موجود در حیوانات و گیاهان و نیز استفاده از نانوذرات نقره برای کنترل و درمان عوامل بیماری‌زا صورت گرفته است (۲۵). نانو ذرات نقره به دو روش فیزیکی و شیمیایی تولید می‌شوند. روش‌های فیزیکی و شیمیایی علاوه بر تحمیل هزینه‌های زیاد، آلودگی‌های محیط زیستی بسیاری را به همراه دارند. در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های زیستی مانند استفاده از قارچ‌ها، باکتری‌ها و عصاره گیاهان به دلیل ساده بودن، کم‌هزینه بودن، داشتن راندمان زیاد، غیرسمی بودن و سازگار بودن با محیط زیست توجه خاصی را به خود معطوف ساخته‌اند (۱۳). در این روش وقتی میکروارگانیسم‌ها در معرض نمک یون‌های فلزی قرار می‌گیرند، این مواد از طریق مکانیزم کاتالستی احیا و به‌صورت داخل سلولی و یا خارج سلولی تولید می‌شوند. در مورد باکتری‌ها از جمله باسیلوسها و باکتری‌های لاکتیک دست‌کاری ژنتیکی به دلیل نداشتن هسته مشخص به‌سهولت امکان‌پذیر است و تولید سویه صنعتی در آن‌ها در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌ها از قبیل قارچ‌ها آسان‌تر می‌باشد (۲۴). فناوری نانوذره نقره باعث به وجود آمدن انقلابی شگرف در مواد ضد میکروبی شده است و به‌سرعت در بازار و صنعت نانو بیوتکنولوژی نمایان شده، رشد کرده و فعالیت ضد میکروبی قوی آن موجب شده که بسیاری به گسترش محصولات نانو نقره روی آورند. نانوذرات نقره تولید شده با روش زیستی دارای ویژگی‌ای مفید و مؤثری از قبیل میزان سطح بالا، اندازه کوچک و پراکندگی بالا می‌باشند که همین عوامل سبب می‌شود تا اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره در مقایسه با نقره افزایش قابل توجهی داشته باشد (۱۶). Popoola و همکاران (۲۷) نشان دادند که سوپرناتانت حاصل از باکتری‌های اسید لاکتیک مانند لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillus casei*) و لاکتوباسیلوس فرمتوم (*Lactobacillus fermentum*)

حاصل از غذاهای تخمیری قادر به تولید نانوذرات نقره با اثرات ضد میکروبی بالا علیه اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا نومونیا (*Klebsiella pneumoniae*) گونه‌های باسیلوس و استرپتوکوکوس پیوژنز (*Streptococcus pyogenes*) هستند. در بررسی Hoseynzadeh و همکاران (۱۱) مشخص شد که باکتری‌های باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) و سودوموناس آئروجینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) جدا سازی شده از خاک توان تولید نانوذرات نقره با اثرات ضد میکروبی زیاد را علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلی و باسیلوس سوبتیلیس دارا می‌باشند. Singh و همکاران (۳۳) تولید نانوذرات نقره را توسط آسینتوباکتر کالکواستیکوس در دماهای ۴ تا ۸۰ درجه سلسیوس بررسی کردند. نتایج نشان داد که ۱۲ سویه این باکتری قادر به تولید نانوذرات نقره در تمامی شرایط دمایی و نوری بررسی شده و به‌صورت برون سلولی بودند. El-Batal و همکاران (۹) نشان دادند که آنزیم نیترات ردوکتاز موجود در سوپرناتانت کشت باکتری باسیلوس استروترموفیلوس نقش مهمی در احیا یون‌های نقره و تشکیل نانوذرات نقره دارد. Saravanan و همکاران (۳۰) از مایع‌رویی کشت باسیلوس مگاتریوم برای تولید نانوذرات نقره به‌صورت برون سلولی بهره بردند. Kalimuthu و همکاران (۱۴) گزارش کردند که باکتری باسیلوس لیچنی فورمیس (*Bacillus licheniformis*) قادر به احیا یون نقره و تولید نانوذرات نقره است. با توجه به مطالب ذکر شده هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر نانو ذرات نقره تولیدی از مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر باکتری‌های بیماری‌زای شاخص می‌باشد. باکتری مذکور جزء باکتری‌های مفید و پروبیوتیک بوده و تولید نانوذره از این باکتری اهمیت آن را دوچندان می‌کند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس پلانتاروم

در این مطالعه تعداد ۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با دامنه وزنی 50 ± 350 گرم از مزرعه سردابی مورد تایید دامپزشکی استان مازندران خریداری و به پژوهشکده اکولوژی

حاصله با ترادف ژن موجود در بانک ژن برنامه بلاست در NCBI مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. بعد از تایید باکتری، کشت خالص آن جهت تولید نانو ذرات نقره مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- کشت اولیه لاکتوباسیلوس پلانتروم

کشت اولیه باکتری اسید لاکتیک در محیط کشت MRS در شرایط بی‌هوازی حاوی نیترا نقره ۳/۵ میلی مولار با pH ۷ (در حضور پنج درصد گاز CO₂) به صورت خطی صورت گرفته و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوباتور شیکردار به مدت ۱۸ ساعت انجام شد. برای بررسی توانایی تولید نانو ذرات نقره، از رسوب سلولی و مایع کشت استفاده شد و برای بررسی تولید نانو ذرات نقره مایع رویی کشت از فیلترهای ۰.۲۲ میکرون عبور داده شد و همچنین توده سلولی در شرایط استریل سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو شد. سپس مایع کشت (۱:۱ حجمی/حجمی) و توده سلولی باکتریایی (۱۰^۸ CFU/ml) هر یک جداگانه در معرض محلول نیترا نقره با غلظت ۱ و ۳.۵ میلی مولار با pH ۷ درون ارلن مایر در شرایط استریل و تاریکی به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد شستشو شد. در صورت دیده شدن تغییر رنگ در هر یک از نمونه باکتری‌های جداسازی شده بیومس باکتری‌ها قادر به تولید نانو ذرات نقره با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه در مدت ۶ دقیقه جداسازی خواهد شد. از نیترا نقره ۱۰ میلی مولار برای کنترل منفی استفاده شد (۳۲، ۳۴).

۲-۳- تولید نانو ذرات نقره با استفاده از مایع رویی

۵ میلی لیتر از مایع رویی با ۹۵ میلی لیتر محلول ۲ میلی مولار نیترا نقره مخلوط شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و فضای تاریک قرار داده شد (pH=7). بعد از این مرحله تغییر رنگ محلول از زرد به قهوه ای تیره تایید اولیه نانو ذرات نقره بود. از محلول نیترا نقره ۲ میلی مولار فاقد مایع رویی بعنوان نمونه کنترل استفاده گردید. در پایان دوره نگهداری، رنگ نمونه کنترل زرد باقی مانده و تغییری حاصل نشد.

دریای خزر منتقل گردید. غذای مورد استفاده این ماهیان به شکل اکستروود فاقد پروبیوتیک بوده و از کارخانه خوراک آبریان فرادانه تهیه شده بود. علت انتخاب این وزن کامل بودن فلور دستگاه گوارش ماهی بوده است. در ابتدا سلامت ماهیان با انجام آزمایشات باکتری شناسی و انگل شناسی تایید شد. سپس ماهیان با زدن ضربه به سر کشته شده و بلافاصله به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شدند. جهت جداسازی باکتری بدین صورت عمل شد که در شرایط استریل پس از ضد عفونی سطح بدن با بتادین والکل ۷۰ درجه، خط میانی شکم با اسکالپل استریل شکافته شد سپس محتویات روده‌ها از ابتدا تا ۱ سانتی متری انتهایی، جمع آوری و توزین شد. سپس از محتویات روده رقت سریال (۱۰^۴-۱۰^۲) با سرم فیزیولوژی استریل تهیه و کشت روی محیط های MRS (De Man Rogosa & Sharp agar) جهت جداسازی و شمارش باکتری‌های گروه لاکتیک و (Brain BHI) (Heart Infusion agar) به منظور شمارش باکتری‌های مزوفیل هوایی انجام گرفت. جهت انکوباسیون باکتری‌های لاکتیک از جار بی‌هوازی و گاز پک نوع C استفاده شد. نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و پس از آن، شمارش کلی باکتری‌ها و باکتری‌های لاکتیک بر حسب CFU در هر گرم از محتویات روده مشخص گردید. جهت تعیین دقیق گونه باکتریایی لاکتیک و تایید آن از آزمایش بیوشیمیایی و مولکولی (تعیین توالی ژن 16S rRNA) به روش PCR استفاده شد و تعیین توالی باکتری مورد نظر (Sequencing) نیز صورت گرفت (۲۶). در این روش استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش فنل-کلروفوم صورت گرفت (۵). همانندی توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA به کمک برنامه بلاست در NCBI با توالی ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی ژنوم بانک ژنی مقایسه شد و سپس با استفاده از نرم افزار MEGA4 درخت فیلوژنی مربوط ترسیم شد. جهت انجام تعیین توالی نمونه‌های مورد مطالعه یک نمونه از محصول PCR هر یک از ژن‌ها برای شرکت تکاپوزیست ارسال گردید و نتایج ارسال شده توسط شرکت جهت بررسی مقایسه ترادف‌های

۲-۴- جداسازی نانو ذرات نقره

جهت جداسازی نانوذرات نقره، از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استفاده شد. بدین ترتیب که مایع قهوه‌ای حاوی نانوذرات نقره با استفاده از سیستم میلی پور مجهز به فیلتر ۰/۲۲ میکرون و پمپ وکیوم، صاف شده و مایع عبور داده شده، جمع‌آوری و در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد خشک شد. فرآیند فیلتراسیون برای دو روش (مایع رویی و توده سلولی) انجام شد؛ هنگام استفاده از توده سلولی، تولید نانو ذرات نقره بصورت خارج سلولی بوده و بعد از صاف کردن سوسپانسیون، نانوذرات نقره به لحاظ اندازه کوچکتر (نانومتر) به راحتی از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور کرده و قابلیت جداسازی داشتند.

۲-۵- شناسایی و تایید نانو ذرات نقره

۲-۵-۱- روش اسپکتوفتومتری UV-vis

نانوذرات نقره امواج الکترومغناطیسی را در ناحیه مرئی با طیف ۴۷۰-۴۳۰ نانومتر جذب می‌کنند. به دلیل تولید خارج سلولی نانوذرات نقره بوسیله باکتری، از محلول تغییر رنگ داده شده ۵۰ میکرولیتر در داخل کووت ریخته و ۲۵ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه شد و طیف سنجی در طول موج ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. از محلول بیومس به همراه نیترات نقره به عنوان بلانک (در زمان صفر قبل از شیک انکوباسیون) استفاده شد (۳۱).

۲-۵-۲- میکروسکوپ الکترونی

دو گرم از وزن خیس باکتری لاکتیک پس از سه بار شستشو با سرم فیزیولوژی استریل به همراه گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد به مدت ۱.۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. بعد از شستشو با بافر فسفات به همراه تتراسید اسمیوم ۱ درصد به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس از نمونه جامد تهیه شده یک برش ۱ تا ۲ میلی متری برداشته شد. مرحله آب‌گیری با درجات مختلف الکل انجام شده و سلول‌ها در مخلوط رزین و اکسید پروپیلن نگهداری و متعاقباً برای ۲ ساعت به محلول رزین خالص منتقل شدند. این ترکیب به مدت ۲ روز در اون با حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد

قرار گرفت. سپس برش‌های نازک ۷۰ نانومتری به وسیله اولترا میکروتوم صورت گرفته و با روش قطره‌ای بر روی گرید مسی میکروسکوپ SEM^۱ سوار شد و در نهایت تصویربرداری انجام گرفت (۱۴).

۲-۶- ارزیابی اثرات ضدباکتریایی (روش)

برای انجام مطالعات خواص ضد باکتریایی از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112)، باسیلوس سرئوس (PTCC 1015)، باسیلوس سوبتیلیس (PTCC 1023)، سودوموناس آئروژینوزا (PTCC 1074) و اشرشیا کلی (O157H7) که از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری گردید، استفاده شد. باکتری‌های مورد استفاده جزء باکتری‌های بیماری‌زای فرصت طلب بوده و عامل بیماری‌های مختلف و همچنین مسمومیت غذایی در انسان بوده و از طریق آب و مواد غذایی آلوده انتقال می‌یابند. در حقیقت برخی از آن‌ها جزء باکتری‌های Food born Pathogen می‌باشند. به منظور ارزیابی میزان فعالیت ضد میکروبی از روش انتشار در محیط آگار دار استفاده گردید. بدین ترتیب که ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های مورد مطالعه (حاوی $1/5 \times 10^8$ معادل نیم مک فارلند) بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. غلظت‌های مورد استفاده برای بررسی هاله عدم رشد در محیط آگار دار، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات نقره بوده که بعد از سونیکاسیون در فرکانس ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۳۰ دقیقه و تهیه سوسپانسیون هموزن، به چاهک‌های تعبیه شده در سطح محیط کشت (به قطر ۷ میلی میلی متر) اضافه شدند. از آمیکاسین و سیپروفلوکساسیلین بعنوان آنتی بیوتیک‌های شاهد استفاده گردید. از DMSO ۴ درصد نیز بعنوان نمونه کنترل استفاده شد. بعد از انکوباسیون نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه، قطر هاله‌های تشکیل شده در اطراف چاهک‌ها، بر حسب میلی متر اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایشات در این مرحله با ۳ تکرار انجام شد (۲۸). برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی MIC و کشندگی باکتری MBC از روش ماکرود

از نرم افزار SPSS 22، استفاده شد. تمام داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش و ارزیابی ها در ۳ تکرار انجام گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج باکتری

با انجام آزمایشات باکتری شناسی (کشت از ارگانهای داخلی مثل کبد، کلیه و قلب در محیط آگار دار مغذی) و انگل شناسی (نمونه برداری از سطح بدن، آبشش و محوطه داخلی) ماهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ارگانهای داخلی فاقد هرگونه باکتری بیمارزا بوده و هیچ گونه انگل پریاخته و تک یاخته از نمونه های مورد بررسی جدا نشد. همزمان با آزمایشات میکروب شناسی، دستگاه گوارش ماهی نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایشات شمارش کلی باکتری هادر نمونه های مورد بررسی لگاریتم $5/86 \pm 0/75$ در هر گرم از محتویات روده بود. میانگین تعداد باکتری های لاکتیک نیز لگاریتم $3/57 \pm 0/34$ از محتویات بوده و کلنی های رشد یافته ریز، سفید تا شیری، با قوام و دارای حاشیه صاف بودند. در مشاهدات میکروسکوپی باسیل های کوتاه و گرم مثبت نمایان بود. تست های اولیه جهت تایید لاکتوباسیلوس ها، آنزیم های کاتالاز و اکسیداز بوده که لاکتوباسیلوس ها فاقد آنزیم های مذکور بوده و اصطلاحاً کاتالاز و اکسیداز منفی می باشند. جهت ائید نهایی لاکتوباسیلوس ها خصوصاً پلاتناروم از تست های بیوشیمیایی اختصاصی طبق جداول ۱ و ۲ استفاده شد.

ایلویشن استفاده گردید. در ابتدا استوک نانو ذرات نقره تهیه شده بدین ترتیب که ۱ میلی گرم از نانوذره به ۱۰ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی اضافه شده و بعد از سونیکاسیون در فرکانس ۴۰ کیلو هرتز به مدت ۳۰ دقیقه، استوک اولیه آن که معادل ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر می باشد تهیه گردید. سپس رقت های سریال در لوله های مختلف به ترتیب ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد. پس از اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (معادل $1/5 \times 10^8$) و ۱ میلی لیتر از محیط کشت تریپتیک سوی براث به هریک از لوله ها، نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. گروه کنترل در این آزمایش شامل کنترل مثبت (محیط کشت فاقد سوسپانسیون نانوذره نقره، حاوی باکتری) و کنترل منفی (محیط کشت حاوی سوسپانسیون نانو ذره نقره و فاقد باکتری) نیز لحاظ شد. کمترین غلظتی از سوسپانسیون نانوذرات نقره که در آن کدورت مشاهده نشد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. از رقت های MIC و بیشتر از آن به میزان ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط تریپتیک سوی آگار کشت داده شده و پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، کمترین غلظتی که توانسته ۹۹.۹۹ درصد رشد باکتری را کاهش دهد به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج از طریق تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین ها به روش دانکن در سطح آماری ۵ درصد صورت گرفت. برای تجزیه تحلیل

جدول ۱- نتایج تخمیر قندها برای کلنی های مشکوک به لاکتوباسیلوس

تست کلنی	مانیتول	سوربیتول	تری هالوز	لاکتوز	فروکتوز	سلوبیوز	گزیلوز	مانوز	آرابینوز
۱	+	+	+	+	+	+	-	-	-
۲	+	+	+	+	+	+	-	+	+
۳	+	+	-	+	+	+	-	-	-

جدول ۲- نتایج تاثیر فاکتورهای مختلف بر رشد لاکتوباسیلوس ها

تست کلنی	رشد در pH=۹	رشد در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد	رشد در نمک ۶/۵ درصد	رشد در نمک ۲/۵ درصد	رشد در صفرا ۰/۵ درصد	رشد در صفرا ۰/۳ درصد	رشد در pH=۳/۵
۱	-	+	-	+	-	+	+
۲	-	+	+	+	ضعیف +	+	+
۳	-	+	-	+	-	+	+

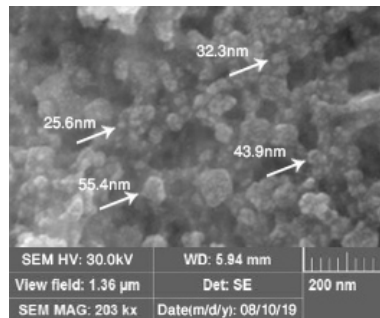
گرفته توسط Maghsoudy و همکاران (۱۹) در خصوص تولید نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه *Erodium cicutarium*، بالاترین طول موج قرائت شده برای نانو ذرات نقره ۴۲۰ نانومتر بوده که نتایج مطالعه حاضر بالاتر از آن می باشد. در مطالعه Mahmoud و همکاران (۲۰)، بیشترین طول موج برای نانوذرات نقره ۴۳۰ نانومتر بوده که کمتر از مطالعه حاضر بوده است. در مطالعه Begam (۲) در خصوص تولید نانو ذرات با استفاده از باکتریهای دریایی نیز طول موج ۴۲۰ برای نانوذرات نقره به ثبت رسیده است. نتایج میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که نانوذرات نقره تولید شده به صورت کروی منظم بوده ولی با این وجود اشکال دیگر نیز به صورت پراکنده مشاهده گردید. میانگین اندازه نانوذرات نقره بین ۴۵-۲۵ نانومتر بوده و ۸۰ درصد از نانوذرات تولید شده در این دامنه بودند (شکل ۱). در شکل میکروسکوپی نانو ذرات تولید شده مقداری تجمع ذرات مشاهده شده ولی با این وجود تماس مستقیمی بین ذرات وجود نداشته که این امر به دلیل پایداری نسبی آنها می باشد. پایداری نانوذرات تولید شده احتمالاً به دلیل تولید متابولیت های ثانویه با ماهیت پروتئینی از باکتری بوده که باعث پوشاندن نانوذرات شده و در نتیجه باعث پایداری آنها می شود. در مطالعه انجام شده توسط Begam (۲) حاکی از نتایج مشابه بوده و اندازه نانوذرات تولید شده زیر ۱۰۰ نانومتر بوده و بسته به نوع میکروارگانیسم مورد استفاده، نانوذرات تولید شده دامنه های متفاوت داشتند. شکل نانوذرات تولید شده در مطالعات مزبور کروی تا مکعبی بوده و بیشترین درصد مشاهده شده به این فرم ها اختصاص داشته است.

نتایج نشان داد که پس از مقایسه محصولات PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *recA* (مارکر ۱۰۰bp)، باند مشخصی در محدوده ۳۰۰bp (۳۰۰ جفت باز) تشکیل شده که تائید کننده لاکتوباسیلوس پلانتاروم می باشد. بنابراین، با توجه به نتایج حاصل از تست های بیوشیمیایی و تائید آن با آزمایشات مولکولی، کلنی شماره ۲ مربوط به لاکتوباسیلوس پلانتاروم بوده ولی کلنی های ۱ و ۳ متعلق به گونه های دیگر جنس لاکتوباسیلوس بوده اند (تصویر ۱).



شکل ۱- تشکیل باند ۳۰۰bp در ژل الکتروفورز و مقایسه آن با باند مارکر، تائید کننده لاکتوباسیلوس پلانتاروم

در ادامه برای تائید نانو ذرات نقره از دو روش اسپکتوفتومتری و میکروسکوپ الکترونی استفاده گردید. بیشترین جذب نوری برای نانو ذرات نقره در طول موج ۵۱۰ نانومتر مشاهده گردید. بالا بودن جذب نوری در طول موج مزبور تائید کننده تولید نانو ذرات نقره می باشد. در مطالعه انجام



شکل ۲- نانو ذرات نقره مشاهده شده با میکروسکوپ SEM در مایع رویی لاکتوباسیلوس پلاتناروم

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثرات مهار کننده دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات نقره استخراج شده از مایع رویی لاکتوباسیلوس پلاتناروم بر باکتری‌های زای شاخص در روش انتشار در محیط آگاردار

سطح معناداری	آماره F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع	باکتری شاخص
۰/۰۰۰	۶۸۲/۳۶	۱۱۹/۴۱۲	۴۷۷/۶۵۰	۴	تیمار	استافیلوکوکوس اورئوس
		۰/۱۷۵	۰/۸۷۵	۵	خطا	
			۴۷۸/۵۲۵	۹	کل	
۰/۰۰۰	۵۳۶/۲۵	۱۰۷/۲۵۰	۴۲۹	۴	تیمار	باسیلوس سرئوس
		۰/۲	۱	۵	خطا	
			۴۳۰	۹	کل	
۰/۰۰۰	۲۲۰/۶۱	۱۰۴/۷۸۷	۴۱۹/۱۵	۴	تیمار	باسیلوس سوبتیلیس
		۰/۴۷۵	۲/۳۷۵	۵	خطا	
			۴۲۱/۵۲۵	۹	کل	
۰/۰۰۰	۴۷۸/۰۷	۸۳/۶۶۲۵	۳۳۴/۶۵۰	۴	تیمار	سودوموناس آئروجینوزا
		۰/۱۷۵۰	۰/۸۷۵	۵	خطا	
			۳۳۵/۵۲۵	۹	کل	
۰/۰۰۰	۲۵۱/۰۲	۱۶۳/۱۶۲	۶۵۲/۶۵۰	۴	تیمار	اشرشیا کلی
		۰/۶۵	۳/۲۵	۵	خطا	
			۶۵۵/۹	۹	کل	

نتایج تجزیه واریانس اثرات مهار کننده دو غلظت از نانوذرات نقره استخراج شده از مایع رویی لاکتوباسیلوس پلاتناروم بر باکتری شاخص باسیلوس سرئوس در روش انتشار در محیط آگاردار در جدول ۳ آورده شده است. مطابق جدول اثرات مهار کننده دو غلظت از نانوذرات نقره استخراج شده از مایع رویی لاکتوباسیلوس پلاتناروم بر باکتری سودوموناس آئروجینوزا و شاخص اشرشیا کلی در روش انتشار در محیط آگاردار معنادار می باشد ($p < ۰/۰۱$).

مطابق جدول اثرات مهار کننده دو غلظت از نانوذرات نقره استخراج شده از مایع رویی لاکتوباسیلوس پلاتناروم بر باکتری شاخص باسیلوس سرئوس در روش انتشار در محیط آگاردار در جدول ۳ آورده شده است. مطابق جدول اثرات مهار کننده دو غلظت از نانوذرات نقره استخراج شده از مایع رویی لاکتوباسیلوس پلاتناروم بر باکتری شاخص باسیلوس سرئوس در روش انتشار در محیط آگاردار معنادار می باشد ($p < ۰/۰۱$).

جدول ۴- نتایج اثرات مهار کننده دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات نقره استخراج شده از مایع رویی لاکتوباسیلوس پلاتناروم بر باکتری های شاخص در روش انتشار در محیط آگاردار

تیمارها	استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس سرئوس	باسیلوس سوبتیلیس	سودوموناس آئروجینوزا	اشرشیا کلی
۵۰	۱۹ ± ۱/۵ ^c	۱۱/۵ ± ۵/۵ ^d	۱۵/۷۵ ± ۴/۶ ^d	۹/۵ ± ۳/۸۵ ^c	۱۲/۲۵ ± ۴/۳۵ ^c
۱۰۰	۲۴/۵ ± ۴ ^b	۱۴ ± ۳ ^c	۱۸/۷۵ ± ۱/۶ ^c	۱۲/۷۵ ± ۰/۶ ^b	۱۵/۵ ± ۱/۱ ^b
آمیکاسین	۲۹/۷۵ ± ۹/۲۵ ^a	۲۶/۵ ± ۹/۵ ^a	۳۰/۵ ± ۱۰/۱۵ ^a	۲۵/۷۵ ± ۱۰/۴ ^a	۳۲ ± ۱۵/۴ ^a
سیپروفلوکساسین	۱۹/۲۵ ± ۱/۲۵ ^c	۲۳ ± ۶ ^b	۲۴/۵ ± ۴/۱۵ ^b	۱۴ ± ۰/۶۵ ^b	۱۴/۷۵ ± ۱/۸۵ ^{bc}
نیترا نقره	۱۰ ± ۱۰/۵ ^d	۱۰ ± ۷ ^d	۱۲/۲۵ ± ۸/۱ ^d	۶/۷۵ ± ۶/۶ ^d	۸/۵ ± ۸/۱ ^d

*حروف متفاوت در هر ستون نشانگر اختلاف معنادار در سطح ۹۵ درصد بین تیمارها می باشد.

همان طور که ملاحظه شد تیمار آمیکاسین بیشترین تعداد و نیترا نقره و غلظت ۵۰ نانوذرات نقره کمترین تعداد باسیلوس سوبتیلیس را دارا می باشد. سلمانی و همکاران (۲۹) با بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات نقره علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی در محیط آزمایشگاهی نشان دادند حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری های اشرشیاکلی، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب در غلظت ۱۷۰۰، ۱۶۰۰، ۱۵۰۰ و ۱۶۰۰ میکروگرم در لیتر نانوذره نقره می باشد. همچنین، کمترین زمان مرگ را برای باکتری های باسیلوس سرئوس به مدت ۴ ساعت به دست آوردند. در مطالعه ای که توسط ملکوتیان و همکاران انجام شد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس گرم مثبت، نسبت به اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا گرم منفی در مقابل سه نانوذره، حساس تر بوده و در غلظت های کمتری از نانو ذرات نابود شدند (۳۵). مطابق با جدول ۴ بین تیمارها از لحاظ تعداد سودوموناس آئروژینوزا تفاوت معنادار وجود دارد. حروف متفاوت در این جدول نشانگر تفاوت معنادار ($p < 0.05$) بین تیمارها می باشد. همانطور که ملاحظه می شود تیمار آمیکاسین بیشترین تعداد و نیترا نقره نانوذرات نقره کمترین تعداد سودوموناس آئروژینوزا را دارا می باشند. باکتری سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی است که به عنوان یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی، به خصوص در زخم های تمیز بیماران عمل شده، می باشد (۱۲). این باکتری، روی پوست مرطوب و در روده ی افراد سالم نیز وجود دارد و در بیمارستان ها از

مطابق با جدول ۴ بین تیمارها از لحاظ تعداد باسیلوس سوبتیلیس تفاوت معنادار وجود دارد. حروف متفاوت در این جدول نشانگر تفاوت معنادار ($p < 0.05$) بین تیمارها می باشد. نتایج نشان داد در بین فلزات طبیعی یون های نقره دارای خواص ضد میکروبی شدیدی علیه بسیاری از گونه های باکتریایی به دلیل ویژگی ضد میکروبی فوق العاده ی نقره است (۱۷) و سمیت اندک یون های آزاد آن برای سلول های پستانداران، علاقه برای استفاده از این نانوذرات جهت کاربردهای غذایی در حال افزایش است (۳). چو و همکاران (۶) کمترین غلظت بازدارندگی نانوذرات نقره و نانو ذرات پلاتین را بر روی توقف استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا مطالعه کردند. همچنین روپلیریا و همکاران اثر نانوذرات نقره را علیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی بررسی کردند. و نشان دادند که آمیکاسین یک آنتی بیوتیک نیمه سنتتیک از رده D خانواده آمینو گلیکوزیدها می باشد که از استیلایسون کانامایسین A به همراه نمک سولفات به دست می آید (۱۰). در سال های گذشته کاملاً اثبات شده که نقره برای بسیاری از سلول های باکتریایی به عنوان ماده ای سمی است (۸). لیکن انواع دیگری از باکتری ها نه تنها در برابر نقره مقاومت دارند؛ بلکه می توانند به میزان ۲۵ درصد وزنی سلول زنده نقره را در دیواره خود جمع آوری کنند. این تجمع از سازوکارهای متفاوتی ناشی می شود که می توان به سیستم های انتشار به خارج، تغییر میزان انحلال و سمی بودن با تغییر حالت احیای یون فلزی، تشکیل کمپلکس های بیرون سلولی و رسوب فلز و عدم انتقال فلزی خاصی در سیستم مورد نظر اشاره نمود (۲۱)

غشای سلول‌ها می‌گذارند (۲۳). نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد مکانیسم مهار کنندگی نانو ذرات نقره به عملکرد بونهای نقره در محلول کلوتیدی بر می‌گردد. همچنین دگرگون ساختن میکروارگانسیم به وسیله تبدیل پیوندهای SH به SA-۲ صورت می‌گیرد. در این مکانیسم ذرات نانو نقره فلزی به مرور زمان یونهای نقره از خود ساطع می‌کنند. این یون‌ها طی واکنش جانشینی، باندهای SH را در جداره میکروارگانسیم به باندهای SA ۲ تبدیل کرده، که نتیجه آن از بین رفتن میکروارگانسیم است (۴). از طرفی، تولید و نگهداری نانو ذرات نقره احتمالاً خیلی ارزان تر و ساده تر از داروهای رایج است. همچنین نانو ذرات نقره می‌تواند جایگزین مناسبی برای درمان‌های روتین توسط آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (۷).

۳-۲- تعیین MIC و MBC:

نتایج آزمایشات MIC و MBC نانو ذرات نقره بر باکتری‌های شاخص در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن است که کمترین و بیشترین غلظت مهارکننده نانو ذرات نقره برای استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا به ترتیب ۲/۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و کمترین غلظت کشندگی نانو ذره نقره برای این دو باکتری به ترتیب ۱۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده که مشابه روش انتشار در محیط آگاردار حاکی از مقاومت بالای سودوموناس و حساسیت استافیلوکوکوس به غلظت‌های مورد استفاده نانو ذرات نقره بوده است.

جدول ۵- نتایج MIC و MBC نانو ذرات نقره استخراج شده از مایع رویی و توده سلولی لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر باکتری‌های شاخص در روش

ماکرو دایلوژن

MBC میکروگرم بر میلی‌لیتر	MIC میکروگرم بر میلی‌لیتر	مهار کنندگی باکتری
۱۰	۲/۵	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۰	۲/۵	
۱۰	۵	باسیلوس سرئوس
۱۰	۵	
۲۰	۱۰	باسیلوس سوبتیلیس
۲۰	۱۰	
۴۰	۲۰	سودوموناس آئروجینوزا
۴۰	۲۰	
۱۰	۵	اشرشیا کلی
۱۰	۵	

بطری‌های حاوی مواد آنتی‌سپتیک نیز جدا می‌شود. این باکتری منجر به پیدایش همه‌گیری‌های کوچک در شیرخوارگاه و بخش‌های مراقبت ویژه، به خصوص بخش‌های جراحی و سوختگی می‌گردد که در این بخش‌ها به عنوان اولین عامل عفونت‌های پوستی و سپتی‌سمی معرفی شده است. عفونت‌های جراحی و سوختگی با این باکتری ممکن است سپتی‌سمی، پنومونی، مننژیت و بیماری‌های کشنده‌ی دیگر را به دنبال داشته باشد (۱۸). مطابق با جدول ۴ بین تیمارها از لحاظ تعداد اشرشیا کلی تفاوت معنادار نشان داده شده است. حروف متفاوت در این جدول نشانگر تفاوت معنادار ($p < 0/05$) بین تیمارها می‌باشد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود تیمار آمیکاسین بیشترین تعداد و نیترات نقره نانو ذرات نقره کمترین تعداد اشرشیا کلی را دارا می‌باشند. با توجه به این نکته که *E. coli* در دسته باکتری‌های گرم منفی بوده و برای پذیرش نانوسیلورها با ممانعت بیشتری در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت مواجه می‌باشد، لذا دیرتر از باکتری‌های گرم مثبت به نانو ذرات پاسخ می‌دهد. در این مطالعه دلیل اثرات نانو ذرات نقره بر روی این باکتری گرم منفی با وجود مقاومت دیواره‌ای را می‌توان به کوچک بودن قطر یون‌های نقره و در نتیجه نفوذ پذیری بیشتر این نانو ذرات نسبت داد. مادگی و همکارانش (۲۲) نشان دادند تأثیرات نانو ذرات بر روی سلول‌های موجودات زنده به قطر، اندازه و شکل نانو ذرات بستگی دارد. نانو ذرات نقره به دلیل اندازه کمی که دارند، سطح تماس بیشتری با فضای بیرون داشته و تأثیر بیشتری بر

۴- نتیجه گیری

نتایج نشان داد اثرات مهار کننده دو غلظت از نانوذرات نقره استخراج شده از مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانناروم بر باکتری شاخص استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سوبتیلیس، اشرشیا کلی در روش انتشار در محیط آگاردار معنادار می باشد. نتایج اثرات مهار کننده دو غلظت از نانو ذرات نقره استخراج شده از مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانناروم بر باکتری شاخص استافیلوکوکوس اورئوس در روش انتشار در محیط آگاردار در سطح احتمال ۰/۰۱ معنادار بود. روند تغییرات در تمامی تیمارها بدین شکل بدست آمد که بیشترین مقدار مربوط به تیمار آمیکاسین و نیترات نقره کم ترین تعداد باکتری های شاخص را از خود نشان داد در ارزیابی اثرات ضد میکروبی مشخص گردید در بین باکتری های مورد بررسی استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروجینوزا به ترتیب حساس ترین و مقاوم ترین باکتری بوده و اشرشیا کلی و باسیلوس سرئوس ما بین این دو قرار داشتند باتوجه به اثرات ضد میکروبی نانو ذرات مذکور می توان از آنها به عنوان آلترناتیوهای بیولوژیک و نانو ذرات تولید شده دوستدار محیط زیست جهت کاهش آلاینده های میکروبی خصوصا باکتری های شاخص در آب استفاده کرد و به سلامت و امنیت غذایی جامعه کمک شایانی نمود.

۵- منابع

- Ahmad, A., Mukherjee, P., Mandal, D., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R. and Sastry, M. 2002. Enzyme mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus, *Fusarium oxysporum*. *Journal of the American Chemical Society*, 124(41): 12108-12109.
- Begam, J. N. 2016. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles (AgNPs) using marine bacteria against certain human pathogens. *Journal of Nasrin /International Journal of Advances in Scientific Research*, 2(7): 152-156.
- Bosetti, M., Masse, A., Tobin, E. and Cannas, M. 2002. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials*, 23(3): 887-92.
- Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J. J. and Hofmann, M. 2005. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. *Toxicological Sciences*, 88(2): 412-419.
- Cheng, H. R. and Jiang, N. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*, 28: 55-59.
- Cho, K. H., Park, J. E., Osaka, T. and Park, S. G. 2005. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Journal of Electrochimica Acta*, 51: 956-960.
- Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M. and Hofmann, T. 2008. Nanoparticles: Structure, Properties, Preparation and Behaviour in Environmental Media. *Ecotoxicology*, 17(5): 326-343.
- Dada, A. O., Adekola, F. A., Dada, F. E., Adelani-Akande, A. T., Bello, M. O., Okonkwo, C. R. and Adetunji, C. O. 2019. Silver nanoparticle synthesis by *Acalypha wilkesiana* extract: phytochemical screening, characterization, influence of operational parameters, and preliminary antibacterial testing. *Heliyon*, 5(10): e02517.
- El-Batal, A., Amin, M., Shehata, M. M. and Hallol, M. M. 2013. Synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus stearothermophilus* using gamma radiation and their antimicrobial activity. *World Applied Sciences Journal*, 22(1): 1-16.
- Goodman & Gilman's: Chapter 54: Aminoglycosides. 2011 *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Editors: L. L. Brunton, B. A. Chabner, B. C. Knollmann). 12 ed. New York: McGraw-Hill, pp. 1507-1517.
- Hoseynzadeh, A., Khaleghi, M. and Sasan, H. 2017. Investigating the Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles Synthesized by Bacteria Isolated from Agricultural Soils of Kerman, Iran. *Iranian Journal of*

- antimicrobial and nematicide. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1-9.
21. Mandal, D., Bolander, M. E., Mukhopadhyay, D., Sarkar, G. and Mukherjee, P. 2006. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(5): 485-492.
 22. Moudgi, B. M. and Roberts, S. M. 2006. Designing a Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part Nano-Interface in a Microfluidic Chip to Probe Living VI. Characterization of Nanoscale Particles for Cells: Challenges and Perspectives. *Toxicological Sciences USA*, 103: 6419-6424.
 23. Nakagawa, Y. K., Shimazu, M. and Ebihara, K. 1999. Nakagawa Aspergillus Niger Pneumonia with Fatal Pulmonary System. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 5(2): 97-100.
 24. Nanda, P. and Jagadeesh Babu, P. E. 2014. Isolation, screening and production studies of uricase producing bacteria from poultry sources. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 44(8): 811-821.
 25. Panacek, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolar, M., Veerová, R., Pizurova, N., Sharma, V. K., Tatjana, N. and Zboril, R. 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110: 16248-16253.
 26. Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J. L., Merrifield, D. L., Carnevali, O., Gioacchini, G., de Blas, I. and Ruiz Zarzuela, I. 2011. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 31: 196-201.
 27. Popoola, A. and Adebayo-Tayo, B. Ch. 2017. Biogenic synthesis and antimicrobial activity of silver nanoparticle using exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Journal of Nano Dimension*, 8(1): 61-69.
 12. Japani, A., Farshad, S. and Alborzi, A. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: Burn Infection, Treatment and Antibacterial Resistance. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 11(3): 244-253.
 13. Jianrong, Zh., Gao, L. and Minghai, Ch. 2006. SPS curing of high density antimony, tin-doped ceramic oxide. *Journal of Nanoparticles SOC*, 89:3874-3876.
 14. Kalimuthul, K., Babu, R. S., Venkataraman, D., Bilal, M. and Gurunathan, S. 2008. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 65(1): 150-153.
 15. Kalimuthu, K., Cha, B. S., Kim, S. and Park, K. S. 2020. Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Microchemical Journal*, 152: 104296.
 16. Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., Muthumary, J. and Srinivasan, K. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 79(3): 594-598.
 17. Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, J. P., Lee, H. J., et al. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol*, 3: 95-101.
 18. Lambert, P. A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95(41): 22-26.
 19. Maghsoudy, N., Aberoomand Azar, P. and Saber Tehrani, M. 2019. Biosynthesis of Ag and Fe nanoparticles using *Erodium cicutarium*; study, optimization, and modeling of the antibacterial properties using response surface methodology. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 9: 203-216.
 20. Mahmoud, W. M., Abdelmoneim, T. S. and Elazzazy, A. M. 2015. The impact of silver nanoparticles produced by *Bacillus pumilus* as

- D. C. 2016. Extracellular synthesis of silver and gold nanoparticles by *Sporosarcina koreensis* DC4 and their biological applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 86: 75-83.
33. Singh, R., Wagh, P., Wadhvani, S., Gaidhani, S., Kumbhar, A., Bellare, J., et al. 2013. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *International Journal of Nanomedicine*, 8: 4277.
34. Sreemanti, D., Das, J., Samadder, A., Bhattacharyya, S. S., Das, D. and Khuda, A. R. 2013. Biosynthesized silver nanoparticles by ethanolic extracts of *Phytolacca decandra*, *Gelsemium sempervirens*, *Hydrastis canadensis* and *Thuja occidentalis* induce differential cytotoxicity through G2/M arrest in A375 cells. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 101: 325-336.
35. Veisi Malekshahi, Z., Afshar, D., Ranjbar, R., Shirazi, M. H., Rezaei, F., Mahboobi, R., et al. 2012. Antimicrobial effect of Zinc Oxide nanoparticle. *Infection and Tropical Disease*, 17(59): 1-4.
28. Roomiani, L. 2012. Study of effect *Rosmarinus officinalis* and nisin on the growth of *Streptococcus iniae* in lab conditions and fillet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Thesis of Fisheries. Islamic Azad University. Science and Research Branch of Tehran.
29. Salmani, M. 2017. Survey of Silver Nanoparticles Antibacterial Activity Against Gram-Positive and Gram-negative Bacteria in Vitro. *The Journal of Toloo-e-behdasht*, 16(1): 74-84.
30. Saravanan, M., Vemu, A. K. and Barik, S. K. 2011. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles from *Bacillus megaterium* (NCIM 2326) and their antibacterial activity on multi drug resistant clinical pathog. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 88(1): 325-331.
31. Shiva Karkaj, U. A., Salavati, M., Sarvari, R. and Khadivi Derakhshan, F. 2011. Bioproduction of silver nanoparticles isolated by *Bacillus bacterium* isolated from Sungun copper mine. *Pazhohandeh (Research Journal of Shahid Beheshti University of Medical Sciences)*, 87: 142-147.
32. Singh, P., Singh, H., Kim, Y. J., Mathiyalagan, R., Wang, C. and Yang,

(Original Research Paper)

The Effect of Silver Nanoparticles Produced from *Lactobacillus plantarum* Supernatant on Pathogenic Bacteria

Ali Sardarian¹, Esmail Ataye Salehi^{2*}, Akram Arianfar², Reza Safari³

1-PhD Student of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

2- Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

3-Caspian Sea Ecology Research Center (CSERC), Iranian Fisheries science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran.

Received:03/09/2021

Accepted:29/09/2021

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of silver nanoparticles produced from *Lactobacillus plantarum* supernatant on pathogenic bacteria using supernatant of lactic acid bacteria obtained from the gastrointestinal tract of rainbow trout. The inhibitory effects of two concentrations (50 and 100 μ l) of silver nanoparticles extracted from *L. plantarum* supernatant on *Bacillus cereus* in agar medium are significant ($p < 0.05$). There is a significant difference between the treatments in terms of the number of *B. cereus*. Amikacin treatment had the highest number and silver nitrate and concentration of 50 silver nanoparticles had the lowest number of *B. cereus*. There is a significant difference between the treatments in terms of the number of *Pseudomonas aeruginosa* ($p < 0.05$). The inhibitory effects of two concentrations of silver nanoparticles extracted from *L. plantarum* supernatant on *Escherichia coli* index indicator are significant in the diffusion method in the agar medium ($p < 0.05$). There is a significant difference between the treatments in terms of the number of *E. coli* ($p < 0.05$). Silver nanoparticles had the lowest number of *E. coli*. However, by reducing the density of silver nanoparticles to concentrations of 500 and 100 μ g / ml, antibacterial activity against *B. cereus* and *Ceracia marcescens*, respectively, is observed. The average size of nanoparticles produced is between 25-45 nm and 80% of nanoparticles produced. They were in this range.

Keywords: Silver Nanoparticles, Supernatant, *Lactobacillus Plantarum*, Pathogenic Bacteria.

*Correspondence Author: eatayesalehi@yahoo.com