

استفاده از اگزوپلی ساکاریدهای ریز جلبک در سنتز سبز نانوذرات طلا و نقره و ارزیابی فعالیت ضد باکتری آن‌ها

محمد ملکی^۱، علیرضا صلابت^{۱*} و مجید مهدیه^۲

۱- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

چکیده

در این کار پژوهشی، برای نخستین بار نانوذرات طلا و نقره، با استفاده از اگزوپلی ساکارید استخراج شده از محیط کشت ریزجلبک پورفیریدیوم پورپورئوم، با موفقیت سنتز شدند و سپس فعالیت ضدباکتری آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش اگزوپلی- ساکارید افزون بر احیای یون‌های فلزی طلا و نقره نقش پایدارسازی نانوذرات سنتز شده در محلول آبی را نیز به عهده دارند. به منظور تایید تشکیل نانوذرات سنتز شده از طیف سنجی مرئی-فرابنفش استفاده شد. همچنین، به منظور تعیین اندازه و ریخت-شناسی نانوذرات سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. در پایان، خواص ضدباکتری نانوذرات سنتز شده، بر روی دو نوع باکتری گرم مثبت انتروکوکوس فکالیس و باکتری گرم منفی اشیریشیا کلی، مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، از آزمون دیسک دیفیوژن استفاده شد که در نتیجه آن مشخص شد این نانوذرات پایدار شده فعالیت ضدباکتری قابل توجهی دارند. همچنین نانوذرات نقره پایدار شده با اگزوپلی ساکارید فعالیت ضدباکتری بهتری نسبت به نانوذرات طلای پایدار شده با اگزوپلی ساکارید از خود نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: اگزوپلی ساکارید، ریزجلبک، سنتز سبز، ضدباکتری، نانوذرات طلا، نانوذرات نقره

ایمیل نویسنده مسئول: a-salabat@araku.ac.ir

۱-مقدمه

امروزه نانوذرات به دلیل خواص ویژه‌ای که دارند بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. این خواص ویژه باعث شده تا از نانوذرات در طیف وسیعی از زمینه‌ها از جمله فرایندهای کاتالیزتی و فوتوکاتالیزتی، دارورسانی، تصفیه آب و پساب، صنایع نفت و گاز، آرایشی بهداشتی، پزشکی و ... استفاده شود. در ابعاد نانومتری افزایش سطح، واکنش‌پذیری نانوذرات را به شدت افزایش می‌دهد و بر تعاملات آن با دیگر مواد اثر می‌گذارد [۱]. یکی از پرکاربردترین نانوذرات شناخته شده، نانوذرات طلا هستند. نانوذرات طلا ضمن داشتن خواص منحصر به فرد شیمیایی و فیزیکی در مطالعات ایمونوشیمیایی برای شناسایی فعل و انفعالات پروتئین استفاده می‌شود. همچنین از آن‌ها به عنوان ردیاب آزمایشگاهی در اثر انگشت و نیز برای تشخیص وجود DNA در یک نمونه مورد استفاده قرار می‌گیرد. از نانوذرات طلا برای تشخیص آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید مانند استرپتومایسین، جنتامایسین و نئومایسین استفاده می‌شود. از نانومیل‌های طلا برای شناسایی و از بین بردن

سلول‌های سرطانی و شناسایی رده‌های مختلف باکتری نیز استفاده می‌شود [۲].

از زمان‌های گذشته تا به امروز، نقره به علت فعالیت ضدباکتریایی خود مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. در واقع اتصال این ذرات به پروتئین‌های حاوی گوگرد در سطح غشای باکتری‌ها، تغییر در ریخت‌شناسی و زنجیره تنفسی باکتری را فراهم کرده و در نهایت با اثرگذاری برفراند مرگ سلولی منجر به مرگ عامل بیگانه می‌شود. نکته مهمی که وجود دارد آن است که باکتری‌ها نسبت به این ذرات مقاومت پیدا نمی‌کنند، بنابراین اثرگذاری بر طیف وسیعی از باکتری‌ها میسر خواهد بود. بنابراین از این ویژگی در چسب زخم‌ها، پانسمان زخم، پمادهای زخم‌های پوستی، ضدعفونی‌کننده‌ها و پوشش‌های ابزار پزشکی استفاده می‌شود. همچنین، بررسی‌های اخیر نشان داده است که استفاده از نانوذرات نقره در پمادهای پوستی سبب نفوذ نقره به بستر زخم، جذب به‌وسیله سلول‌های اپیدرمال حاشیه زخم، تجمع در بقایای زخم و در نهایت انتقال

گونه‌های شیمیایی اضافی به عنوان یک عامل پایدار کننده جلوگیری می‌شود زیرا مولکول‌های زیستی تولید شده توسط سلول‌ها، کلونید پایدار ایجاد می‌کنند. اگرچه تکنیک‌های بیوسنتز جلبکی، سبز و سازگار با محیط‌زیست هستند و خطر سمیت کمی دارند، اما دارای محدودیت‌های اندکی نیز هستند. این فرایند به صورت سینتیک در مقایسه با کاهش مواد شیمیایی، به طور معمول کندتر است [۷]. افزون بر این، پایدار ماندن نانوکلوئید تهیه شده نیز اغلب موضوعی است که نیاز به توجه دارد، زیرا در موارد خاص سطح بالای تجمع مشاهده شده است.

زنجیره‌های بلند از مولکول‌های کربوهیدرات‌ها به ویژه کربوهیدرات‌های پلیمری متشکل از مونوساکاریدهایی که از طریق ایجاد پیوندهای گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده‌اند را پلی ساکارید می‌گویند. این نوع ترکیبات از نظر تنوع ساختمانی ممکن، به خصوص در اندازه زنجیر و شاخه‌ها به زنجیرهای آلکنی شباهت داشته و قابل مقایسه هستند. سلولز، نشاسته و گلیکوژن سه مورد از فراوان‌ترین نوع پلی‌ساکاریدها هستند که از تکپارهای گلوکز تشکیل شده‌اند. اگزوپلی‌ساکاریدهای میکروبی زیست‌بسیاررهای هستند که توسط سلول‌های میکروبی به محیط خارج سلول تولید و ترشح می‌شوند و یک کپسول یا لجن را به آرامی به سطح سلول متصل می‌کنند [۱۰]. این ترکیبات می‌توانند بسیاررهای محلول یا نامحلول باشند که در محیط اطراف آزاد می‌شوند و در خارج از سلول‌ها تجمع می‌یابند. بنابراین آن‌ها می‌توانند، به سطح سلول میکروبی متصل باشند یا درون محیط کشت وجود داشته باشند [۱۱]. سنتز اگزوپلی‌ساکاریدهای میکروبی برای سلول‌های میکروبی مهم است زیرا اگزوپلی‌ساکاریدهای میکروبی نقش حیاتی مهمی در بقای سلول‌های میکروبی دارند [۱۲]. گروه‌های مختلفی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها و ریز جلبک‌ها وجود دارند که می‌توانند اگزوپلی‌ساکاریدهای میکروبی را تولید کنند [۱۳]. برخی از اگزوپلی‌ساکاریدهای میکروبی مورد مطالعه که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند عبارتند از زانتان، دکستران، آلژینات، ژلان، لوان، سلولز، کوردلان، پولولان و ... [۱۴]. مشخص شده است نیروهای جاذبه الکترواستاتیک بین گروه‌های عاملی موجود در ساختار اگزوپلی‌ساکارید و نمک فلزی باعث پایداری و سپس کاهش یون‌های فلزی به هسته‌های فلزی و رشد آنها و در نهایت پایداری نانوذرات پوشانده شده توسط اگزوپلی-ساکاریدها می‌شود [۴].

به سیستم گردش خون محیطی می‌شود و به فرایند ترمیم زخم و جلوگیری از عفونت کمک می‌کند [۳].

اگرچه روش‌های ساخت نانو مواد متنوع هستند، اما روش سنتز شیمیایی برای تهیه نانوذرات فلزی، نانو فیلم‌ها، فولرن‌ها، نانولوله‌ها، نقاط کوانتومی و ... به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود [۴]. در عین حال ایجاد فرایندی قابل اطمینان و سازگار با محیط‌زیست برای سنتز نانوذرات فلزی بسیار حائز اهمیت است. یکی از اقدامات جدید در تهیه و سنتز نانوذرات، استفاده از روش‌های سنتز سبز و یا همان بیوسنتز است. در این راستا طی چند سال گذشته، از گیاهان، جلبک‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها برای تولید نانوذرات فلزی با مصرف انرژی کمتر، هزینه کمتر و استفاده از مواد غیرسمی استفاده شده است [۵]. به عبارت دیگر یک زیست‌توده گیاهی می‌تواند جایگزینی برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی برای سنتز نانوذرات به روشی سازگار با محیط‌زیست باشد. مشخص شده است گیاهان مختلف می‌توانند بدون آنکه منجر به بوجود آمدن آسیب‌های زیست‌محیطی گردند، به طور گسترده در این زمینه مورد استفاده قرار گیرند. در عمل از متابولیت‌های گیاهی معمولاً در این روش‌های مصنوعی به صورت عصاره‌های آب غلیظ میوه، دانه‌ها و برگ‌ها با سطح بالایی از پلی فنل‌های آنتی‌اکسیدان استفاده می‌شوند [۶].

جلبک‌ها موجودات تک سلولی یا چند سلولی هستند که در محیط‌های مختلف مانند آب شیرین، سطوح مرطوب و آب‌های دریایی یافت می‌شوند. آن‌ها یا میکروسکوپی (ریزجلبک) و تک‌سلولی هستند، یا ماکروسکوپی (ماکروجلبک) و پرسلولی هستند [۷]. جلبک‌ها در چهار حوزه مختلف باکتری‌ها، گیاهان زراعی، کرومیستا و تک‌سلولی طبقه‌بندی می‌شوند. به طور کلی، آن‌ها ۱۵ رسته را تشکیل می‌دهند. بیش از نیمی از این رسته‌ها به دلیل توانایی آن‌ها در کمک به بیوسنتز نانوذرات، که یک زمینه جدید و در حال توسعه است، گزارش شده‌اند. در سال ۲۰۰۷، نخستین پژوهش در استفاده از جلبک *Chlorella vulgaris* جهت تهیه سبز نانوذرات طلا گزارش شد [۸]. به طور معمول، یک گونه جلبکی با تجمع کاتیون‌ها یک فلز در ماتریس سلولی خود و متعاقباً کاهش آن‌ها، نانوذرات را سنتز می‌کند. ادعا می‌شود که فرایندهای زیست‌پالایی، پیش زمینه بیوسنتز نانوذرات با استفاده از منابع جلبکی هستند [۷]. جلبک‌ها منبع ارزشمندی از مولکول‌های زیست‌فعال هستند و وجود این مولکول‌ها می‌تواند به طور بالقوه باعث افزایش خواص دارویی نانوذرات نیز شود که در برخی از جلبک‌های دریایی گزارش شده است [۹]. از طرف دیگر، در این روش، از به کار بردن

در سال ۲۰۱۴، نانوذرات طلا با استفاده از زانتان، به طور موفقیت آمیز سنتز و سایز نانوذرات به دست آمده بین ۱۵ تا ۲۰ نانومتر اندازه گیری شد [۱۵]. مورفولوژی نانوذرات طلای بدست آمده با این روش کروی بوده و خواص بیولوژیکی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، گروه تحقیقاتی دیگری، با استفاده از سنتز سبز، نانوذرات نقره را سنتز کردند. در کار پژوهشی آنها از اگزوپلی ساکارید باکتریایی زانتان استفاده شد و نانوذرات نقره با اندازه ۵ تا ۴۰ نانومتر و مورفولوژی کروی، با موفقیت سنتز شد و اثر ضدباکتریایی و کاتالستی نانوذرات به دست آمده مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۶]. در سال ۲۰۱۹ از اگزوپلی ساکاریدهای حاصل از ریزجلبکهای سبز برای سنتز نانوذرات نقره به صورت موفقیت آمیز استفاده شد و اثر احیا-کنندگی و پایدارکنندگی نانوذرات کلوئیدی نقره را به اثبات رساندند [۱۷]. در سال ۲۰۲۱، نیز از این دسته اگزوپلی ساکارید استخراج شده برای سنتز و پایداری کلوئید نانوذرات طلا استفاده شد [۱۸].

در ادامه، کارهای تحقیقاتی انجام شده در آزمایشگاه تحقیقاتی شیمی فیزیک دانشگاه اراک در خصوص سنتز نانوذرات به روشهای شیمیایی و فیزیکی [۱۹-۲۱]، در تحقیق حاضر برای نخستین بار با استفاده از اگزوپلی ساکاریدهای به دست آمده از ریزجلبک پورفیریدوم پورپروئوم (که از شاخه ریزجلبکهای قرمز با خواص منحصر به فرد هستند)، نانوذرات طلا و نقره سنتز شده و پس از شناسایی آنها اثر ضدباکتری این نانوذرات روی دو نوع باکتری گرم مثبت و گرم منفی مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- بخش تجربی

۱-۲ - مواد شیمیایی

نیتрат نقره ($AgNO_3$) به عنوان منبع تهیه نانوذرات نقره و کلروآریک اسید ($HAuCl_4$) به عنوان منبع نانوذرات طلا از شرکت سیگما آلد ریچ خریداری شدند. حلالها، معرفها و مواد شیمیایی دیگر مورد استفاده از جمله پولولان (پلی ساکارید قارچ) با درجه خلوص بالا و از شرکت مرک تهیه شدند. غشاء دیالیز با مشخصات 12400 MWCO از شرکت سیگما آلد ریچ تهیه شد. در کلیه آزمایشها از آب دوبار تقطیر یون زدایی شده استفاده شد.

۲-۲- استخراج اگزوپلی ساکارید از محیط کشت ریزجلبک

ابتدا، محیط کشت ریزجلبک از گروه زیست شناسی دانشگاه اراک تهیه شد. محیط کشت حاوی سلولهای ریزجلبک،

رنگدانههای قرمز تولید شده با آن، پروتئینها، اگزوپلی ساکاریدها، نمکهای که برای رشد و استفاده ریزجلبک در آن حل شده و سایر موادی است که ریز جلیک حین رشد و فعالیت خود تولید می کند. به منظور جداسازی سلولهای ریز جلیک و ذرات نامحلول موجود در محیط کشت ریز جلیک، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول صورتی رنگ فوقانی (حدود ۴۰ میلی لیتر) که حاوی اگزوپلی ساکارید است از رسوب که شامل سلولهای مرده و ذرات جامد نامحلول همراه آن است جدا شد (شکل ۱-الف پیوست). این محلول که شامل اگزوپلی ساکارید و سایر مواد محلول در محیط کشت ریز جلیک است در یک بشر به صورت کنترل شده تا دما ۸۰ درجه سلسیوس حرارت داده شده و به منظور غیرفعال سازی آنزیمهایی که ممکن است باعث تجزیه اگزوپلی ساکارید در مراحل خالص سازی آن شوند، محلول به مدت ۱ ساعت در این دما نگهداری شد. دمای محلول را به دمای محیط رسانده و به آن ۶۰ میلی لیتر اتانول ۹۹ درصد با دمای ۴ درجه سلسیوس اضافه شد. اتانول به منظور رنگدانه زدایی و چربی زدایی و همچنین غیرفعال سازی آنزیمها، استفاده می شود. پس از افزودن اتانول، محلول به مدت ۲۴ ساعت در یخچال و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. این سیستم به صورت یک فاز معلق (B) و یک رسوب (A) که از هم جدا شده اند در می آید (شکل ۱-ب پیوست). به دلیل این که در اثر افزودن اتانول به سیستم، پروتئین همزمان با پلی ساکارید رسوب می کند، این دو فاز تعلیق (لخته) و رسوب برای شناسایی پروتئین و پلی-ساکارید، به طور جداگانه جمع آوری شدند. پس از جدا کردن فاز شناور، رسوب موجود در انتهای ظرف نیز با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس و به مدت ۲۰ دقیقه جداسازی شد. هر دو نمونه به طور جداگانه ۳ مرتبه با اتانول ۸۵ درصد شستشو و سپس، سانتریفیوژ شدند. در ادامه فرایند، رسوبات به دست آمده از هر دو فاز به طور جداگانه روی شیشه ساعت و در دسیکاتور قرار داده شدند تا در دمای محیط خشک شوند. دو جامد سفید رنگ به دست آمده، با استفاده از معرف برادفورد برای تعیین مقدار پروتئین و همچنین، تست فنول- سولفوریک اسید به منظور تعیین میزان پلی ساکارید مورد آنالیز قرار گرفتند. براساس نتایج به دست آمده از این دو روش، فاز شناور حاوی اگزوپلی ساکارید بسیار بیشتری نسبت به فاز رسوب بود. همچنین، میزان پروتئین در فاز رسوب بسیار بیشتر بدست آمد. به طور کلی می توان نتیجه گرفت فاز شناور، اگزوپلی ساکارید بیشتری دارد. به این ترتیب در

غلظت ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر داخل ظرف واکنش ریخته شد. با استفاده از NaOH (۰/۰۱ مولار)، pH محلول به ۹ رسانده شد تا شرایط لازم برای سنتز نانوذرات نقره ایجاد شود. ظرف حاوی محلول مورد نظر در دمای کنترل شده ۹۰ درجه سلسیوس تحت هم زدن شدید قرار گرفت. سپس با استفاده از بورت، ۲/۵ میلی لیتر نیترات نقره (۳ میلی مولار) به صورت قطره قطره در مدت زمان ۱۰ دقیقه به محلول در حال هم خوردن افزوده شد. پس از ۱۰ دقیقه رنگ محلول به رنگ زرد تغییر پیدا کرد و به تدریج پررنگ تر شده و به رنگ قهوه ای متمایل شد. عکس یک نمونه از کلونید نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از اگزوپلی ساکارید در شکل ۲-ب پیوست نشان داده شده است. پس از ۳۰ دقیقه از شروع واکنش نمونه کلونید حاصل با استفاده از دستگاه UV-Vis مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین، از نمونه تهیه شده تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری تهیه شد.

۵-۲- تست ضد باکتری به روش دیسک دیفیوژن

برای انجام تست ضدباکتری، ۲ نوع باکتری از گروه زیست شناسی دانشگاه اراک دریافت شد. یک نوع باکتری گرم مثبت به نام انتروکوکوس فکالیس و یک نوع باکتری گرم منفی به نام اشیریشیا کلی برای انجام تست به روش انتشار مستقیم دیسک (Disc Diffusion) یا همان آزمون آگار مورد استفاده قرار گرفتند [۲۳]. همه وسایل مورد استفاده در این مرحله در دستگاه اتوکلاو به مدت ۱/۵ ساعت استریل شدند. ابتدا ۵/۶ گرم از پودر آگار در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر در درون یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری حل شد. سپس به مقدار نیاز از محلول به دست آمده به ظروف پتری اضافه شد. به محلول ها زمان داده شد تا ژله ای شده و آماده کشت باکتری شوند. سپس ظروف پتری حاوی محیط کشت آماده، در یخچال قرار داده شدند تا در زمان نیاز از آن ها استفاده شود. در کنار شعله، ابتدا با استفاده از گوش پاک کن های استریل شده، باکتری ها روی آگارها در ظروف پتری به روش کشت مزرعه ای کشت داده شدند. سپس، دیسک های آغشته شده به نانوذرات با غلظت های مختلف، با استفاده از پنس استریل شده، روی محیط کشت باکتری ها قرار گرفتند. برای نانوذرات طلا و نقره، سه غلظت متفاوت (۴۰۰ و ۲۰۰ و ۱۰۰ ppm) تست شد. این آزمایش برای هر دو نوع باکتری انجام و با یکدیگر مقایسه شدند. در همه ظروف پتری از دیسک آغشته به اگزوپلی ساکارید دیالیز شده به عنوان کنترل (شاهد) هم استفاده شد. در تمامی ظروف پتری از نانوذرات سنتز شده به وسیله اگزوپلی ساکارید ریزجلبک دیالیز شده

آزمایش های تکمیلی برای سنتز نانوذرات از اگزوپلی ساکارید حاصل از فاز شناور استفاده شد.

اگزوپلی ساکارید استخراج شده به صورت خشک شده برای استفاده های بعدی در دمای اتاق نگهداری شد. شایان ذکر است که به منظور بررسی اثر نحوه خشک کردن اگزوپلی ساکارید، یک نمونه از فاز شناور نیز با دستگاه فریزدرایر خشک و آماده سازی شد. علاوه بر نمونه های فوق، نمونه اگزوپلی ساکارید دیگری با استفاده از ریزجلبک جوان بدست آمد (C). در حقیقت این ریزجلبک کشت تازه (معمولاً دو هفته ای) است. طبیعتاً میزان پلی ساکارید و ترکیب شیمیایی آن با گذشت زمان تغییر می یابد، بنابراین، استفاده از آن برای مقایسه نتایج می تواند مفید باشد. لازم به ذکر است به منظور بررسی اثر حضور یون های مختلف در نمونه های اگزوپلی ساکاریدها بر سنتز نانوذرات و همچنین، برای جلوگیری از رسوب AgCl در تهیه نانوذرات نقره، یون های موجود در نمونه ها به روش غشای دیالیز جداسازی شدند.

۳-۲- سنتز نانوذرات طلا

در ادامه، نانوذرات طلا با استفاده از اگزوپلی ساکارید های حاصل به عنوان عوامل احیا کننده و نیز پایدار کننده به روش زیر تهیه شدند. لازم به یادآوری است علاوه بر سه نوع اگزوپلی ساکاریدی که روش تهیه آن ها پیش تر ارائه شد، از پولولان (پلی ساکارید قارچ) هم به عنوان شاهد استفاده شد. ۴ میلی لیتر محلول آبی اگزوپلی ساکارید تهیه شده در قسمت قبل با غلظت ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر، با ۱ میلی لیتر HAuCl_4 ۰/۰۰۱ مولار مخلوط شد. مخلوط حاصل در دمای کنترل شده ۱۰۰ درجه سلسیوس و تحت هم خوردن شدید قرار گرفت. با گذشت ۱۵ دقیقه از شروع واکنش، رنگ محلول شروع به تغییر کرده و به رنگ قرمز روشن تغییر نمود. سپس مدت زمان ۳۰ دقیقه به محلول فرصت داده شد تا احیا تا حد ممکن انجام پذیرد. عکس یک نمونه از کلونید نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از اگزوپلی ساکارید در شکل ۲-الف پیوست نشان داده شده است. محصول به دست آمده با استفاده از طیف سنجی UV-Vis و میکروسکوپ الکترونی عبوری آنالیز شد.

۴-۲- سنتز نانوذرات نقره

نانوذرات نقره با استفاده از سه نوع اگزوپلی ساکارید که روش های تهیه متفاوت داشته اند و پولولان به عنوان شاهد، سنتز شدند. ابتدا ۳ میلی لیتر از اگزوپلی ساکارید دیالیز شده با

استفاده شد. پس از کشت دادن باکتری‌ها و بارگزاری دیسک‌های نمونه بر روی آن‌ها، ظروف پتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، در درون انکوباتور نگهداری شده تا باکتری‌ها بتوانند رشد کنند و خواص ضدباکتری قابل بررسی باشد [۲۴].

۳- تجزیه و تحلیل نتایج

میزان پروتئین موجود در نمونه‌های A و B به طور کیفی با استفاده از معرف برادفورد تعیین شد و مقدار پروتئین براساس تغییر رنگ محلول‌ها به رنگ آبی مشخص شد [۲۳]. نتایج حاصل نشان داد که میزان پروتئین موجود در نمونه A بسیار بیشتر از نمونه B است و مقدار بسیار کمی پروتئین در نمونه B وجود دارد. در حقیقت معرف برادفورد یک محلول اسیدی کوماسی بلو G-250 است و بنابراین به رنگ قهوه ای می باشد. اتصال رنگ کوماسی بلو G-250 به پروتئین منجر به تولید رنگ آبی می‌شود. میزان تغییر رنگ از قهوه ای به آبی نسبت مستقیمی با غلظت پروتئین دارد [۲۶].

تست فنول- سولفوریک اسید برای تعیین میزان قند کل نمونه- ها، انجام شد. در طی انجام این تست، اضافه کردن سولفوریک اسید غلیظ به نمونه سبب تجزیه شدن همه پلی‌ساکاریدها، الیگوساکاریدها و دی‌ساکاریدها به مونوساکاریدهای تشکیل دهنده آن‌ها می‌شود. سپس با افزودن فنول، مونوساکاریدهای ایجاد شده با فنول واکنش داده و رنگ محلول به نارنجی تغییر می‌کند. به صورت کیفی می‌توان با توجه به میزان تغییر رنگ محلول، میزان پلی‌ساکارید موجود در محلول را تشخیص داد. بر اساس نتایج بدست آمده از طریق مشاهده رنگ ظاهری نمونه- ها (شکل ۳ پیوست)، نمونه B دارای بیشترین مقدار پلی- ساکارید است که بر اساس این نتیجه و نتیجه تست تعیین میزان پروتئین، در سنتز نانو ذرات از این نمونه استفاده شد. از میان نمونه‌های A و C، مشخص شد نمونه C پلی‌ساکارید بیشتری دارد.

از نمونه‌ها پس از انجام تست فنول- سولفوریک اسید، طیف UV-Vis تهیه شد که نتیجه گیری بالا را تایید می‌کند. به طور کلی بر اساس نتایج حاصل از طیف سنجی UV-Vis می‌توان نوع مونوساکاریدهای موجود در ساختار پلی‌ساکارید را از طریق تعیین طول موج ماکزیم جذب تشخیص داد [۲۷]. بر اساس طیف UV-Vis تهیه شده از نمونه‌ها، که در شکل ۴ پیوست آورده شده است، پس از انجام تست فنول- سولفوریک اسید، نمونه B دارای ماکزیم جذب در طول موج بین ۴۹۰-

۴۸۰ نانومتر است و پس از آن نمونه C جذب بیشتری از نمونه A در محدوده ۴۹۰-۴۸۰ نانومتر نشان داد [۲۸]. این موضوع نشان می‌دهد میزان پلی‌ساکارید در نمونه B بیشتر از C و در نمونه C بیشتر از A است و برای ادامه تحقیق، در سنتز نانوذرات بهترین اگزوپلی‌ساکارید حاصل از نمونه B یعنی فاز شناور است.

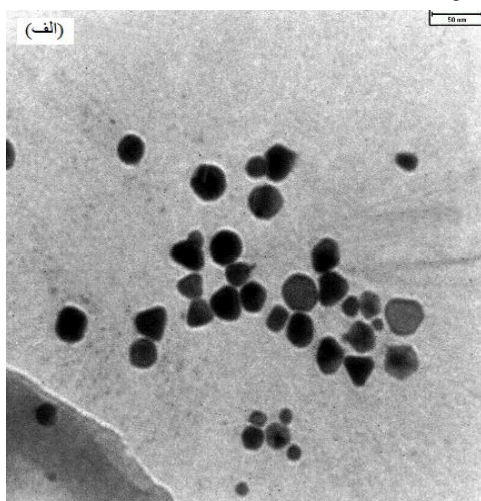
۳-۱- نتایج حاصل از تهیه نانوکلوئیدهای طلا

بر اساس روش ذکر شده در بخش تجربی پس از استخراج و شناسایی اگزوپلی ساکریدها از فاز شناور (B) برای سنتز و پایداری نانوذرات طلا و نقره استفاده شد. در قدم اول پس از تهیه نانوذرات از طیف UV-Vis برای تایید و شناسایی آنها استفاده شد. یکی از ساده‌ترین روش‌های شناسایی نانوذرات کلوئیدی، استفاده از طیف سنجی UV-Vis و تعیین پلاسمون رزونانس سطحی ذرات فلزی است. پلاسمون سطحی به شکل، اندازه و ترکیب شیمیایی سطح ذره فلزی وابسته است. بنابراین، می‌توان با بررسی جابه‌جایی پیک‌ها در طیف UV-Vis در مورد اندازه ذرات اظهار نظر نمود. هر چه پیک به سمت طول موج های بیشتر جابه‌جا شده باشد نشان دهنده اندازه ذرات بزرگ‌تر است و هرچه پیک به سمت طول موج‌های کوچک‌تر جابه‌جا شده باشد، نشان دهنده اندازه ذرات کوچک‌تر است. به عبارت دیگر میان طول موج ماکزیم جذب و اندازه ذرات رابطه مستقیم وجود دارد [۲۹]. از طریق بررسی میزان جذب هم می‌توان غلظت نانوذرات تشکیل شده را بررسی کرد که با توجه به شرایط یکسان سنتز نانوذرات، می‌توان قدرت احیاکنندگی اگزوپلی‌ساکاریدها را با یکدیگر مقایسه نمود. همچنین از طریق سرعت و زمان انجام واکنش هم می‌توان قدرت احیاکنندگی اگزوپلی‌ساکاریدهای استفاده شده را با یکدیگر مقایسه نمود.

به این ترتیب، سه نمونه اگزوپلی‌ساکارید (که از فاز شناور B بدست آمد) برای مرحله تهیه نانوذرات طلا آماده شد. نمونه ۱: محصول اگزوپلی‌ساکارید ریزجلبک دیالیز نشده و با فریزدرایر خشک شده. نمونه ۲: محصول اگزوپلی‌ساکارید ریزجلبک دیالیز نشده و در دمای محیط خشک شده. نمونه ۳: محصول اگزوپلی‌ساکارید ریزجلبک دیالیز شده و در دمای محیط خشک شده. نمونه ۴: پولولان.

در شکل ۱، طیف UV-Vis نانوذرات طلای سنتز شده توسط پلی ساکریدهای متفاوت (نمونه‌های ۱ تا ۴) با یکدیگر مقایسه شده است. طیف‌های مشخص شده مربوط به نمونه‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب در طول موج‌های ۵۴۰، ۵۴۲/۵ و ۵۳۳ نانومتر دارای

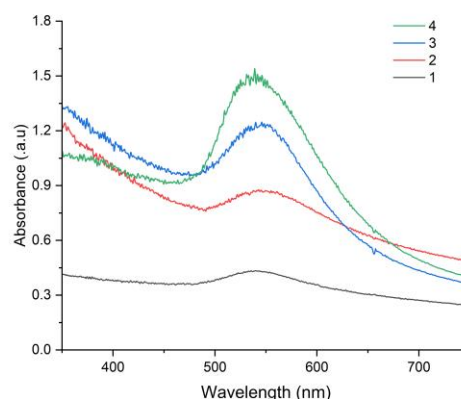
ریخت‌شناسی نانوذرات، بیشتر از نوع کروی است. علاوه بر این نمودار توزیع اندازه نانوذرات طلا نشان می‌دهد توزیع نسبتاً مناسب و ذرات با اندازه‌های بین ۱۰ تا ۴۰ نانومتر وجود دارند (شکل ۲-ب). بر اساس این نمودار میانگین اندازه ذرات حدود ۳۰ نانومتر تخمین زده می‌شود که با نتایج حاصل از UV-Vis در توافق است.



شکل ۲. (الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانوذرات طلا و (ب) نمودار توزیع اندازه نانوذرات طلا

بررسی پایداری نانوکلوئیدهای طلای سنتز شده از طریق مشاهده مستقیم در طی یک دوره زمانی انجام شد. به دلیل سطح زیاد نانوذرات تمایل زیادی به تجمع و کلوخه شدن برای کاهش انرژی سطحی خود دارند. از این رو برای جلوگیری از کلوخه شدن نانوذرات، از یک عامل پایدارکننده استفاده می‌شود. از مزایای آگزوپلی‌ساکارید در این تحقیق این است که خود افزون بر نقش احیا کنندگی نقش پایدار کننده را نیز داراست. نتایج این بررسی نشان می‌دهد نمونه‌های ۲ و ۳ از پایداری بسیار خوبی برخوردار هستند و حتی پس از ۶ ماه بی حرکت ماندن باز هم پایداری خود را حفظ کردند. این نتیجه

ماکزیمم جذب هستند. همچنین، طیف نمونه ۴ مربوط به نانوذرات طلایی است که با استفاده از پولولان تهیه شده است و دارای طول موج ماکزیمم جذب ۵۳۱ نانومتر است. لازم به ذکر است یک نمونه شامل مخلوط نمک طلا و پلی‌ساکارید نیز در دمای اتاق و به دور از نور نگهداری شده است که هیچ جذبی در ناحیه ۵۱۷-۵۷۲ نانومتر دیده نشد و رنگ محلول نیز تغییری نکرد و نشان‌دهنده این است که احیای یون‌های طلا صورت نگرفته و هیچ نانو ذره‌ای بدون حرارت دادن تشکیل نمی‌شود. جمع‌بندی داده‌ها و نتایج در جدول ۱ پیوست آورده شده است. با توجه به شکل ۱ و بر اساس میزان جذب در طیف UV-Vis می‌توان نتیجه گرفت که هر چهار نوع پلی‌ساکارید، به مقدارهای متفاوت احیای یون‌های طلا را به فلز طلا انجام داده‌اند. در این میان بیشترین جذب و احیا کنندگی مربوط به پولولان و به ترتیب آگزوپلی‌ساکارید دیالیز شده و آگزوپلی‌ساکارید دیالیز نشده و در نهایت کمترین میزان احیا کنندگی مربوط به آگزوپلی‌ساکارید فریزدرای شده است. با بررسی طول موج ماکزیمم جذب با توجه به نتایج طیف UV-Vis نمونه‌ها در شکل ۱، می‌توان به صورت زیر در مورد اندازه ذرات نتیجه گیری نمود [۳۰]. از آنجایی که جذب در طول موج بیشتر در نتیجه اندازه ذرات بزرگتر و جذب در طول موج کوچکتر در نتیجه اندازه ذرات کوچکتر اتفاق می‌افتد، ترتیب اندازه ذرات به صورت: نمونه ۴ > نمونه ۳ > نمونه ۱ > نمونه ۲ است. همچنین با توجه به ارتباط بین طول موج پلاسمون رزونانس سطحی و اندازه ذرات، می‌توان نتیجه گرفت که اندازه بیشتر نانوذرات در حدود ۳۰ تا ۴۰ نانومتر است [۳۱].

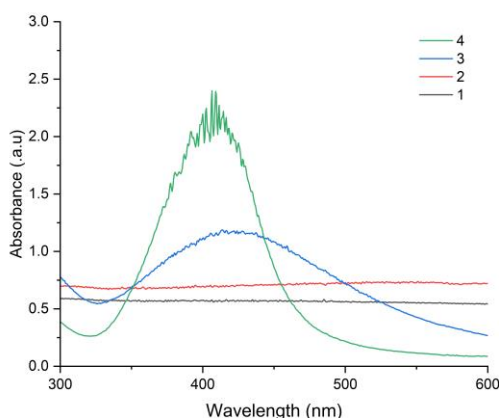


شکل ۱. طیف UV-Vis نانوذرات طلا مربوط به نمونه‌های شماره ۱ تا ۴

به منظور تایید نتایج بالا، از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری برای نانوکلوئید طلای تهیه شده با نمونه ۳ استفاده شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات طلا در شکل ۲-الف آورده شده است. این شکل نشان می‌دهد که

محلول اگزوپلی ساکارید میسر نیست. به همین دلیل همانگونه که در بخش تجربی ذکر شد از غشای دیالیزی برای حذف یون-ها استفاده شد.

با بررسی طیف UV-Vis نمونه شماره ۳ (دیالیز شده)، تشکیل نانوذرات نقره تایید می شود [۳۴]. بررسی طیف UV-Vis نمونه شماره ۳، پیک پلاسمون رزونانس سطحی در طول موج ۴۱۳/۵ نانومتر را نشان می دهد که نشان دهنده تشکیل نانوذرات کروی نقره است [۳۵]. همچنین، با توجه به ارتباط بین طول موج پلاسمون رزونانس سطحی و اندازه ذرات، می توان نتیجه گرفت که اندازه بیشتر نانوذرات در حدود ۳۵ تا ۴۰ نانومتر هستند.



شکل ۳. طیف UV-Vis نانوذرات نقره مربوط به نمونه های ۱ تا ۴

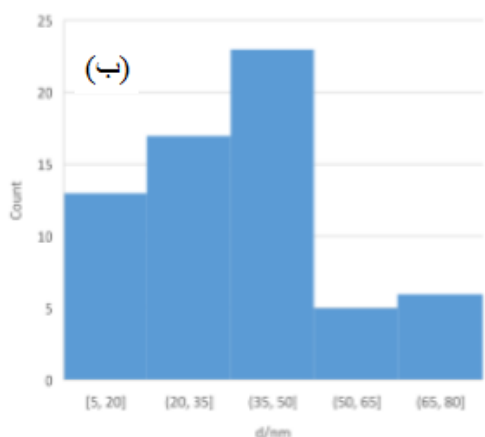
با توجه به میزان جذب در طیف UV-Vis نمونه ها می توان در مورد قدرت احیا کنندگی هر یک از پلی ساکاریدها نسبت به یکدیگر اظهار نظر نمود. طبیعتاً هر چه میزان جذب در طیف UV-Vis یک نمونه، بیشتر باشد، می توان دریافت که احیای یونها بیشتر صورت گرفته و غلظت نانوذرات در نمونه بیشتر است. در منحنی های مربوط به نمونه های ۳ و ۴ جذب مربوط به پلاسمون رزونانس سطحی نانوذرات نقره در طول موج بین ۴۰۰ تا ۴۳۰ نانومتر اتفاق افتاده که نشان از تشکیل نانوذرات نقره دارد. اما میزان جذب دو نمونه با یکدیگر متفاوت است. میزان جذب بیشتر ناشی از میزان غلظت بیشتر نانوذرات نقره در محلول است و این امر نشان دهنده قدرت بیشتر احیا کننده است [۳۶]. با توجه به این که نمونه شماره ۴ دارای میزان جذب بیشتر از نمونه شماره ۳ است، می توان نتیجه گرفت که قدرت احیا کنندگی پولولان در احیای یون های نقره به نقره فلزی بیشتر از اگزوپلی ساکارید به دست آمده از ریز جلبک، است. همچنین، در تهیه نانوذرات نقره با استفاده از پولولان، رنگ محلول سریع تر به رنگ زرد تغییر می کند که این نشان دهنده

جالب حاکی از تاثیر بسیار عالی اگزوپلی ساکارید حاصل از ریز جلبک در پایدار نه داشتن نانوکلوئید طلای مورد نظر است. اگزوپلی ساکاریدها به دلیل وجود گروه های هیدروکسیل در ساختارشان، هم از طریق برهمکنش های الکترواستاتیک و هم از طریق پیوندهای هیدروژنی بین یکدیگر پوششی اطراف سطح نانوذرات برقرار می کنند و باعث پایداری نانوذرات و جلوگیری از تجمع و کلوخه ای شدن آنها می شوند [۱۷ و ۳۲]. با توجه به نتایج، از میان نمونه هایی که با اگزوپلی ساکاریدهای به دست آمده از ریز جلبک تهیه شده اند، نمونه سنتز شده با استفاده از اگزوپلی ساکارید دیالیز شده (نمونه ۳) از لحاظ سرعت احیا شدن یون های طلا، میزان احیا شدن، اندازه ذرات کوچک تر، پایداری بیشتر و شفاف بودن محلول بر سایر نمونه های سنتز شده برتری دارد.

۲-۳- نتایج حاصل از تهیه نانوکلوئیدهای نقره

نانوذرات نقره نیز دارای پلاسمون رزونانس سطحی هستند و با تعیین طول موج پیک پلاسمون رزونانس سطحی می توان حضور و اندازه نانوذرات نقره را معین نمود [۳۰]. نانوذرات نقره با ابعاد بین ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر، دارای طول موج جذب پلاسمون رزونانس سطحی بین ۳۹۷/۵ تا ۵۰۰ نانومتر می باشند که ارتباط بین طول موج جذب پلاسمون رزونانس سطحی نانوذرات نقره و اندازه آنها مشخص است. پس از سنتز نانوذرات نقره با استفاده از چهار نوع پلی ساکارید ذکر شده، طیف UV-Vis هر یک از نمونه ها تهیه شد. شکل ۳ طیف UV-Vis مربوط به نمونه های ۱ تا ۴ را نشان می دهد.

در تهیه نمونه شماره ۱ و ۲ طبق روشی که در بخش تجربی شرح داده شده است، احیای یون های نقره انجام نشد. با بررسی طیف UV-Vis نمونه شماره ۱ و ۲ در شکل ۳ نیز این ادعا اثبات می شود زیرا در ناحیه ۳۹۷/۵ تا ۵۰۰ نانومتر پیک ناشی از پلاسمون رزونانس سطحی نانوذرات نقره مشاهده نمی شود. همچنین تغییر رنگ محلول به زرد متمایل به قهوه ای هم صورت نگرفته است [۳۳]. دلیل این امر به روش پرورش ریز جلبک ها باز می شود. برای رشد ریز جلبک در محیط کشت آن نمک های مختلفی از جمله NaCl ، MgSO_4 و ... حل می شود. به همین دلیل در محیط کشت ریز جلبک مقدار زیادی یون کلرید وجود دارد. با افزودن AgNO_3 به محلول اگزوپلی ساکارید، یون های نقره در کنار یون های کلرید رسوب سفید رنگ AgCl تشکیل می دهند که این امر باعث مصرف شدن یون نقره شده و عملاً پیش ماده نانوذرات نقره از بین می رود. به این ترتیب، سنتز نانوذرات نقره با استفاده از اگزوپلی ساکارید نمونه ۱ و ۲ به دلیل حضور یون کلرید در



شکل ۴. (الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانو ذرات نقره و (ب) نمودار توزیع اندازه نانوذرات نقره

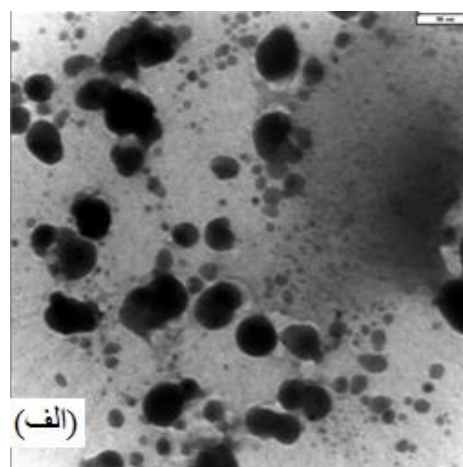
این شکل نشان می‌دهد که ریخت‌شناسی نانوذرات، بیشتر از نوع کروی است لیکن توزیع اندازه نانوذرات کاملاً یکنواخت و تک‌پخش نیست. علاوه بر این نمودار توزیع اندازه نانوذرات نقره نشان می‌دهد ذرات با اندازه‌های بین ۵ تا ۸۰ نانومتر وجود دارند (شکل ۴-ب). بر اساس این نمودار میانگین اندازه ذرات حدود ۳۵ نانومتر تخمین زده می‌شود که با نتایج حاصل از UV-Vis نسبتاً در توافق است.

۳-۳- نتایج حاصل از تست ضدباکتری

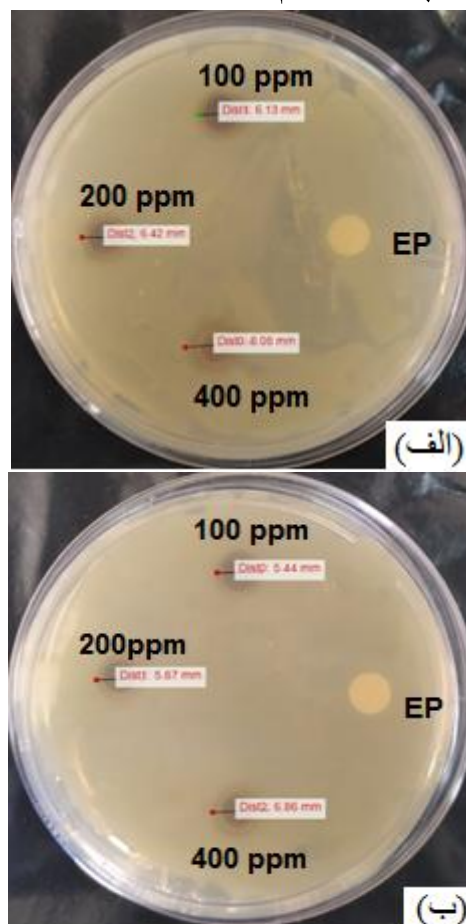
غلظت‌های ۱۰۰ ppm، ۲۰۰ ppm و ۴۰۰ ppm از هریک از نانوکلوئیدهای طلا و نقره تهیه شد و به طریقی که در بخش تجربی توضیح آن آمده، در شرایط یکسان تست ضدباکتری انجام شد. هر دو نوع نانوذره فعالیت ضدباکتری را از خود نشان دادند. در عین حال همانگونه که انتظار می‌رود نانوذرات نقره بیشتر از نانوذرات طلا فعالیت ضدباکتری از خود به نمایش گذاشت. در پلیت‌هایی که از غلظت‌های مختلف نانوذرات در آن‌ها استفاده شده است، بررسی‌ها نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانوذرات، از رشد باکتری‌ها به میزان بیشتری جلوگیری شده است. برای نمونه در شکل ۵، اثر نانو ذرات نقره با غلظت‌های ۱۰۰ ppm، ۲۰۰ ppm و ۴۰۰ ppm روی باکتری‌های اشیریشیا کلی و انتروکوکوس فکالیز نشان داده شده است. در هر یک از ظروف پتری، از آگزوپلی‌ساکارید دیالیزشده به عنوان کنترل استفاده شد. بررسی‌ها نشان می‌دهد باکتری‌ها در اطراف دیسک حاوی آگزوپلی‌ساکارید دیالیز شده، رشد بیشتری کرده‌اند. علت این موضوع را می‌توان استفاده باکتری از قند پلی‌ساکارید برای رشد و فعالیتش دانست. در پایان به طور کلی می‌توان گفت اثر ضدباکتری نانوذرات تهیه شده روی باکتری گرم منفی اشیریشیا کلی اندکی بیشتر از اثر ضدباکتری نانوذرات، روی باکتری گرم مثبت انتروکوکوس

احیای سریع‌تر یون‌های نقره است. بنابراین سرعت احیاکنندگی پولولان بیشتر از آگزوپلی‌ساکارید بدست آمده از ریزجلبک است. در عین حال نانوکلوئیدهای نقره سنتز شده با استفاده از آگزوپلی‌ساکارید استخراج شده، پایداری بیشتری نسبت به نانوکلوئیدهای نقره سنتز شده با استفاده از پولولان نشان دادند. بطوریکه نانوکلوئیدهای نقره سنتز شده با استفاده از پولولان پس از گذشت تقریباً دو ماه تا حدودی تهنشین شده و نانوذرات نقره رسوب می‌کنند اما نانوکلوئیدهای نقره سنتز شده با استفاده از آگزوپلی‌ساکارید دیالیز شده پس از گذشت حدود دو ماه، پایداری خود را حفظ نموده و نانوذرات نقره در آن‌ها رسوب نمی‌کنند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت آگزوپلی‌ساکارید به دست آمده از ریزجلبک توانایی بیشتری نسبت به پولولان در پوشاندن نانوذرات نقره و جلوگیری از تجمع و کلوخه‌ای شدن آن‌ها دارد. بنابراین همانطور که بیان شد، آگزوپلی‌ساکاریدها باتوجه به ساختارشان نقش مهمی در پایدارسازی نانوکلوئیدها دارند. پلی‌ساکاریدها با داشتن گروه‌های عاملی از جمله: هیدروکسیل، کربوکسیل، سولفات و ... پایدارسازی نانوکلوئیدها را به خوبی انجام داده و از تجمع و کلوخه‌ای شدن نانوذرات جلوگیری می‌کنند [۳۷].

به منظور تایید نتایج حاصل از طیف سنجی UV-Vis، از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری برای نانوکلوئید نقره تهیه شده با نمونه آگزوپلی‌ساکارید دیالیزشده (نمونه ۳) استفاده شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات نقره در شکل ۴-الف آورده شده است.



فکالین است و باکتری فکالین رشد بیشتری در اطراف دیسک حاوی اگزوپلی ساکارید انجام داده است.



شکل ۵. اثر نانو ذرات نقره با غلظت‌های ۱۰۰ ppm، ۲۰۰ ppm و ۴۰۰ ppm روی (الف) باکتری اشیریشاکلی و (ب) باکتری انتروکوکوس فکالین

مکانیسم ضدباکتریایی نانوذرات نقره همیشه مورد بحث بوده و تا حدی مشخص شده است. معمولاً نانوذرات نقره (و یا طلا) به پروتئینهای حاوی گوگرد در سطح غشای باکتری‌ها متصل شده و با تغییر در مورفولوژی و زنجیره تنفسی باکتری امکان ورود به سلول یافته و در نهایت با غیرفعال کردن آنزیمهای آن و همچنین، تولید هیدروژن پروکسید فرایند مرگ باکتری را تسهیل می‌کند. همانطور که پیشتر هم مشخص شده است و در این پژوهش باکتری‌ها به غلظت نانوذره و تجمع در دیواره سلولی بستگی دارد [۳۸].

۴. نتیجه گیری

در بخش اول این کار پژوهشی، جداسازی و استخراج اگزوپلی- ساکارید ترشح شده توسط ریزجلبک پورفیریدیوم پورپورئوم درون محیط کشت آن انجام شد و همچنین، تستهای لازم برای شناسایی آن صورت گرفت. در ادامه از اگزوپلی ساکارید به

دست آمده از ریزجلبک، به عنوان عامل کاهنده یونهای فلزی و پایدار کننده نانوذرات تشکیل شده در محیط آبی استفاده شد. نانوذرات طلا و نقره با استفاده از اگزوپلی ساکارید یاد شده، با موفقیت سنتز شدند. این روش یک روش دوستدار محیط زیست به دلیل عدم نیاز به استفاده از مواد شیمیایی به منظور احیای شیمیایی یونهای فلزی و پایدارسازی نانوذرات تشکیل شده است. همچنین به علت عدم استفاده از عوامل احیا و پایدارکننده گرانتقیمت، روشی مقرون به صرفه در تهیه نانوذرات فلزی است. به طور کلی این روش در تهیه نانوذرات، پتانسیل تهیه نانوذرات فلزی در مقیاس صنعتی را دارد. در بخش دوم، تشکیل نانوذرات با استفاده از طیف سنجی UV-Vis و میکروسکوپ الکترونی عبوری تایید و اندازه و مورفولوژی نانوذرات طلا و نقره، مشخص شد. نتایج حاصل از آزمون میکروسکوپ الکترونی عبوری، نتایج حاصل از طیف سنجی UV-Vis را تایید نمود. مورفولوژی نانوذرات تهیه شده، غالباً کروی بوده ولی تعداد بسیار اندکی نانوذره با مورفولوژی غیر کروی نیز تشکیل شد که امری اجتناب ناپذیر در روش سنتزهای اینچنینی است. بنابراین می‌توان با تمرکز روی شرایط و روش سنتز، تهیه ریخت‌شناسی‌های مختلف نانوذرات و نیز عامل‌دار کردن نانوذرات سنتز شده به این روش، کاربردهای خاصی را محقق کرد. همچنین، خواص ضدباکتری نانوذرات سنتز شده با این روش، بر روی دو نوع باکتری گرم مثبت انتروکوکوس فکالین و باکتری گرم منفی اشیریشاکلی با استفاده از آزمون دیسک دیفیوژن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد هر دو نانوذره سنتز شده با این روش، دارای فعالیت ضدباکتری بوده و در شرایط یکسان، نانوذرات نقره بیشتر از نانوذرات طلا، از خود فعالیت ضدباکتری نشان دادند.

۵. سپاسگزاری

از دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه و معاونت پژوهشی دانشگاه و تمامی عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

۵. منابع

- [1] M.C. Daniel, D. Astruc, Chemical Review 104, 293-346, (2004).
- [2] C.M. Cobley, J. Chen, E.C. Cho, L.V. Wang, Y. Xia, Chemical Society Review, 40, 44-56, (2011).
- [3] K. Murali, M.S. Neelakandan, S. Thomas, JSM Nanotechnology & Nanomedicine, 6, 1064-1075, (2018).
- [4] A. Salabat, M. Rahmatifar, Russian Journal of Physical Chemistry A, 86, 881-883, (2012).



- [24] G. Huys, K. D'Haene, J. Swings, *Letters in Applied Microbiology*, 34, 402-406, (2002).
- [25] N.P. Bonjoch and P.R. Tamayo, Protein Content Quantification by Bradford Method, In: M.J. Reigosa Roger (eds), *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*, Springer, (2001).
- [26] C.L. Kielkopf, W. Bauer, L. Urbatsch, Bradford assay for determining protein concentration, *Cold Spring Harbor Protocols Laboratory Press*, (2020).
- [27] T. Masukoa, A. Minamib, N. Iwasakib, T. Majimab, S-I. Nishimurac, Y.C. Lee, *Analitical Biochemistry*, 339, 69-72, (2005).
- [28] K. Vidhya, M. Saravanan, G. Bhoopathi, V.P. Devarajan, S. Subanya, *Applied Nanoscience*, 5, 235-243, (2015).
- [29] A. Salabat, G. Nabiyouni, M. Rahmati Far, *Journal of Experimental Nanoscience*, 6, 305-310, (2011).
- [30] N. H. Wolfgang,, T.K. Nguyen, J.A. Thanh, G.F. David, *Analitical Chemistry*, 79, 4215-4221, (2007).
- [31] L.H. Costa, J.V. Hemmer , E.H. Wanderlind, O.M.S. Gerlach, A.L.H. Santos, M.S. Tamanaha, A. Bella-Cruz, R. Corrêa, H.A.G. Bazani, C.M. Radetski, G.I. Almerindo, *BioNanoScience*, 10, 1049-1062, (2020).
- [32] G. Sathiyarayanan, V. Vignesh, G. Saibaba, A. Vinothkanna, K. Dineshkumar, M.B. Viswanathan, J. Selvin, *RSC Advances*, 4, 22817-22827, (2014).
- [33] M. Rycenga, C.M. Cobley, J. Zeng, W. Li, C.H. Moran, Q. Zhang, D. Qin, Y. Xia, *Chemical Review*, 111, 3669-3712, (2011).
- [34] M.K. Temgire, S.S. Joshi, *Radiation Physics and Chemistry*, 71, 1039-1044, (2004).
- [35] H. Bar, D.K. Bhui, G.P. Sahoo, P. Sarkar, P.D. Sankar, A. Misra, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 339, 134-139, (2009).
- [36] L.S. Nair, C.T. Laurencin, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3, 301-316, (2007).
- [37] S. Azizi, M.B. Ahmad, F. Namvar, R. Mohamad, *Materials Letters*, 116, 275-277, (2014).
- [38] L. Zhang, J.M. Chan, A.Z. Wang, R.S. Langer, O.C. Farokhzad, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83, 761-769, (2008).
- [5] G. Adlakha-Hutcheon, R. Khaydarov, R. Korenstein, R. Varma, A. Vaseashta, H. Stamm, M. Abdel-Mottaleb, *Nanomaterials, Nanotechnology*, In *Nanomaterials: risks and benefits*, pp. 195-207, Springer, Dordrecht, (2009).
- [6] J. Flieger, W. Flieger, J. Baj, R. Maciejewski, *Materials*, 14, 4135-4154, (2021).
- [7] R.G. Saratale, I. Karuppusamy, G.D. Saratale, A. Pugazhendhi, Y. Park, S. Ghodake, R.N. Bhargava, J.R. Banu, H.S. Shin, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 170, 20-35, (2018).
- [8] M.I. Husseiny, M.A. Ei-Aziz, Y. Badr, M.A. Mahmoud, *Spectrochimica Acta Part A*, 67, 1003-1006, (2007).
- [9] P. Mohanpuria, N.K. Rana, S.K. Yadav, *Journal of Nanoparticle Research*, 10, 507-517, (2008).
- [10] M. Moscovici, *Frontiers in Microbiology*, 6, 325-336, (2015).
- [11] U. Nwodo, E. Green, A. Okoh, *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 14002-14015, (2012).
- [12] P. Laurienzo, *Marine Drugs*, 8, 2435-65, (2010).
- [13] F. Donot, A. Fontana, J.C. Baccou, S. Schorr-Galindo, *Carbohydrate Polymers*, 87, 951-962, (2012).
- [14] A. Mishra, B. Jha, *Microbial exopolysaccharides*, In: E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson (eds), pp. 179-192, *The Prokaryotes*, Springer, (2013).
- [15] D. Pooja, S. Panyaram, H. Kulhari, S.S. Rachamalla, R. Sistla, *Carbohydrate Polymers*, 110, 1-9, (2014).
- [16] W. Xu, W. Jin, L. Lin, C. Zhang, Z. Li, Y. Li, R. Song, B. Li, *Carbohydrate Polymers*, 101, 961-967, (2014).
- [17] S.M. Navarro, E. Alpaslan, M. Wang, Ph. Larese-Casanova, M.E. Londoñ, L. Atehortúa, J.J. Pavón, T.J. Webster, *Materials Science and Engineering*, 99, 685-695, (2019).
- [18] S. Jukho, Y. Sharma, K. Sharma, K. Vaid, H. Dhar, V. Kumar, R.P. Singh, A. Shekh, G. Kumar, *Journal of Applied Phycology*, 33, 3899-3914, (2021).
- [19] S. Soleimani, A. Salabat, *Colloid Journal*, 77, 207-212, (2015).
- [20] A. Salabat, F. Mirhoseini, M. Arjomandzadegan, E. Jiryaei, *New Journal of Chemistry*, 41, 12892-12900, (2017).
- [21] S. Tiani Moghadam, A. Salabat, *Particuology*, 37, 33-36, (2018).
- [22] A. Salabat, F. Mirhoseini, *Journal of Molecular Liquids*, 268, 849-853, (2018).
- [23] J. Bakht, A. Islam, H. Ali, M. Tayyab, M. Shafi, *African Journal of Biotechnology*, 10, 7658-7667, (2011).



Green synthesis of gold and silver nanoparticles using microalgae exopolysaccharides and evaluation of their antibacterial activity

M.Maleki¹, A. Salabat^{1,*}, M.Mahdiyeh²

1. Chemistry Department Arak University, Arak ,Iran

2. Biology Department Faculty of Science Arak University, Arak Iran

Abstract

In this research work, for the first time, gold and silver nanoparticles were successfully synthesized using exopolysaccharide extracted from the culture medium of porphyridium purpureum microalgae and then their antibacterial activity was evaluated. In this method, in addition to reducing the metal ions of gold and silver, exopolysaccharide also play a role in stabilizing the nanoparticles synthesized in aqueous solution. UV-Vis spectroscopy method was used to confirm the formation of synthesized nanoparticles. Also, transmission electron microscopy (TEM) was used to determine the size and morphology of the gold and silver nanoparticles synthesized using microalgae exopolysaccharide. Finally, the antibacterial activity of nanoparticles synthesized using exopolysaccharide derived from microalgae was evaluated on two types of gram-positive bacteria (E. Faecalis) and gram-negative bacteria (E. coli). For this purpose, disk diffusion test was used, as a result of which it was found that these stabilized nanoparticles have significant antibacterial activity. Exopolysaccharide-stabilized silver nanoparticles also show better antibacterial activity than exopolysaccharide-stabilized gold nanoparticles.

Keywords: Exopolysaccharide, Gold nanoparticles, Green synthesis, Microalgae, Silver nanoparticles