

ثبیت نانوذرات نقره بر روی دانه‌های زئولیت و سیلیس بعنوان بستر فیلتراسیون در کنترل عفونت قارچی دوران انکوباسیون جنین تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)؛ میزان ره‌ایش نقره در آب و اثر آن بر نرخ تفریح

اشکان بنان^{۱*}، محمدرضا کلباسی^۲، محمود بهمنی^۳

۱- گروه علوم و مهندسی شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

۲- گروه تکثیر و پرورش آبریان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۳- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

چکیده

کاربرد غیرمستقیم نانوذرات نقره (Silver Nanoparticles [AgNPs]) در کنترل عفونت قارچی شایع دوران انکوباسیون جنین تاس ماهی ایرانی-سaprolegniz- در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. فیلترهای محتوی زئولیت و سیلیس پوشش داده شده با ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد نانوذرات نقره در دو حالت بدون عامل و دارای عامل جفت شونده آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان به همراه تیمار شاهد (بدون فیلتر)، تیمارهای مورد بررسی در پژوهش حاضر بودند. نتایج نشان داد که در ۴۸ ساعت ابتدایی انکوباسیون که منطبق بر رشدنمو جنینی تا پیش از مرحله شروع نورولاسیون می گردد، علیرغم شروع آلوده سازی آب انکوباتورها با قارچ ساپروولگنیا، عفونت قارچی در هیچکدام از تیمارهای مورد بررسی دیده نشد. نتایج حاصل از سنجش میزان ره‌ایش نقره از فیلترهای مورد مطالعه در پایان ۱۲ ساعت ابتدایی شروع انکوباسیون نشان می‌دهد که میزان ره‌ایش نقره در آب، در تیمارهای فیلترهای ۱٪ بدون عامل و عامل دار بطور معنی‌داری بیشتر از سایر فیلترهای محتوی نانوذرات نقره بود. این روند در زمان‌های بعدی نمونه برداری (۴۸ و ۹۶ ساعت) نیز تکرار شد با این تفاوت که میزان ره‌ایش نقره تنها در تیمار فیلتر ۱٪ عامل دار بطور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0.05$). در تیمار فیلترهای ۱٪ عامل دار، درصد تفریح به طور معنی‌داری نسبت به تیمار فیلتر شاهد، افزایش نشان دادند.

کلید واژه‌ها: ساپروولگنیا، زئولیت، سیلیس، یون نقره، ضدعفونی میکروبی آب، تصفیه آب

مقدمه

تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، طبق طبقه بندی اتحادیه بین المللی حفاظت از حیات وحش (IUCN: International Union for Conservation of Nature)، جزء گونه‌های در معرض خطر انقراض می باشد؛ با این حال، این گونه از نظر نسبت فراوانی و نسبت وزن زی توده بیشترین سهم از گونه‌های تاس ماهیان دریاچه خزر را به خود اختصاص میدهد [۱]. تاس ماهی ایرانی، ماهی بومی ایران با پتانسیل بالای آبرزی پروری می‌باشد که به منظور تولید گوشت و خاویار پرورش می‌یابد. آلودگی های قارچی ایجاد شده توسط خانواده ساپروولگنیاسه (Saprolegniaceae)-بیماری ساپروولگنیازیز- از اهمیت بالایی بویژه طی دوره انکوباسیون تخم‌های تاس ماهیان برخوردار می باشند. بطوری که تلفات طی این دوره گاهی به ۷۰ تا ۹۰ درصد می رسد [۲]. ساپروولگنیازیز در تخم‌ها منجر به تلفات، کاهش نرخ تفریح و بقا می گردد [۳]. تخم‌های مرده، بستر مناسبی برای رشد و گسترش قارچ ساپروولگنیا محسوب می شوند. زئوسپور قارچ ها می‌تواند بر روی تخم‌های مرده رشد کرده و توده های میسلیوم را ایجاد نماید. توده های میسلیوم، تخم‌های زنده را نیز احاطه کرده و آن‌ها را خفه می‌نمایند و بدین ترتیب توده دیگری از تخم‌های مرده ایجاد گردیده و می‌تواند تا زمانی که همه تخم‌ها از بین روند ادامه یابد [۴]. مطالعات مختلف نشان داده اند که کاربرد ترکیبات شیمیایی ضدعفونی کننده می‌تواند اثرات نامطلوبی بر محیط زیست و موجود پرورشی بگذارد [۵]. بعنوان مثال، مالاشیت گرین،

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۵

تاریخ چاپ الکترونیکی:

۱۴۰۳/۰۹/۲۰

*نویسنده مسئول:

banan.a@lu.ac.ir

ترکیب موثری در کنترل عفونت های قارچی در ماهیان و تخم آنها تلقی می گردد، با این حال، آن را ترکیبی سرطان زاء، جهش زا و عامل ناهنجاری های جنینی می دانند [۶]. فرمالین، ترکیب ضدقارچ ثبت شده دیگری است که تاثیر آن در کنترل عفونت های قارچی در ماهیان ناکامل می باشد [۷]. کاربرد سایر عوامل قارچ کش نظیر ازون، پراکسید هیدروژن، کلراید سدیم، یدوفور و مس نیز همه گیر نمی باشد [۵]. بنابراین، لزوم بررسی راهبردهای نوین کنترل اینگونه عفونت ها احساس می گردد. فناوری نانو، بعنوان یک فناوری پیشرفته، فرصت های نوینی را در ایجاد ترکیبات کارآمدتر و مقرون به صرفه جهت ضدعفونی نمودن آب ایجاد نموده است [۸]. نانوذرات بدلیل ساختار سطحی، اندازه و بطور کلی دارا بودن ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاص از واکنش پذیری بالاتری در مقایسه با مواد خارج از مقیاس نانو برخوردارند [۹]. یون نقره بعنوان یک عامل ضد میکروبی بالقوه، توان بالایی در مقابله با باکتری ها، ویروس ها و قارچ ها دارد [۱۰]. کاهش اندازه نقره فلزی به ابعاد نانو (۱ تا ۱۰۰ نانومتر) باعث افزایش تاثیر ضد میکروبی این ذرات می شود. دلیل این موضوع افزایش چند برابری سطح تماس نانوذرات با دیواره سلولی میکروارگانیسم ها، نسبت به ابعاد بزرگتر نقره فلزی می باشد [۱۱]. Kim و همکاران [۱۲] مکانیزم ضدقارچی نانوذرات نقره را اختلال در غشای سلول و ممانعت در فرآیند معمول جوانه زدن از طریق از بین بردن یکپارچگی غشا عنوان نمودند. استفاده مستقیم از کلونید نانوذرات نقره ممکن است مشکلاتی نظیر تجمع آن ها را در محیط های آبی بهمراه داشته باشد که تدریجا کارایی آن ها را در طی کاربردی بلندمدت کاهش می دهد [۱۳]. از مورد اخیر مهم تر آن است که این نحوه کاربرد اثرات فاجعه باری در محیط زیست و روی موجودات زنده به دنبال دارد [۱۴].

در سال های گذشته، بسترهای پوشش یافته با نانوذرات نقره به دلیل دارا بودن خاصیت ضد میکروبی بالا و مقرون به صرفه بودن جهت ضدعفونی آب در آبی پروری نیز مورد استفاده قرار گرفته اند [۵، ۸ و ۱۵]. از این رو، هدف تحقیق حاضر، ایجاد بسترهایی با خاصیت ضدقارچی بالا و نرخ رهایش پایین نقره از طریق به کار بردن عامل جفت شونده آمینوسیلان (3-aminopropyltriethoxysilane [APTES]) بعنوان یک پل ارتباطی بود که در میان ترکیباتی با این ویژگی فاقد سمیت می باشد و برای اولین بار در دوره انکوباسیون تاس ماهیان مورد بررسی قرار می گیرد. بنابراین، نانوذرات نقره بر روی بسترهای ژئولیت و سیلیس تثبیت شدند و از APTES به عنوان یک عامل جفت شونده استفاده شد. کارایی فیلترهای ساخته شده در کنترل آلودگی قارچی ساپروولگنیا طی دوران انکوباسیون جنین تاس ماهی ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. میزان رهایش نقره از فیلترهای مورد بررسی به آب و اثر آن بر نرخ تفریح تخم تاس ماهی ایرانی از جمله مهمترین پارامترهای مورد بررسی در این تحقیق بود.

مواد و روش ها

آماده سازی بسترهای فیلترهای مورد استفاده

به ازای هر ۱۰۰ گرم بستر ژئولیت (با ابعاد ۳-۴ میلی متر) یا سیلیس (با ابعاد ۱-۲ میلی متر) ۵۰ سی سی HCl ۶ مولار برداشته و به مدت ۲۴ ساعت نمونه در مبرد جوشانده شد، سپس حلال تخلیه و با آب چند مرتبه شست و شو گردید و یک بار دیگر نیز با استن شسته شده و سپس در دمای ۶۰-۸۰ درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه روز خشک گردید.

سپس به ازای ۲۰ گرم نمونه مقدار ۵ میلی مول از ترکیب APTES به ۲۰ سی سی تولوئن اضافه و در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت حرارت داده شد. بعد از انجام آزمایش، تولوئن قدیمی تخلیه و چند بار با تولوئن تازه شست و شو و سپس در هوا خشک گردید [۱۴].

جهت پوشش دهی بسترهای آمین دار شده با ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد نانوذرات نقره به ترتیب ۰/۴، ۱ و ۲ میلی مول از نیترات نقره در ۲۵ سی سی آب حل شده (در بطری تاریک) و سپس نمونه آماده شده (۲۰ گرم) به آن اضافه گردید. سپس به مدت حداقل ۲ ساعت با هم مخلوط شده و پس از صاف کردن چند مرتبه با آب شست و شو داده شد. همچنین ۴ میلی مول از NaBH_4 در ۵ سی سی آب حل شده و در مدت ۵ ثانیه به صورت یکنواخت به بالنی که در آن نمونه آمین دار و ۳۰ سی سی آب وجود داشت اضافه گردید [۱۵]. سپس به مدت یک روز مخلوط شد، صاف گردید و پس از چندبار شست و شو در آب مقطر در دمای حدود ۵۰ درجه سانتیگراد خشک گردید.

روش های سنجش نانومواد

جهت بررسی نحوه پوشش دهی و تعیین درصد و ویژگی‌های نانوذرات پوشش داده شده روی بسترهای مختلف ژئولیت و سیلیس، خصوصیات این مواد توسط روش‌های مختلف به شرح زیر مورد بررسی قرار گرفت:

برای اندازه‌گیری نانوذرات نقره پوشش داده شده بر روی بسترهای سیلیس و ژئولیت از تصاویر میکروسکوپ الکترونی پیمایشگر استفاده گردید. بدین منظور ابتدا دانه های سیلیس و ژئولیت محتوی نانوذرات نقره و فاقد این نانوذرات بر روی پایه های مخصوص چسبانده شده و توسط دستگاه Sputter coater ساخت شرکت Kyky مدل SBC12 پوشش طلا داده شدند. سپس نمونه‌های آماده شده در دستگاه SEM (آزمایشگاه رضایی-تهران) ساخت شرکت Kyky مدل EM3200 قرار داده شد و تصویربرداری از نمونه ها انجام گردید. در تصاویر با بزرگنمایی ۱۰ هزار برابر، قطر ذرات موجود به وسیله نرم افزار Digimizer ver.4.1.1.0 اندازه‌گیری شد.

برای تعیین ساختار کریستالی و شناسایی و آنالیز ساختاری کانیهای رسی موجود در سیلیس و همچنین ساختار ژئولیت پوشش داده شده با نانوذرات نقره، این بسترها با استفاده از هاون بصورت کاملا پودر درآمدند، سپس نمونه‌های پودر شده در دمای ۱۱۰۰ درجه قرار گرفته تا مواد آلی و فرار آن خارج شود. سپس در آزمایشگاه اشعه ایکس دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس توسط دستگاه XRD مدل Xpemt-MPD (Philips, Netherland) مورد بررسی قرار گرفتند. تیوب مورد استفاده در این دستگاه از نوع مسی، طول موج اشعه ایکس ۱/۵۴۰۵۶ آنگستروم، ولتاژ ۴۰ کیلو ولت، شدت جریان ۴۰ میلی آمپر و ۰/۰۲ step size بود.

برای تعیین مقادیر کمی ترکیبات موجود در ژئولیت و سیلیس پوشش داده شده با نانوذرات نقره ابتدا بسترها با استفاده از هاون به صورت پودر بسیار یکنواخت و ریز درآمدند. نمونه های پودر شده در دمای ۱۱۰۰ درجه سوزانده شدند تا مواد آلی و فرار آن خارج شود و سپس توسط دستگاه XRF مدل PW2404 (Philips, Netherland) مورد بررسی قرار گرفتند. اسپکترومتری فلورسانس اشعه ایکس (XRF) بر اساس تشعشع ثانویه ویژه، ساطع شده از موادی که توسط یک منبع اشعه ایکس دارای انرژی بالا برانگیخته شده اند، عمل میکند و کاربرد اصلی آن اندازه‌گیری مقادیر عناصر ویژه در مواد می باشد [۱۸].

طیف سنج مادون قرمز یکی از روش‌های متداول است که برای شناسایی گروه های عاملی مواد مورد استفاده قرار می گیرد، نمونه ها پس از پودر شدن در هاون به آزمایشگاه انتقال داده و بوسیله دستگاه (FTIR, Shimatzu 8400s) مورد آنالیز قرار گرفتند.

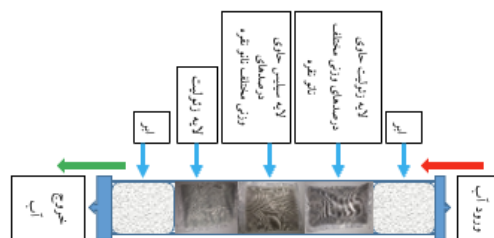
مولدین تاس‌ماهی ایرانی بکار رفته در مطالعه حاضر از ساحل جنوبی دریای خزر و بطور خاص از صیدگاه‌های محدوده بهشهر (استان مازندران) صید شده و به مرکز شهید رجایی منتقل شدند. پرورش و نگهداری مولدین در حوضچه‌های بتنی حاوی آب با درجه حرارت $18 \pm 1/5$ سانتیگراد و pH $7/6$ تا $7/9$ صورت گرفت. جهت القاء رسیدگی جنسی از تزریق عضلانی هورمون سنتتیک گنادوتروپینی (LHRH-A₂: Luteinizing Hormone-Releasing Hormone-A₂) به میزان ۵ تا ۱۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$ بهره گرفته شد [۱۹]. استحصال تخم و اسپرم از مولدین رسیده و لقاح به روش Amini و همکاران [۲۰] صورت گرفت. تخم‌های لقاح یافته بعد از رفع چسبندگی و جذب آب به سینی‌های انکوباتور منتقل شدند. این بخش از مطالعه در کارگاه تکثیر و پرورش تاس ماهیان مرکز تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر آبزیان شهید رجایی (ساری، مازندران) انجام پذیرفت و از انکوباتورهای یوشچنکو موجود در سوله تکثیر جهت انجام سپری نمودن دوره انکوباسیون استفاده گردید. برای آماده سازی مکان مورد نظر، ابتدا سبدها و کلیه سطوح انکوباتورهای مورد استفاده با آب نمک ضدعفونی و شسته‌وشو شدند. مشخصات فیلترهای مورد استفاده در تحقیق حاضر در جدول ۱ بطور خلاصه ارائه شده است. مجموعاً ۷ فیلتر ساخته شده و مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱- مشخصات فیلترهای مورد استفاده در تحقیق

استفاده از APTES	مشخصات	
	دوز نانو ذرات نقره (%)	تیمارها
-	۰	۱
-	۰/۲ (۰/۰۲ mM/g AgNO ₃)	۲
-	۰/۵ (۰/۰۵ mM/g AgNO ₃)	۳
-	۱ (۰/۱ mM/g AgNO ₃)	۴
+	۰/۲	۵
+	۰/۵	۶
+	۱	۷

نوع بستر مورد استفاده در تمامی فیلترها، زئولیت و سیلیس می باشد.

به منظور کاربرد بسترهای پوشش یافته با نانونقره در سیستم انکوباسیون از پوسته های استوانه ای پلی وینیل کلراید استفاده گردید که دارای یک ورودی و خروجی هستند (ابعاد پوسته استوانه ای: ۴۸ (ارتفاع) × ۶ (قطر) سانتیمتر). در هر فیلتر دو قطعه ابر به صورت لوله ای در بالا و پایین فیلتر قرار گرفت، سپس از بسترهای پوشش یافته با نانوذرات نقره (زئولیت و سیلیس حاوی درصد های وزنی مختلف نانونقره) و یک بستر زئولیت اضافی بعنوان جاذب بهره گرفته شد (تصویر ۱-۲). هر یک از بسترها به میزان ۱۰۰ گرم در توری های نخ با چشمه ۱ میلی متری ریخته شدند. نصب فیلترها در مسیر ورودی آب انکوباتورها در کارگاه تکثیر صورت گرفت. آب مورد استفاده سوله تکثیر مخلوطی از آب رودخانه و چاه مرکز بود. پمپاژ آب در مجموعه انکوباسیون با دبی حدود ۹ لیتر در دقیقه به صورت flow-through صورت گرفت. آب از یک طرف فیلتر وارد و از طرف دیگر آن خارج شده، بدین ترتیب نیروی لازم جهت حرکت اهرم های انکوباتور یوشچنکو فراهم می گشت و از این رو سیستم طراحی شده تفاوتی با روال رایج در سالن های انکوباسیون تاس ماهیان نداشت. در هر انکوباتور مورد استفاده که توسط یک فیلتر تغذیه می شد، تعداد ۷۵۰ تخم در سه تکرار ۲۵۰ تایی قرار داده شد. طی ۱۲ ساعت ابتدایی پس از لقاح، تخم هایی که لقاح نیافته بودند، جمع آوری شده و در محاسبات بازماندگی مراحل انکوباسیون لحاظ نگردیدند. با بررسی و مشاهده دقیق سینی های انکوباتورها بطور روزانه، تخم های قارچ زده جمع آوری و تعداد آن ها ثبت می گردید.



شکل ۱- طرح شماتیک پوسته های فیلتر مورد استفاده در پژوهش حاضر

جهت خالص سازی قارچ ساپروولگنیای مورد نیاز این پژوهش، از تعدادی تخم قارچ زده فیل ماهی تهیه شده از کارگاه تکثیر مرکز شهیدرجایی استفاده گردید. فرآیند خالص سازی از طریق کشت روی محیط GYA و پاساژ دادن صورت گرفت [۲۱].

در آزمایش بازدارندگی از لوله های آزمایش محتوی ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع محتوی گلوکز و عصاره مخمر (فاقد آگار) استفاده شد. ابتدا داخل هر لوله مقادیر ۱ گرم دانه های ژئولیت یا سیلیس محتوی نانوذرات نقره و فاقد آن (کنترل) اضافه گردید. پس از آن به هر یک از لوله ها ۱ میلی لیتر سوسپانسیون قارچی با غلظت 10^3 زئوسپور در میلی لیتر اضافه شد. لوله های تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. پس از طی این مدت، جهت تعیین غلظت قارچ، از هر لوله نمونه برداری و به روش رقت سازی بر روی محیط GYA کشت انجام شد، کشت های حاصله تا ۴۸ ساعت جهت شمارش پرگنه های قارچ مورد بررسی قرار گرفتند و تراکم قارچ در نمونه های دارای نانوذرات نقره با نمونه های شاهد مقایسه گردید. این آزمایشات در ۳ تکرار انجام شد [۲۲].

در طی دوره انکوباسیون، به منظور آلوده سازی آب انکوباتورها، از تخم های آلوده به قارچ ساپروولگنیا استفاده گردید. برای تولید تخم های قارچ زده، ابتدا ۵ میلی لیتر از استوک غلیظ قارچ خالص سازی شده، با ۴۵ میلی لیتر آب مقطر استریل رقیق گردید (بطوریکه در هر میلی لیتر از آب ارلن، 10^3 زئوسپور قارچ تلقیح گردد)؛ سپس از استوک رقیق شده برای آلوده سازی ۴۵ عدد تخم سالم تاس ماهی در ارلن مایه های ۱۵۰ میلی لیتری استفاده گردید. پس از ۲ روز انکوباسیون در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد، سطح تخم ها با رشته های قارچ پوشیده شد (10^{27}) [۱۹]. از روز دوم پس از لقاح تا زمان تفریح تخم ها (مجموعاً به مدت ۳ روز متوالی)، ۱۵ عدد تخم قارچ زده به هر سینی انکوباتور اضافه گردید (۴۵ تخم در هر انکوباتور).

جهت سنجش میزان نقره رهائش یافته از فیلترها در طی دوره انکوباسیون، ۱۲، ۴۸ و ۹۶ ساعت بعد از لقاح، نمونه برداری از آب انکوباتورها با استفاده از ظروف شیشه ای تیره رنگ ۶۰ میلی لیتری صورت گرفت. نمونه ها بلافاصله با استفاده از اسید نیتریک خالص فیکس شدند، بدین صورت که با اضافه کردن اسید نیتریک، pH نمونه ها به کمتر از ۲ رسانده شد (جهت کاهش رسوب و جذب نقره روی سطح دیواره ظروف نگهداری). نمونه ها بعد از فیکس شدن به آزمایشگاه انتقال یافتند و میزان نقره توسط دستگاه طیف سنج جذب اتمی مجهز به کوره گرافیتی سنجش گردیدند.

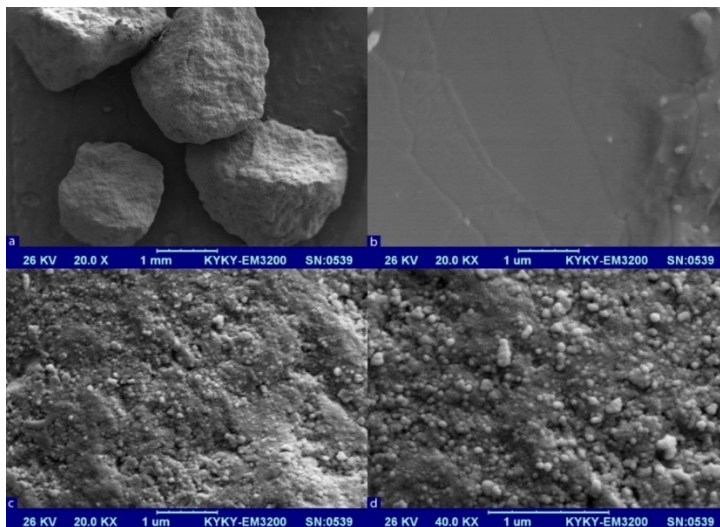
روش های آماری

جهت مقایسه داده ها، ابتدا شرط نرمال بودن داده ها با آزمون Shapiro-Wilk و همگنی واریانس ها بوسیله آزمون Leven بررسی گردید. پس از برقراری شروط فوق، با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) وجود تفاوت معنی دار در داده های بدست آمده در سطح احتمال ۵ درصد بررسی گردید. برای مقایسه میانگین ها از آزمون Tukey استفاده شد.

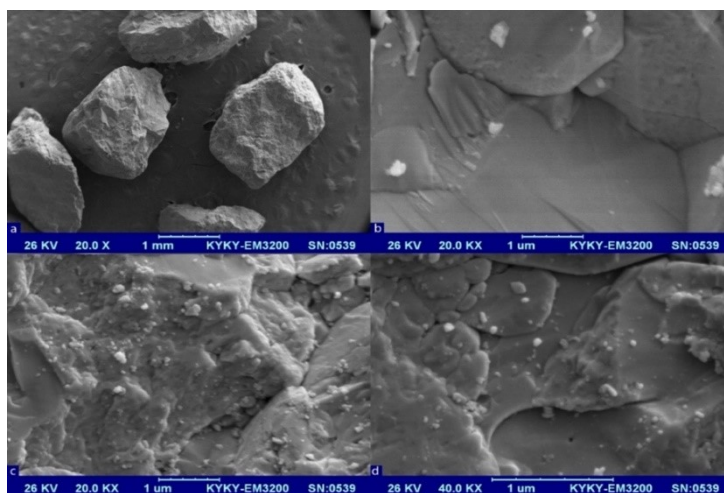
نتایج

ویژگی های بسترهای پوشش یافته با نانوذرات نقره

بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی پیمایشی (تصاویر ۱-۳ و ۲-۳) مشخص نمود که نانوذرات نقره پوشش یافته بر روی بسترهای ژئولیت و سیلیس دارای شکل کروی می باشند. بزرگترین و کوچکترین قطر ذره ای اندازه گیری شده در تصاویر برای بستر ژئولیت به ترتیب ۱۲۷/۷۱ و ۲۲/۹۷ نانومتر و برای بستر سیلیس نیز به ترتیب ۱۳۹/۲ و ۲۲/۲ نانومتر محاسبه گردید. همچنین تنها ۱/۳۵ درصد از ذرات نقره برای ژئولیت و ۳/۳۲ برای سیلیس بزرگتر از ۱۰۰ نانومتر بودند. ۷۶/۱ درصد از نانوذرات نقره پوشش یافته بر روی ژئولیت بین ۳۰ تا ۶۰ نانومتر و ۶۰/۳۹ درصد از ذرات نقره پوشش یافته بر روی سیلیس بین ۴۰ تا ۷۰ نانومتر قطر داشتند.



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی پیمایشگر زئولیت- (a) زئولیت معمولی با بزرگنمایی ۲۰ برابر، (b) زئولیت شاهد با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ برابر، (c) زئولیت پوشش داده شده با نانوذرات نقره با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ برابر، (d) زئولیت پوشش داده شده با نانوذرات نقره با بزرگنمایی ۴۰۰۰۰ برابر.

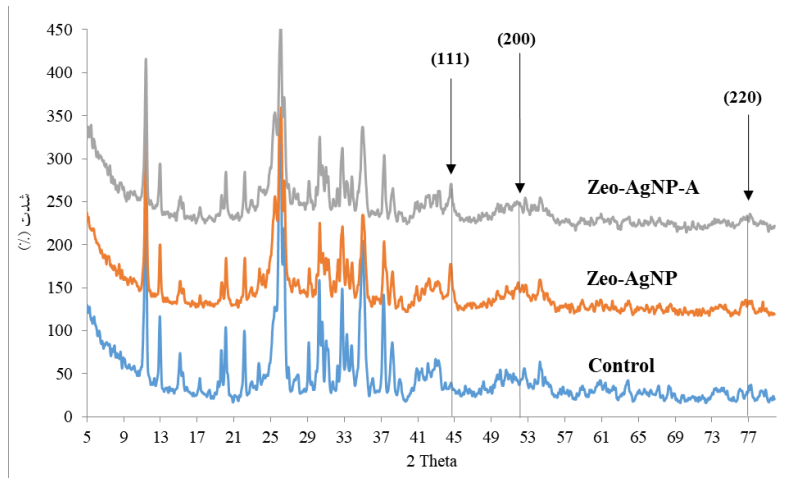


شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی پیمایشگر سیلیس- (a) سیلیس معمولی با بزرگنمایی ۲۰ برابر، (b) سیلیس شاهد با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ برابر، (c) سیلیس پوشش داده شده با نانوذرات نقره با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ برابر، (d) سیلیس پوشش داده شده با نانوذرات نقره با بزرگنمایی ۴۰۰۰۰ برابر.

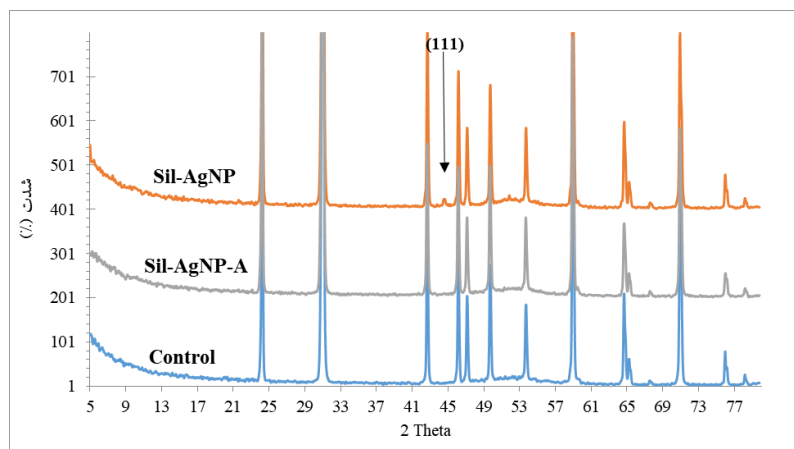
همچنین نانوذرات نقره پوشش یافته بر روی زئولیت دارای میانگین قطر و انحراف معیار قطر به ترتیب $49/72$ و $15/97$ نانومتر و بر روی سیلیس به ترتیب $56/97$ و $19/32$ نانومتر بودند.

در الگوهای حاصل از طیف سنجی پراش اشعه ایکس بستر زئولیت برای تیمار شاهد، فاز اصلی پیک‌ها نشان دهنده کلینوپتیلولیت با ساختار کریستالی از نوع Monoclinic می باشد، که دارای فرمول شیمیایی $[(Na, K, Ca)_2 \cdot 5Al_3(Al, Si)2Si_{13}O_{36} \cdot 12(H_2O)]$ می باشد. در تیمار زئولیت نقره دار شده همراه با گروه عاملی آمینی، پیک‌هایی در زاویه های $44/56^\circ$ و $76/66^\circ$ به ترتیب با شدت های $16/93\%$ و $4/98\%$

دارای ساختار کریستالی Cubic نشان داده شده است. نتایج برای تیمار ژئولیت نقره دار شده بدون عامل آمینی در زاویه‌های $44/55^\circ$ ، $51/97^\circ$ و $76/71^\circ$ به ترتیب دارای شدت‌های $24/50\%$ ، $6/9\%$ و $6/7\%$ و دارای ساختار کریستالی Cubic بر اساس مرجع کارت استاندارد JCPDS با شماره کارت ۰۴-۰۷۸۳ [۲۳] مطابقت دارد (نموار ۳-۳). الگوهای بستر سیلیس برای گروه شاهد دارای فاز اصلی کوارتز (Silicon oxide) با ساختار کریستالی (Hexagonal) می‌باشد که دارای فرمول شیمیایی (SiO_2) می‌باشد و با کارت استاندارد JCPDS با شماره ۴۶-۱۰۴۵ مطابقت دارد. در تیمار سیلیس نقره‌دار شده پیکی در زاویه $44/54^\circ$ با شدت $0/28\%$ دارای ساختار کریستالی (Cubic) نمایش داده شده است که با کارت استاندارد JCPDS با شماره ۴-۷۸۳ مطابقت دارد. در تیمار سیلیس نقره‌دار شده همراه با گروه عاملی آمینی، ساختار کریستالی نقره مشاهده نگردید (شکل ۵).



شکل ۴- الگوی طیف سنجی پراش اشعه ایکس بستر ژئولیت: Control- ژئولیت پوشش نیافته؛ Zeo-AgNP- ژئولیت پوشش یافته با نانوذرات نقره؛ Zeo-AgNP-A- ژئولیت عامل‌دار شده و پوشش یافته با نانوذرات نقره

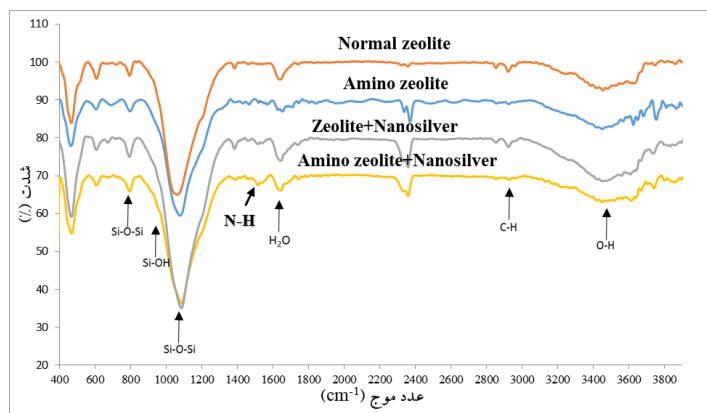


شکل ۵- الگوی طیف سنجی پراش اشعه ایکس بستر سیلیس: Control- سیلیس پوشش نیافته؛ Sil-AgNP- سیلیس پوشش یافته با نانوذرات نقره؛ Sil-AgNP-A- سیلیس عامل‌دار شده و پوشش یافته با نانوذرات نقره

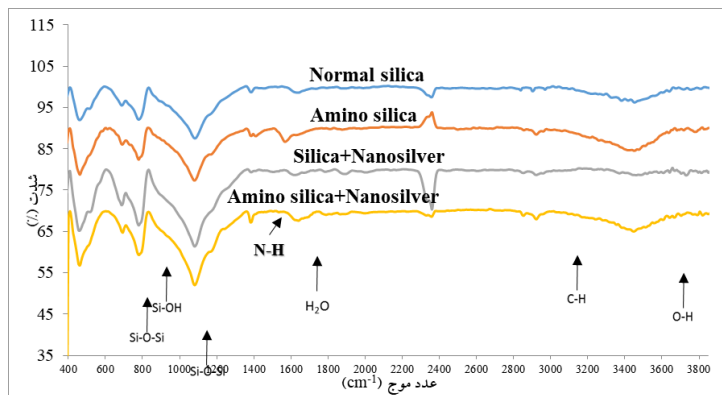
نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی موجود در ژئولیت و سیلیس معمولی و نیز ژئولیت و سیلیس عامل‌دار شده با ترکیب APTES و پوشش یافته با درصد‌های وزنی مختلف نانوذرات نقره با استفاده از طیف سنج فلورسانس اشعه ایکس در جدول ۲ آورده شده است. همانطور که جدول نشان می‌دهد در مورد حضور نقره در نمونه‌های ژئولیت و سیلیس پوشش یافته با ۱٪ درصد وزنی نقره، درصد واقعی نقره برای ژئولیت عامل‌دار شده با

ترکیب APTES، ۵۲٪ و زئولیت بدون عامل آمینی ۴۴٪ و برای سیلیس عامل‌دار شده ۹۶٪ و سیلیس بدون عامل آمینی ۳۶٪ می باشد. همچنین SiO_2 به میزان ۷۹/۱۱٪ در زئولیت و ۹۷/۸۹٪ در سیلیس می باشد.

آنالیز FTIR نشان دهنده گروه های عاملی و تایید کننده روند آمین دار کردن بسترها می باشد. طیف حاضر در شکل های ۶ و ۷ برای بسترهای زئولیت و سیلیس پیک هایی را در طول موج ۸۰۰، ۹۵۰، ۱۱۰۰، ۱۶۳۰ و 3430 cm^{-1} نشان می دهند. پهنای باند در عدد موج ۳۴۳۰ مربوط به ارتعاش های مختلف O-H می باشد این پیوند بر روی سطح گروه سیلانول قرار دارد [۲۴]. پیوندی که در محل 1630 cm^{-1} وجود دارد اختصاص به مولکول H_2O دارد. این ها مولکول هایی هستند که در داخل حفرات قرار گرفته اند و به بستر سیلیس متصل می باشند. باندهای شدیدی که در محدوده ۸۰۰ و 1100 cm^{-1} دیده می شوند، به ترتیب مربوط به پیوند کشیده و خمیده Si-O-Si می باشد. باندهای که در محدوده 950 cm^{-1} وجود دارد مربوط به ارتعاش Si-OH است. کاهش شدت این باند بعد از عامل دار شدن نشان دهنده فشردن شدن گروه سیلان از پل سیلوکسان می باشد. باندهای که در 2973 cm^{-1} – 2880 cm^{-1} و 1472 cm^{-1} – 1389 cm^{-1} مشخص است مربوط به ارتعاشات کشیده و خمیده پیوند C-H در رادیکال های ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان می باشد. در طیف 1541 cm^{-1} – 1595 cm^{-1} پیک مربوط به N-H آمینوپروپیل مشخص است [۲۴].



شکل ۶- طیف FTIR نمونه های گروه شاهد (زئولیت معمولی)، زئولیت عامل دار شده، زئولیت پوشش یافته با نانوذرات نقره بدون عامل آمینی، زئولیت عامل دار شده و پوشش یافته با نانوذرات نقره.



شکل ۷- طیف FTIR نمونه های گروه شاهد (سیلیس معمولی)، سیلیس عامل دار شده، سیلیس پوشش یافته با نانوذرات نقره بدون عامل آمینی، سیلیس عامل دار شده و پوشش یافته با نانوذرات نقره.

جدول ۲- درصد وزنی ترکیب شیمیایی در زئولیت و سیلیس معمولی و آمین دار شده‌ی پوشش داده شده با درصد‌های متفاوت نانوذرات نقره

	Zeo- Control	Zeo- AgNP 0.2%	Zeo- AgNP 0.2%- A	Zeo- AgNP 0.5%	Zeo- AgNP 0.5%- A	Zeo- AgNP 1%	Zeo- AgNP 1%- A	Sil- Control	Sil- AgNP 0.2%	Sil- AgNP 0.2%- A	Sil- AgNP 0.5%	Sil- AgNP 0.5%- A	Sil- AgNP 1%	Sil- AgNP 1%- A
Ag	-	۰/۱	۰/۱۴	۰/۲۳	۰/۳۱	۰/۴۴	۰/۵۲	-	۰/۰۹۷	۰/۱۹۵	۰/۱۳	۰/۴۱۱	۰/۳۶۴	۰/۹۶۱
Na ₂ O	۳/۰۲۳	۲/۵۵۶	۲/۶۹۸	۲/۳۰۱	۲/۴۴۱	۱/۸۳۶	۱/۸۳۵	۰/۷۷	۰/۷۲۹	۰/۶۴۱	۰/۸۰۵	۰/۷۲۳	۰/۸۳۹	۰/۶۸۶
MgO	۱/۱۳۴	۰/۷۱۱	۰/۷۴۷	۰/۶۹۲	۰/۷۰۱	۰/۶۸۳	۰/۶۸۲	۰/۱۱۷	۰/۱	۰/۹۴۴	۰/۷۰۲	۰/۹۸۵	۰/۰۷۱	۰/۰۸۳
Al ₂ O ₃	۱۱/۹۷	۰/۸۲۶	۰/۸۹۲	۰/۸۰۴	۰/۸۵۵	۷/۹۳۶	۷/۸۵	۰/۶۱۶	۰/۵۳۴	۰/۷۱۶	۰/۶۱۳	۰/۶۶۶	۰/۴۵۹	۰/۶۷۹
SiO ₂	۷۹/۱۱۸	۹۲/۲۱۸	۹۱/۹۳	۹۲/۴۱۳	۹۲/۲۰۶	۸۵/۵۹۲	۸۵/۷۲۲	۹۷/۸۸۹	۹۷/۹۱۷	۹۶/۹۴	۹۷/۳۷۲	۹۵/۵۴۵	۹۷/۵۰۳	۹۶/۰۰۸
SO ₃	۰/۱۰۸	۰/۰۹۲	۰/۰۸۳	۰/۰۷۸	۰/۰۹۶	۰/۰۷۵	۰/۰۸۱	۰/۰۴۲	۰/۱۳۳	۰/۰۹۱	-	-	۰/۲۴۱	-
P ₂ O ₅	۰/۰۳	-	-	-	-	-	-	۰/۰۳۷	-	-	-	-	-	-
Cl	-	۰/۰۶۱	۰/۰۳۹	۰/۰۴۴	۰/۰۴	۰/۱۲۲	۰/۰۵۱	-	-	-	-	-	-	-
CaO	۱/۳۴	۰/۵۳۲	۰/۵۰۷	۰/۴۹	۰/۴۲۹	۰/۴۸۸	۰/۴۲۷	۰/۳۲۲	۰/۲۹۴	۰/۳۲۴	۰/۱۹۵	۰/۱۷۳	۰/۲۶۵	۰/۱۲۲
K ₂ O	۱/۷۲۱	۱/۶۹۷	۱/۷۲۲	۱/۷۱۶	۱/۷	۱/۷۳۷	۱/۶۳۶	۰/۱۵۹	۰/۱۴۱	۰/۱۳	۰/۰۵۲	۰/۱۰۱	۰/۱۳	-
Zr	۰/۰۲۹	۰/۰۲۳	۰/۰۱۹	۰/۰۲	۰/۰۲۵	-	۰/۰۱۹	-	-	-	-	-	-	-
TiO ₂	۰/۱۶۱	۰/۱۷۳	۰/۱۸۲	۰/۱۸۲	۰/۱۸۵	۰/۱۹۶	۰/۲۰۲	-	-	-	-	-	-	-
Fe ₂ O ₃	۱/۲۳۴	۰/۹۵۵	۰/۹۹۷	۰/۹۶۱	۰/۹۳۸	۰/۸۴۵	۰/۹۰۹	-	-	-	-	-	-	-
Rb	۰/۰۱	-	-	-	-	-	۰/۰۱	-	-	-	-	-	-	-
Sr	۰/۱۲۱	۰/۰۵۶	۰/۰۴۴	۰/۰۶۹	۰/۰۶۴	۰/۰۵۱	۰/۰۵۸	-	-	-	-	-	-	-
Sb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱/۳۵۵	-	۱/۴۶۱
Pb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۰/۰۱۹	-	-	۰/۰۲۴	-
Zn	-	-	-	-	-	-	-	۰/۰۴۷	۰/۰۵۵	-	۰/۱۳۱	۰/۰۴۱	۰/۱۰۳	-

آزمایش بازدارندگی داخل لوله (خاصیت ضدقارچی بسترهای محتوی نانوذرات)

هدف از انجام این آزمایش بررسی توانایی بسترهای محتوی نانوذرات نقره در مهار رشد قارچ در شرایطی که نیازهای غذایی قارچ از طریق محیط کشت بطور کامل فراهم است بود. در لوله های آزمایش حاوی بسترهای زئولیت و سیلیس عامل دار شده و نیز بدون عامل که بوسیله نانوذرات نقره پوشش داده شده بودند، قارچ ساپروولگنیا قادر به رشد نبود، اما در لوله های حاوی بسترهای زئولیت و سیلیس معمولی، تراکم قارچ پس از ۲۴ ساعت از ۱۰۰۰ ژئوسپور در میلی لیتر به ترتیب به ۳۸۰۰ و ۴۵۰۰ ژئوسپور در میلی لیتر افزایش یافت. بنابراین بسترهای پوشش داده شده با نانوذرات نقره قادر به مهار رشد قارچ بطور کامل بودند.

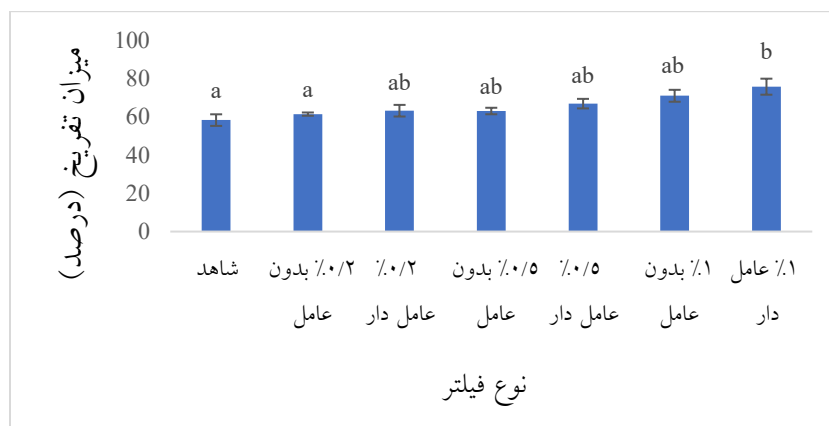
بررسی کارایی فیلترهای محتوی نانونقره در سیستم انکوباسیون تاس ماهی ایرانی

طی دوره انکوباسیون تخم‌ها، ویژگی های کیفی آب در دامنه مطلوب برای ماهی تاس ماهی ایرانی بود، میانگین درجه حرارت، اکسیژن محلول و pH در این مدت به ترتیب 18.7 ± 0.8 ، 9.15 ± 0.9 و 8.05 ± 0.1 اندازه گیری شد؛ برخی ویژگی‌های شیمیایی آب در جدول ۳ ارائه گردیده است. در این دوره، تقریباً از روز سوم بعد از لقاح، عفونت قارچی در تمامی تیمارها باستثناء فیلترهای محتوی ۱ درصد نانوذرات نقره مشاهده گردید. کلونی‌های قارچ به صورت توده های پنبه مانند به رنگ سفید در سطح تخم‌ها قابل مشاهده بود که سبب چسبیدن تخم های سالم مجاور به یکدیگر و نهایتاً مرگ آنها نیز می شد. در ۴۸ ساعت ابتدایی انکوباسیون که منطبق بر رشدونمو جنینی تا پیش از مرحله شروع نورولاسیون می گردد، علیرغم شروع آلوده سازی آب انکوباتورها، عفونت قارچی در هیچیک از تیمارهای مورد بررسی دیده نشد.

جدول ۳- برخی ویژگی‌های شیمیایی آب کارگاه تکثیر مرکز شهید رجایی

شاخص شیمیایی	سختی کل	کلسیم	منیزیم	سدیم	کلراید	ماده آلی کل
مقدار (میلی گرم بر لیتر)	۱۷۰	۶۴/۷	۱۹/۴	۳۴/۳	۷۵/۱	۱۲/۵۶

شکل ۸ نشان می‌دهد که در تیمار فیلترهای ۱٪ عامل دار، درصدهای تفریح به طور معنی‌داری نسبت به تیمار فیلتر شاهد، افزایش نشان دادند ($P < 0.05$).



شکل ۸- میزان تفریح جنین‌ها در فیلترهای مختلف

نتایج حاصل از سنجش میزان رهایش نقره از فیلترهای مورد مطالعه در جدول ۴ نمایش داده شده است. آنالیز آماری مقادیر اندازه‌گیری شده نقره در پایان ۱۲ ساعت ابتدایی شروع انکوباسیون نشان می‌دهد که میزان رهایش نقره در آب، در تیمارهای فیلترهای ۱٪ بدون عامل و عامل دار بطور معنی‌داری بیشتر از سایر فیلترهای محتوی نانوذرات نقره بود ($P < 0.05$). این روند در زمان‌های بعدی نمونه برداری (۴۸ و ۹۶ ساعت) نیز تکرار شد با این تفاوت که میزان رهایش تنها در تیمار فیلتر ۱٪ عامل دار بطور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0.05$). این در حالی است که در بررسی نمونه‌های آب فیلتر شاهد، رهایش نقره ثبت نشد. بررسی میزان رهایش نقره از هر یک از فیلترها بطور جداگانه در طول این بازه زمانی بیانگر کاهش معنی‌داری آن بعد از گذشت ۴۸ ساعت می‌باشد ($P < 0.05$).

جدول ۴- میانگین رهایش نقره در آب سیستم‌های انکوباسیون در ساعت‌های ۱۲، ۴۸ و ۹۶ پس از لقاح

میانگین غلظت نقره (میکروگرم/لیتر)			فیلتر مورد استفاده
ساعت ۹۶	ساعت ۴۸	ساعت ۱۲	
۰	۰	۰	شاهد
$0.72 \pm 0.08^{a, A}$	$0.61 \pm 0.19^{a, A}$	$1.77 \pm 0.42^{a, A}$	۰/۲٪ بدون عامل
$0.55 \pm 0.03^{a, A}$	$0.92 \pm 0.13^{a, A}$	$2.44 \pm 0.66^{a, B}$	۰/۲٪ عامل دار
$0.89 \pm 0.25^{a, A}$	$0.96 \pm 0.09^{a, A}$	$3.05 \pm 0.54^{a, B}$	۰/۵٪ بدون عامل
$0.84 \pm 0.07^{a, A}$	$1.02 \pm 0.16^{a, A}$	$5.32 \pm 0.81^{a, B}$	۰/۵٪ عامل دار
$1.56 \pm 0.25^{a, A}$	$2.13 \pm 0.97^{a, A}$	$16.21 \pm 1.13^{b, B}$	۱٪ بدون عامل
$5.92 \pm 1.88^{b, A}$	$7.84 \pm 1.46^{b, A}$	$14.47 \pm 2.73^{b, B}$	۱٪ عامل دار

در هر سطر میانگین‌های دارای حروف بالانویس بزرگ متفاوت، با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند (آنالیز واریانس یک‌طرفه؛ $P < 0.05$)؛ در هر ستون میانگین‌های دارای حروف بالانویس کوچک متفاوت، با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند (آنالیز واریانس یک‌طرفه؛ $P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

در بحث استفاده از فیلترهای حاوی نانوذرات نقره، پس از سنتز آنها بر روی بسترهای زئولیت و سیلیس عامل دار شده با ترکیب آمینوسیلان (به روش کاهش شیمیایی)، بررسی ویژگی‌های پوشش حاصله و همچنین تایید اصلاح سطوح بسترها با عامل آمینی به وسیله XRF, XRD, SEM و FTIR انجام گرفت.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی پیمایشی استخراج شده از بسترهای مورد مطالعه (تصاویر ۱-۳ و ۲-۳) نشان می‌دهد که به ترتیب حدود ۹۸/۶٪ و ۹۶/۷٪ ذرات نقره سنتز شده بر روی زئولیت و سیلیس در محدوده ۱ تا ۱۰۰ نانومتر قرار داشتند که مطابق تعاریف موجود فناوری در محدوده نانومواد بود. میانگین قطر اندازه ذرات نقره برای بستر زئولیت ۴۹/۷ و برای بستر سیلیس ۵۶/۹۸ نانومتر اندازه‌گیری گردید. این ذرات دارای شکل کروی بودند و به صورت یکنواخت بر روی بسترها سنتز شدند، که با نتایج Lv و همکاران [۲۵]، Johari و همکاران [۵]، Sarkheil و همکاران [۸] و Torres-Flores و همکاران [۲۶] نیز مطابقت داشت.

در الگوهای حاصل از طیف سنجی پراش اشعه ایکس بستر زئولیت (شکل ۴)، پیک‌های مربوط به نقره بر اساس کارت استاندارد JCPDS با شماره ۴-۷۸۳ مشخص گردید که نشان‌دهنده ساختار کریستالی نانوذرات نقره سنتز شده بر روی زئولیت می‌باشد. این نتایج برای بستر سیلیس نقره‌دار شده هم قابل مشاهده بود که با نتایج Lv و همکاران [۲۵]، Quang و همکاران [۲۷] و Zarrinmehr [۲۸] همخوانی دارد؛ اما عدم نمایش ساختار کریستالی برای بستر سیلیس نقره‌دار شده به همراه اصلاح آمینی می‌تواند به دلیل اندازه‌ی بسیار کوچک بلورهای نانوذرات نقره در این بستر باشد که با طیف سنجی پراش اشعه ایکس قابل ردیابی نبوده است [۲۸].

در این پژوهش میزان نقره پوشش داده شده روی بسترها به صورت اسمی انجام گرفت، اما سنجش میزان واقعی نقره و همچنین عناصر تشکیل دهنده بسترهای زئولیت و سیلیس با استفاده از روش طیف‌سنجی فلورسانس اشعه ایکس نشان داد که در تمام بسترها مقادیر واقعی نقره کمتر از مقادیر پیش بینی شده بودند (جدول ۲) که با مطالعه Quang و همکاران [۲۷]، Johari و همکاران [۵] و Zarrinmehr [۲۸] مطابقت داشت. در مجموع، این مقادیر واقعی ملاک تعیین حد استفاده از این بسترها در سیستم فیلتراسیون آب می‌باشد. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که بسترهایی که ابتدا بوسیله ترکیب آمینوسیلان اصلاح گردیده‌اند و سپس نانوذرات نقره بر روی آن‌ها سنتز شده است، میزان پوشش نقره بر روی این بسترها در مقایسه با بسترهای اصلاح نشده- به ویژه در بستر سیلیس- بیشتر است. بطوری که این میزان در بستر سیلیس ۰/۵٪-اسمی نقره در حالت عامل دار شده حدود ۴ برابر حالت بدون عامل است.

در نتایج طیف سنجی مادون قرمز، باندهای که در $2880-2973\text{ cm}^{-1}$ و $1389-1472\text{ cm}^{-1}$ مشخص است مربوط به ارتعاشات کشیده و خمیده پیوند C-H در رادیکال‌های ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان می‌باشد. همچنین در طیف $1541-1595\text{ cm}^{-1}$ پیک مربوط به N-H آمینوپروپیل مشخص است [۲۴]. نمایش این پیوندها نشان دهنده اتصال موفقیت آمیز گروه آمینی بر روی بستر سیلیس و زئولیت می‌باشد که با یافته‌های Bae و همکاران [۲۹] مطابقت دارد.

در رابطه با خصوصیات ضدقارچی نانوذرات نقره، Johari و همکاران [۵] نشان دادند که در شرایط آزمایشگاهی این ماده قادر به مهار کامل قارچ ساپروولگنیا در غلظت ۱۸۰۰ میلی گرم در لیتر است. بر اساس نظر Bailey، یکی از معیارهای انتخاب داروهای ضدقارچی در آبی‌پروری، این است که در غلظت کمتر از ۱۰۰ میلی گرم در لیتر قادر به مهار کامل قارچ باشند [۳۰]. همچنین Soltani و همکاران [۳۱] نیز نشان دادند که کلوتید نانوذرات نقره در مقایسه با مالاشیت گرین، بعنوان یک داروی شیمیایی از پتانسیل بالایی برای مهار قارچ ساپروولگنیا برخوردار نیست؛ مگر در حالتی که از غلظت‌های بالای آن برای درمان این قارچ استفاده گردد که این حالت نیز به دلیل ایجاد سمیت برای ماهیان امکان پذیر نمی‌باشد و این مسئله دلیلی برای استفاده غیرمستقیم از این ترکیب در مطالعه حاضر بود. همچنین، اگرچه میزان حداقل غلظت بازدارنده نانوذرات نقره برای مهار قارچ ساپروولگنیا، نسبت به سایر مواد شیمیایی نظیر مالاشیت گرین بالاتر است، اما مزیتی که نانوذرات نقره نسبت به سایر مواد شیمیایی دارند قابلیت مخلوط کردن آن‌ها با مواد اولیه مختلف و قابلیت پوشش دادن آن‌ها با مواد اولیه مختلف و قابلیت پوشش دادن آن‌ها بر روی بسترهای مختلف است. همچنین نانوذرات نقره را می‌توان بر روی انواع بسترهای طبیعی و مصنوعی پوشش داد که در نتیجه سطح این بسترها خواص

ضدمیکروبی پیدا خواهد کرد. در مقابل ماده ای همچون مالاشیت گرین، فاقد قابلیت پوشش دهی و یا مخلوط سازی است. در واقع همین ویژگی نانوذرات نقره است که باعث گردیده امروزه از آن در ساخت انواع ابزار و وسایل ضدمیکروبی، همچون ابزار بیمارستانی، پوشاک، رنگ‌ها، سرامیک، استیل، لوازم منزل و غیره استفاده گردد.

در مطالعه حاضر ویژگی‌های ضدمیکروبی بسترهای زئولیت و سیلیس محتوی نانوذرات نقره در آزمایش بازدارندگی داخل لوله به اثبات رسید. همانطور که در قسمت نتایج بدان اشاره شد، در لوله های آزمایش حاوی بسترهای زئولیت و سیلیس عامل دار شده و نیز بدون عامل که بوسیله نانوذرات نقره پوشش داده شده بودند، قارچ ساپروولگنیا قادر به رشد نبود، اما در لوله های حاوی بسترهای زئولیت و سیلیس معمولی، تراکم قارچ پس از ۲۴ ساعت از ۱۰۰۰ زئوسپور در میلی لیتر به ترتیب به ۳۸۰۰ و ۴۵۰۰ زئوسپور در میلی لیتر افزایش یافت که این نتیجه با نتایج Johari [۲۱] مطابقت داشت. تاکنون فرآیندهای مختلفی برای فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره گزارش شده است [۱۱، ۱۲ و ۳۲]؛ گزیده ای از این فرآیندها عبارتند از: ۱- تغییر و تخریب ساختار غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها که باعث افزایش نفوذپذیری و بهم زدن کارایی نقل و انتقالی آن گردیده و باعث مرگ سلولی می گردد؛ ۲- نفوذ نانوذرات نقره به داخل سلول و برهم کنش با ترکیبات حاوی فسفر و سولفور از قبیل پروتئین‌ها و اسید دزوکسی ریبونوکلیک؛ ۳- از بین بردن قابلیت همانندسازی رشته DNA؛ ۴- غیرفعال سازی برخی آنزیم‌ها؛ ۵- حمله به زنجیره تنفسی؛ ۶- تولید پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های آزاد. در مورد قارچ‌ها، Kim و همکاران [۱۲] مکانیزم عمل نانوذرات نقره را اختلال در غشای سلول و ممانعت در فرآیند معمول جوانه زدن از طریق از بین بردن یکپارچگی غشا عنوان نمودند. از این رو در مطالعه حاضر، ساز و کار ضدقارچی بسترهای پوشش یافته با نانوذرات نقره، قارچ کشی و نیز ممانعت از رشد آنها در سیستم انکوباسیون می باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هیچ یک از فیلترهای مورد بررسی برای تخم‌های تاس ماهیان کشنده نبودند؛ در حالی که Johari و همکاران [۵] نشان دادند که فیلترهای محتوی ۱٪ وزنی- اسمی نانوذرات نقره برای تخم‌های قزل‌آلای رنگین کمان سبب بروز تلفات ۱۰۰ درصدی شدند. این تفاوت در عملکرد را می توان به دلیل تفاوت در: (۱) نحوه انکوباسیون تخم‌های دو گونه (طول مدت انکوباسیون و انکوباتورهای مورد استفاده)، (۲) در جریان بودن آب مورد استفاده در سیستم (در حالی که در مطالعه Johari و همکاران [۵]، سیستم مدار بسته با تعویض آب روزانه اجرا گردیده بود)، (۳) مقدار وزنی بستر پوشش یافته بکار رفته (در مطالعه Johari و همکاران [۵]، در هر فیلتر ۴۰۰ گرم بستر پوشش یافته بکار رفته بود)، (۴) استفاده از عامل جفت شونده آمینوسیلان در مطالعه حاضر و (۵) میزان رهایش کمتر نقره از فیلترهای حاضر، دانست. بطور کلی در این مطالعه فیلترهای محتوی ۱٪ وزنی- اسمی نانوذرات نقره عامل دار شده توانستند علاوه بر کنترل کامل عفونت قارچی باعث افزایش کارایی تکثیر در گونه تاس ماهی ایرانی (افزایش معنی دار درصد تفریخ و درصد بازماندگی لاروهای حاصل) گردند.

رهایش نقره از فیلترها یکی از فاکتورهای مهم در فیلتراسیون آب می باشد که نه تنها بر کارایی ضدمیکروبی و مدت زمان قابل استفاده فیلترها تاثیرگذار است بلکه بر کیفیت آب نیز تاثیر می گذارد. مقایسه نتایج میزان رهایش نقره از فیلترهای ۱٪ نشان می دهد که فیلترهای عامل دار بواسطه وجود آمینوسیلان، رهایش نقره کنترل شده‌ای را بروز داده‌اند و شاهد ثبات نسبی رهایش نقره در دو نمونه گیری ساعات ۴۸ و ۹۶ بوده ایم، موضوعی که در مطالعات Chernousova و Epple [۳۳] و Hanim و همکاران [۳۴] مورد تایید قرار گرفته بود. با توجه به اینکه نقره‌ی رهایش یافته در آب می تواند اثرات مخربی بر سلامتی انسان و سایر موجودات زنده داشته باشد، میزان رهایش آن باید زیر حد مجاز بوده و کنترل گردد [۳۵] آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (US EPA: United States Environmental Protection Agency) و سازمان بهداشت جهانی (WHO: World Health Organization) سطح مجاز آلودگی آب آشامیدنی با نقره را کمتر از ۰/۱ ppm وضع نموده اند. نتایج بدست آمده در این مطالعه از سطح فوق تبعیت می کند؛ بطوریکه میزان رهایش نقره در تیمار بهینه (۱٪ وزنی- اسمی) و نیز سایر تیمارها بسیار کمتر از ۰/۱ ppm می باشد که با نتایج مطالعه Zarrinmehr [۲۸] و Quang [۲۷] مطابقت دارد. Johari و همکاران [۵] نشان دادند که در تیمار بهینه (۰/۵٪ وزنی- اسمی) میزان رهایش نقره کمتر از حد مجاز بود اما در تیمار ۱٪ وزنی- اسمی که منجر به تلفات ۱۰۰ درصدی گردیده بود این میزان بالاتر از حد مجاز بود.

نتیجه گیری نهایی

در مجموع در این مطالعه بهره‌گیری از روش کاهش شیمیایی یون نقره به وسیله سدیم بورهیدرات برای سنتز نانوذرات نقره از کارایی مناسبی برخوردار بوده و فیلترهای محتوی ۱٪ وزنی-اسمی نانوذرات نقره عامل دار شده توسط APTES همراه با جاذب زئولیت توانستند ضمن کنترل کامل عفونت قارچی باعث افزایش کارایی تکثیر در گونه تاس‌ماهی ایرانی گردند. علی‌رغم استفاده غیرمستقیم از نانوذرات در این بخش، کاربردی شدن این فیلترها نیازمند بررسی بیشتر ابعاد اثرات نامطلوب نانوذرات رهایش یافته از آنها می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای مهندس نوری، مسئول محترم کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری و سایر کارکنان مرکز تکثیر، پرورش و بازسازی ذخایر آبزیان شهید رجایی به دلیل همکاری‌های‌شان قدردانی می‌نمایم. همچنین از کمک‌ها و راهنمایی‌های جناب آقای دکتر مرتضی کمالی و جناب آقای دکتر حسین نورانی از دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- [1] Alavi-Yeganeh MS, Falahatkar B. Length-Weight relationship and fecundity of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) female broodstocks along the southern coast of the Caspian Sea. *Journal of Fisheries Science & Technology*. 2014 Mar 1;3(1). in Persian
- [2] Bauer, O.N., Pugachev, O.N. and Voronin, V.N., 2002. Study of parasites and diseases of sturgeons in Russia: a review. *Journal of Applied Ichthyology*, 18, 420-429.
- [3] Yisa, T.A., Tsady, S.M., Aidoo, T., Ibrahim, A., Gana, E.S. and Adama, B.S., 2014. Effect of chemical disinfectant (formalin) on hatching of eggs of African catfish (*Clarias gariepinus*), survival and growth performance of fry. *International Journal of Current Microbiology*, 3(3), 1133-1138.
- [4] Ghorbani Vaghei, R., Hoseinpour Zelti, A., Bagherzadeh Lakani, F., Alipour, A.R. and Yeganeh, H., 2020. The use of trifluralin to control fungal infection and to increase hatching rate of fertilized eggs of brood ship sturgeon (*Acipenser nudiventris*) in Guilan Province. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(4), pp.1944-1953.
- [5] Johari, S.A., Kalbassi, M.R., Soltani, M. and Yu, I.J., 2016. Application of nanosilver-coated zeolite as water filter media for fungal disinfection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Aquaculture international*, 24, pp.23-38.
- [6] Pottinger TA, Day JG. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. *Diseases of aquatic organisms*. 1999 May 12;36(2):129-41.
- [7] Bruno D.W., Wood B.P., 1999. *Saprolegnia* and other Oomycetes. In: Woo, P. T. K., Bruno, D.W. (editors), *Fish Diseases and Disorders. Viral, Bacterial and Fungal Infections*, Vol. 3. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, United Kingdom, 930 p.
- [8] Sarkheil, M., Sourinejad, I., Mirbakhsh, M., Kordestani, D. and Johari, S.A., 2016. Application of silver nanoparticles immobilized on TEPA-Den-SiO₂ as water filter media for bacterial disinfection in culture of Penaeid shrimp larvae. *Aquacultural Engineering*, 74, pp.17-29.

- [9] Banan A, Kalbassi Masjed Shahi MR, Bahmani M, Yazdani Sadati MA. Toxicity of Silver Nanoparticles in Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) and Starry Sturgeon (*Acipenser stellatus*) during Early Life Stages. *Fisheries Science and Technology*. 2016 Jun 10;5(1):15-26. in Persian
- [10] Piecuch, A., Targońska, S., Rewak-Sorczyńska, J., Ogórek, R. and Wiglusz, R.J., 2023. New silicate-substituted hydroxyapatite materials doped with silver ions as potential antifungal agents. *BMC microbiology*, 23(1), p.193.
- [11] Rai, M., Yadav, A., Gade, A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. 27, 76-83.
- [12] Kim K.J., Sung W.S., Suh B.K., Moon S.K., Choi J.S., Kim J.G., Lee D.G., 2009. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*, *Biometals*, 22 (2): 235–242.
- [13] Singh, R., Mehra, R., Walia, A., Gupta, S., Chawla, P., Kumar, H., Thakur, A., Kaushik, R. and Kumar, N., 2023. Colorimetric sensing approaches based on silver nanoparticles aggregation for determination of toxic metal ions in water sample: a review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 103(6), pp.1361-1376.
- [14] Banu, A.N., Kudesia, N., Raut, A.M., Pakrudheen, I. and Wahengbam, J., 2021. Toxicity, bioaccumulation, and transformation of silver nanoparticles in aqua biota: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(6), pp.4275-4296.
- [15] Ibrahim, R.E., Elshopakey, G.E., Abd El-Rahman, G.I., Ahmed, A.I., Altohamy, D.E., Zagloul, A.W., Younis, E.M., Abdelwarith, A.A., Davies, S.J., Al-Harhi, H.F. and Rahman, A.N.A., 2022. Palliative role of colloidal silver nanoparticles synthesized by moringa against *Saprolegnia* spp. infection in Nile Tilapia: Biochemical, immun-antioxidant response, gene expression, and histopathological investigation. *Aquaculture Reports*, 26, p.101318.
- [16] Qu K, Xu H, Zhao C, Ren J, Qu X. Amine-linker length dependent electron transfer between porphyrins and covalent amino-modified single-walled carbon nanotubes. *RSC advances*. 2011;1(4):632-9.
- [17] Lee, K. J. Nallathamby, P. D. Browning, L. M. Osgood, C. J. and Xu, X. 2007. *In vivo* imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of Zebrafish embryos. *ACS Nano*. 1(2), 133-143.
- [18] Connolly A. *Metastable Phase Formation and Materials Discovery in Complex Oxide Thin Films via Laser Spike Annealing* (Doctoral dissertation, Cornell University). 2023 August.
- [19] Aramli MS, Nazari RM. Motility and fertility of cryopreserved semen in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, stored for 30–60 min after thawing. *Cryobiology*. 2014 Dec 1;69(3):500-2.
- [20] Amini K, Siraj SS, Mojazi Amiri B, Mirhashemi Rostami SA, Sharr A, Hossienzadeh H (2012) Evaluation of LHRH-a acute release implantation on final maturation and spawning in not-fully matured broodstocks of Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897). *Iran J Fish Sci* 11(3):440–459.
- [21] Johari SA. Application of silver nanoparticles for reduction of fungal infections during egg incubation period and possible effects of their release on the alterations of some genomic and physiological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2012 Feb. PhD Dissertation. Tarbiat Modares University. in Persian
- [22] Jain, P., Pradeep, T., 2005. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1), 59-63.
- [23] X-ray powder diffraction file 1999 JCPDS-ICDD Joint Committee on Powder Diffraction Standard-International Centre for Diffraction Data file no. 29-1129.

- [24] Pereira, C., Silva, J.F., Pereira, A.M., Araújo, J. P., Blanco, G., Pintado, J. M., & Freire, C., 2011. Hybrid catalyst: from complex immobilization onto silica nanoparticles to catalytic application in the epoxidation of geraniol. *Catalysis Science & Technology*, 1(5), 784-793.
- [25] Lv Y., Liu H., Wang Z., Liu S., Hao L., Sang Y., Liu D., Wang J., Boughton R.I., 2009. Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment, *Journal of Membrane Science*, 331 (1-2): 50-60.
- [26] Torres-Flores, E.I., Flores-López, N.S., Martínez-Núñez, C.E., Tánori-Córdova, J.C., Flores-Acosta, M. and Cortez-Valadez, M., 2021. Silver nanoparticles in natural zeolites incorporated into commercial coating: antibacterial study. *Applied Physics A*, 127, pp.1-11.
- [27] Quang, D.V., Sarawade, P.B., Hilonga, A., Kim, J.K., Chai, Y.G., Kim, S.H., and Kim, H.T., 2011. Preparation of amino functionalized silica micro beads by dry method for supporting silver nanoparticles with antibacterial properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 389(1), 118-126.
- [28] Zarrinmehr MJ. Application of Filters Containing Silver Nanoparticle in the Reduction of *Aeromonas hydrophila* Septicemia and Assesment of their Potential Releasing of NPs on the Survival and Physiological Changes of Zebrafish (*Danio rerio*). 2014 August. Master of Science Thesis. Tarbiat Modares University. in Persian
- [29] Bae E, Lee BC, Kim Y, Choi K, Yi J., 2013. Effect of agglomeration of silver nanoparticle on nanotoxicity depression, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 30 (2): 364-368.
- [30] Bailey, T.A. 1983. Method for in vitro screening of aquatic fungicides. *Journal of Fish Disease*. 6: 91-100.
- [31] Soltani, M., Esfandiary, M., Sajadi, M.M., Khazraenia, S., Bahonar, A.R., Ahari, H. 2011. Effect of nanosilver particles on hatchability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg and survival of the produced larvae. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 10(1): 167-176.
- [32] Lalley J., Dionysiou D.D., Varma R.S., Shankara S., Yang D.J., Nadagouda M.N., 2014. Silver-based antibacterial surfaces for drinking water disinfection - an overview. *Curr Opin Chem Eng* 3: 25-29.
- [33] Chernousova, S. and Epple, M., 2013. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(6), pp.1636-1653.
- [34] Hanim, S.A.M., Malek, N.A.N.N. and Ibrahim, Z., 2016. Amine-functionalized, silver-exchanged zeolite NaY: Preparation, characterization and antibacterial activity. *Applied surface science*, 360, pp.121-130.
- [35] Drake, P.L. and Hazelwood, K.J., 2005. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *Ann. Occup. Hyg.* 49, 575-585.

Immobilization of silver nanoparticles on zeolite and silica grains as a filtration substrate in the control of fungal infection during the incubation period of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) embryos; The release rate of silver in water and its effect on spawning rate

Ashkan Banan ^{1*}, Mohammad Reza Kalbassi², Mahmoud Bahmani³

1- Department of Fisheries and Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, IRAN

2- Breeding and Rearing of Aquatics Department, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, IRAN

3- Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, IRAN

ABSTRACT

The indirect application of silver nanoparticles (AgNPs) in controlling the common fungal infection during the incubation period of Persian sturgeon -saprolegniasis - was investigated in this research. Filters containing zeolite and silica grains coated with 0.2%, 0.5% and 1% of AgNPs in two states without agent and with aminopropyltriethoxysilane (APTES) coupling agent along with the control treatment (without filter) were the treatments investigated in the present study. The results showed that in the first 48 hours of incubation, which corresponds to embryonic growth before the start of neurulation, despite the start of contaminating the water in the incubators with Saprolegnia fungus, fungal infection was not seen in any of the investigated treatments. The results of measuring the amount of silver released from the studied filters at the end of the first 12 hours of incubation showed that the amounts of silver released in the water in the treatments of 1% AgNP filters without APTES and with APTES were significantly higher than other filters containing AgNPs. This trend was repeated at the next sampling rounds (48 and 96 hours) with the difference that the release rate was significantly higher only in the 1% AgNP-APTES filter treatment ($P < 0.05$). In the treatment of AgNP-APTES filters, the percentage of hatching showed a significant increase compared to the control filter treatment.

KEYWORDS: saprolegnia, zeolite, silica, silver ion, water microbial disinfection, water treatment

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received:	23
September 2024	
Accepted:	05
December 2024	
ePublished:	10
December 2024	

* Corresponding Authors: Ashkan Banan

Email address: banan.a@lu.ac.ir

Tel: +98 6633430161

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513