

文章编号: 1000-0615(2019)04-1201-08

DOI: 10.11964/jfc.20180111155

绿色合成纳米银材料的制备及其对水产病原菌的 抗菌效果测定

封琦¹, 孟娜², 赵言世¹, 胡春风¹, 亓鲁¹, 朱善元^{1*}

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏省兽用生物制药高技术重点实验室, 江苏泰州 225300;

2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210046)

摘要:近年来随着水产养殖规模不断扩大, 渔药安全问题备受重视。为积极寻找抗生素替代品, 本研究采用银杏叶提取物和硝酸银反应合成纳米银材料, 并通过紫外-可见光全波段扫描、透射电镜以及X射线衍射对其结构表征进行鉴定。在此基础上, 以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌, 以及水产病原菌迟缓爱德华氏菌和嗜水气单胞菌为测试对象, 采用杯碟法、常量肉汤稀释法以及抑菌动力学实验测定合成的纳米银抗菌效果。结果显示, 在波长450 nm处有纳米银等离子共振体形成的吸收峰; 透射电镜观察到纳米银颗粒平均直径小于10 nm; X射线衍射图谱验证了金属银的生成; 本研究所合成的纳米银材料对4种病原菌均有良好的抗菌效果。研究表明, 采用银杏叶绿色合成纳米银, 不仅方便、快捷, 而且成本低廉、环境友好, 在水产病害防控中具有良好的前景。

关键词:水产病原菌; 纳米银; 银杏叶; 抗菌效果

中图分类号: S 942.2

文献标志码: A

随着国内水产养殖业规模的不断扩大, 由于生产者盲目追求经济效益, 缺乏科学用药指导等一系列原因, 渔用抗生素滥用现象较为普遍, 由此产生了耐药性、药物残留等食品安全问题, 并对水体生态环境造成了严重破坏^[1-2]。因此, 积极研发绿色、环保的抗生素替代品势在必行。

银作为传统的消毒杀菌剂, 在人类发展史中拥有悠久的历史。纳米银相对于宏观尺寸的同类金属元素, 拥有独特的理化性质、极大的比表面积、更好的杀菌性能, 以及良好的生化反应催化功能^[3], 已被广泛运用于人类医疗^[4]、农业病虫害防治^[5]、环境废水处理等领域^[6]。纳米银的合成方法主要有三种: 物理法、化学法以及生物法^[7]。生物法相较于传统的物理化学方法具有绿色、环保等特点, 已成为新的研究热

点^[8]。植物提取液合成法相较于其他生物合成法(主要是微生物合成法), 不需要严格的细胞培养条件, 而且可以就地取材、价格低廉, 因而更具优势, 适于工业化生产^[9-10]。

目前, 纳米银在水产病害防治方面的研究还很薄弱, 本研究选取当地盛产的银杏(*Ginkgo biloba*)叶片作为生物材料, 建立了一套纳米银绿色合成方法, 并针对常见水产病原菌进行了抗菌效果实验, 为纳米银抗菌材料在水产养殖中的运用提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 植物采集及提取液制备

2016年10月在江苏农牧科技职业学院校园内采集新鲜金黄色银杏叶片, 用去离子水洗净, 烘箱内30 °C烘干。将干燥叶片研磨成粉末, 精

收稿日期: 2018-01-23 修回日期: 2018-06-06

资助项目: 江苏省自然科学基金(BK20151576); 江苏农牧科技职业学院大学生创新创业项目(201712806061Y); 江苏农牧科技职业学院企业横向配套项目(NSFPT201853)

通信作者: 朱善元, E-mail: 477684452@qq.com

确称取5 g, 加入150 mL超纯水, 高温煮沸5 min, 采用0.45 μm 滤膜过滤, 收集滤液, 冰箱4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 纳米银合成

硝酸银为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。取50 mL银杏提取液, 加入到150 mL 0.01 mol/L硝酸银水溶液中, 混匀, 摇床120 r/min, 30 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应6 h, 观察纳米银悬液颜色变化, 反应结束后室温避光保存备用。

1.3 紫外-可见光全波段扫描

采用INESA UV765分光光度计分别检测银杏提取液和纳米银最大吸收波长, 波长范围为300~600 nm, 比较二者吸收峰图。

1.4 X射线衍射分析

将合成的纳米银溶液于90 $^{\circ}\text{C}$ 蒸发浓缩后, 12 000 r/min离心10 min, 收集沉淀, 用去离子水重新悬浮(12 000 r/min离心10 min), 洗涤3遍。采用X'Pert Pro MPD型X射线衍射仪(荷兰帕纳科公司)对干燥粉末进行晶体结构分析: 扫描范围为5~100 ($^{\circ}$)(2θ), 扫描速度5 $^{\circ}$ /min。

1.5 透射电镜观察

纳米银颗粒的形态及粒径采用TF20场发射透射电子显微镜(美国FEI公司)进行分析, 将纳米银溶液滴在微栅支持膜上, 自然干燥, 在200 kV下观察。

1.6 纳米银抗菌效果测定

本研究所用测试菌为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC25923)、大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC25922)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda* ATCC15947)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* ATCC35654), 所有菌株均购自北京中科质检生物技术有限公司。实验所用水解酪蛋白培养基(Mueller-Hinton, MH)和水解酪蛋白琼脂培养基(Mueller-Hinton Agar, MHA)均购自北京陆桥技术股份有限公司。

抑菌圈测定 采用牛津杯法测定纳米银抑菌活性, 将测试菌株接种到MH培养基中培养至对数生长期, 采用无菌生理盐水调整菌液浓度至0.5麦氏浊度单位, 再稀释100倍作为测试菌液(约 10^6 CFU/mL)。取0.1 mL测试菌液用灭菌棉拭子均匀涂布于9 cm直径灭菌平皿上(每皿25 mL MHA培养基), 向牛津杯中加入50 μL 纳米银溶

液, 并设置银杏叶提取液组和生理盐水组作为对照。每组实验3个平行, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h, 采用游标卡尺测定抑菌圈大小。

最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)测定 采用常量肉汤稀释法测定最小抑菌浓度, 将测试菌液分装到10支试管中(每管2 mL)。向第1管中加入2 mL纳米银稀释液(80.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 采用2倍法逐级稀释到第10管。另取2管分别加入2 mL测试菌液和MH培养基作为阳性和阴性对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后, 以稀释倍数最大且澄清透明的管所对应的药物浓度作为MIC。从MIC浓度以上的试管中各取0.1 mL均匀涂布于MHA平板上(直径9 cm, 每皿25 mL), 继续培养24 h, 以菌落数小于5的平板所对应药物浓度记为MBC, 每组重复3次。

抑菌动力学实验 将对数期菌液, 以及纳米银溶液添加到MH培养基中, 调整菌液浓度至 10^6 CFU/mL, 药液浓度分别为10和20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并以生理盐水组作为对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 150 r/min振荡培养, 分别于0、1、3、6、8、12和24 h取样, 于分光光度计上测定OD₆₀₀, 绘制动力学曲线。

2 结果

2.1 纳米银紫外-可见光谱吸收特征

在纳米银合成反应期间, 反应液随着时间推移由淡黄色变为红棕色, 这种颜色变化是由纳米银颗粒表面等离子共振产生的激发现象所造成的^[11](图1)。在450 nm处有一最大吸收峰, 与此前报道一致^[12], 证实了纳米银的生成(图2)。

2.2 纳米银透射电镜表征

通过透射电镜结果可以进一步了解合成纳米银颗粒的外部形态及尺寸大小等精细结构特征(图3-a)。研究发现绝大部分纳米银颗粒呈球形。大部分颗粒粒径分布于4~10 nm(占总数的77.29%), 粒径大小为(8.11 \pm 2.5) nm (图3-b)。

2.3 纳米银X射线衍射表征

X射线衍射测试观测到10个衍射峰(图4), 经物相检测表明, 该样品由2个物相组成, 分别为Ag与AgCl。其中位于 2θ 为39.25 $^{\circ}$ 、44.36 $^{\circ}$ 、64.54 $^{\circ}$ 、77.42 $^{\circ}$ 及81.48 $^{\circ}$ 的衍射峰, 对应立方相Ag纳米颗粒的(1 1 1)、(2 0 0)、(2 2 0)、(3 1 1)、(2 2 2)晶面衍射(标准卡片PDF#04-0783); 位于 2θ 为27.70 $^{\circ}$ 、



图1 合成反应过程中的颜色变化

A. 反应开始时; B. 反应结束后

Fig. 1 Colour changes during reaction

A. at the beginning of reaction; B. after reaction

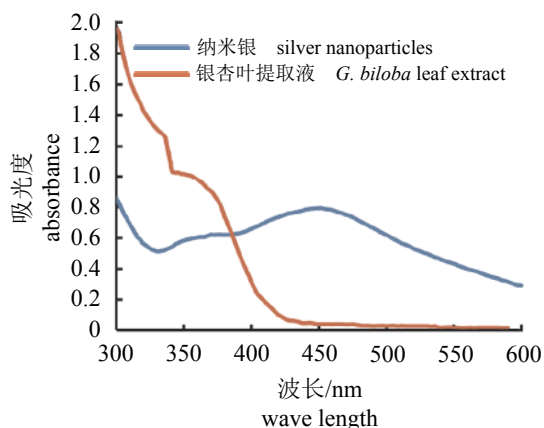
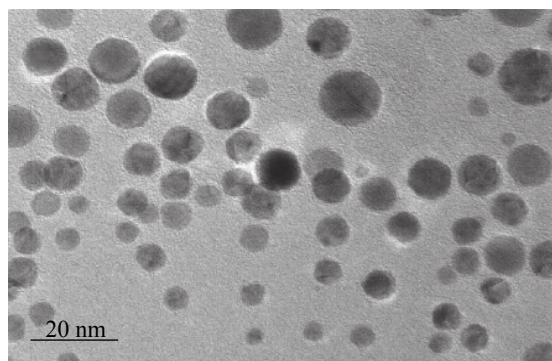


图2 紫外-可见光谱分析

Fig. 2 Analysis of UV-visible absorption spectra



(a)

32.22°、46.26°、54.97°、57.40°的衍射峰对应立方相AgCl的(1 1 1)、(2 0 0)、(2 2 0)、(3 1 1)、(2 2 2)晶面的衍射(标准卡片PDF#31-1238)。

2.4 纳米银抗菌效果检测

抑菌圈实验 结果显示,生理盐水对4种测试菌均无抑菌活性(表1,图5),银杏提取液仅能产生微弱的抑菌效果,而合成的纳米银材料对4种菌均产生了良好的抑制作用,纳米银对迟缓爱德华氏菌抑菌活性最强,其次是大肠杆菌和嗜水气单胞菌,对金黄色葡萄球菌抑菌活性相对较弱。

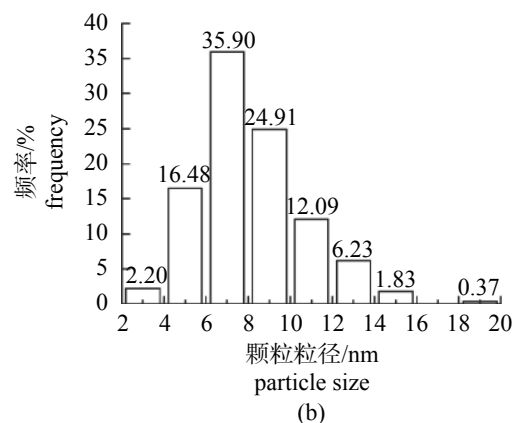
最小抑菌浓度和最小杀菌浓度 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)结果显示,迟缓爱德华菌对纳米银最为敏感,其次是大肠杆菌和嗜水气单胞菌,纳米银对金黄色葡萄球菌效果较弱,与抑菌圈实验结果相符(表2)。

抑菌动力学特征 在10和20 μg/mL浓度下,4种测试菌均无法生长,菌液浊度接近于0(图6),这表明纳米银对其产生了生长抑制作用,在水产养殖病害防治中具有一定的实用价值。

3 讨论

3.1 纳米银制备

使用植物作为生物模板合成纳米银,具有快速、环保、经济等优点,在生产中可以一步合成,受到了人们的普遍关注。尤其是药用植物提取液中所含有的蛋白、氨基酸、酶、多糖、



(b)

图3 纳米银颗粒分布

(a)纳米银颗粒透射电镜图片;(b)纳米银颗粒粒径分布直方图

Fig. 3 Distribution of silver nanoparticles

(a) TEM pictures of silver nanoparticles; (b) histogram of particle size distribution of silver nanoparticles

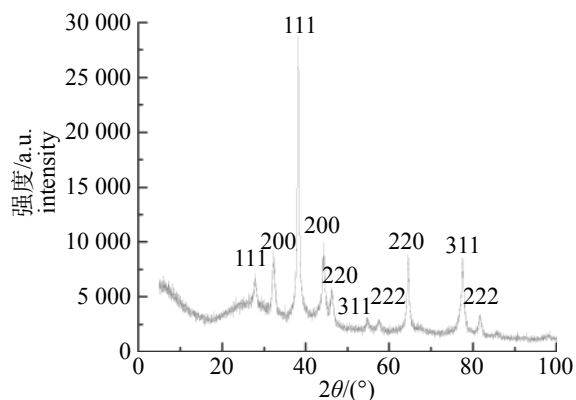


图4 生物还原法合成纳米银颗粒XRD图谱

峰值上的数字代表不同的晶面型

Fig. 4 XRD pattern of silver nanoparticles after bioreduction

Figures above each peak represent its crystal facet

表1 纳米银对4种常见病原菌的抑菌圈大小

Tab. 1 The inhibition zone of silver nanoparticles against four common pathogenic bacterias

菌株 strains	抑菌圈直径/mm inhibition zone diameters		
	纳米银 silver nanoparticles	银杏叶提取物 <i>G. biloba</i> leaf extract	生理盐水 normal saline
<i>S. aureus</i>	13.51±0.35	8.34±0.23	0
<i>E. coli</i>	15.28±0.46	7.39±0.29	0
<i>E. tarda</i>	15.72±0.71	7.95±0.41	0
<i>A. hydrophila</i>	13.99±0.46	7.42±0.17	0

生物碱、鞣酸、酚类、皂苷、萜类和维生素等生物大分子物质可以起到还原银离子、稳定纳米银颗粒的作用^[9]。银杏作为传统的药用植物，除了可食用部分的白果，大部分叶片往往未经加工就随意丢弃，而研究表明药用价值最高的部分是叶片，其中富含酚类化合物(黄酮类、酚酸)、多糖以及生物碱等，这些物质本身就具有还原性和抗氧化性，可用于还原制备纳米金属颗粒^[13-17]。本制备方法使用水作为溶剂制备提取液，避开了传统采用化学溶剂带来的环境污染问题，而且采用30℃反应温度，无须其余辅助加工设备，降低了生产工艺要求，适于一步法快速合成^[18, 19-20]。

3.2 纳米银结构特征

紫外-可见光光谱分析、透射电镜观察及X射线衍射分析结果均从不同角度验证了纳米银

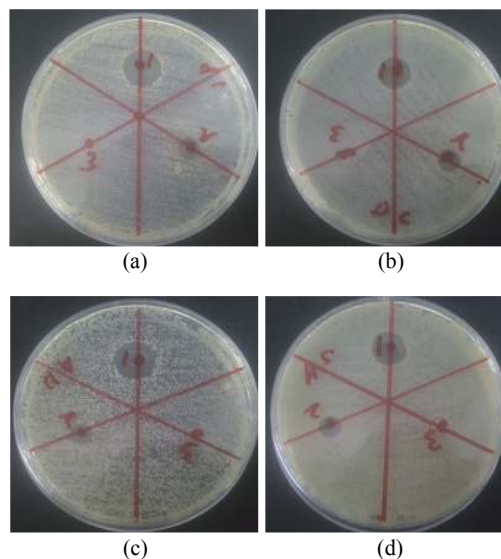


图5 纳米银抑菌活性

(a)金黄色葡萄球菌, (b)大肠杆菌, (c)迟缓爱德华氏菌, (d)嗜水气单胞菌; 1.纳米银, 2.银杏叶提取物, 3.生理盐水; 下同

Fig. 5 Antimicrobial activity of synthesized silver nanoparticles

(a) *S. aureus*, (b) *E. coli*, (c) *E. tarda*, (d) *A. hydrophila*; 1. silver nanoparticles, 2. *G. biloba* leaf extract, 3. normal saline; the same below

表2 受试菌株MIC和MBC测定结果

Tab. 2 MICs and MBCs for tested bacterias $\mu\text{g/mL}$

菌株 strain	最小抑菌浓度 MIC	最小杀菌浓度 MBC
<i>S. aureus</i>	1.264	5.056
<i>E. coli</i>	0.632	2.528
<i>E. tarda</i>	0.158	0.316
<i>A. hydrophila</i>	0.632	5.056

颗粒的生物合成。有研究表明，当纳米颗粒的尺小于10 nm时，其释放银离子的量比大尺寸纳米银多，杀菌效果与银离子的释放量成正相关^[20]。本研究中合成的纳米银颗粒平均直径小于10 nm，形状近球形，粒径分布相对集中，因此判断合成效果较为理想。X射线衍射图谱中纳米银颗粒的特征峰位置与Ahmed等^[17]和姜宇等^[21]的文献报道相吻合。AgCl衍射峰的出现说明银杏叶提取液中含有氯离子，在此前报道中也存在该现象^[21-22]。

3.3 纳米银抗菌效果

银能够对超过650种不同类别的微生物产生抗菌效果，包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性

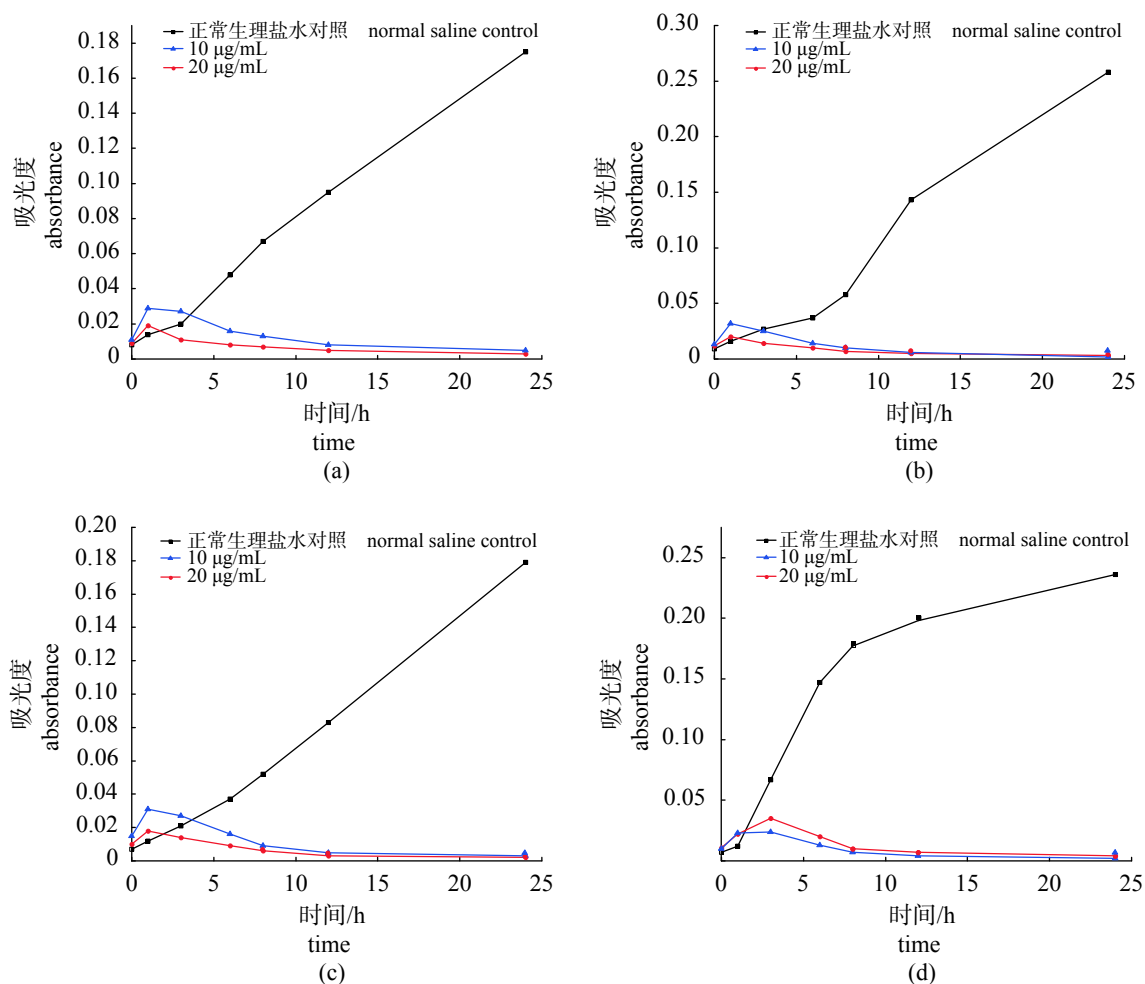


图 6 纳米银抑菌动力学特征

Fig. 6 Antibacterial kinetics of synthesized silver nanoparticles

菌、病毒、真菌等。在所有的金属元素中, 银抗菌效果最好, 而且对动物细胞毒性最小^[9]。纳米银相较于银离子有更好的抗菌性能、组织相容性以及稳定性, 产品遍布医疗、食品、纺织、环保等产业, 并获得了美国FDA、EPA等官方科研机构的批准。本研究中纳米银对大肠杆菌的MIC (0.632 µg/mL) 低于谢小保等^[23]的报道(10 µg/mL), 抑制动力学特征与此前报道相一致^[23-24], 在10 µg/mL和20 µg/mL两个浓度下, 大肠杆菌生长完全受到抑制; 纳米银对金黄色葡萄球菌MIC (1.264 µg/mL) 远低于段晓杰等^[25]的研究结果(800 µg/mL); 纳米银对迟缓爱德华氏菌的MIC (0.158 µg/mL) 和嗜水气单胞菌的MIC (0.632 µg/mL) 低于Velmurugan等^[26]的报道(*E. tarda*-124 µg/mL、*A. hydrophila*-250 µg/mL), 这表明本研究中合成的纳米银抗菌性能要优于此前报道的合成种类, 此外考虑到菌株的差异性(本研究中采用的均为

标准菌株, 并非生产中实际分离菌株)以及纳米银浓度换算方式(采用反应体系摩尔质量换算, 并非采用冻干粉实际质量称取获得), 在将本结果推广到生产中时尚需进一步验证。从抑菌圈实验以及MIC和MBC结果中还发现, 迟缓爱德华氏菌、大肠杆菌、嗜水气单胞菌(均为革兰氏阴性菌)对纳米银的敏感性要高于金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌), 这与以往的研究结果一致^[27]。这是因为革兰氏阳性菌细胞壁较厚而且富含肽聚糖; 肽聚糖带负电荷, 银离子带正电荷, 革兰氏阳性菌相较于革兰氏阴性菌可以拦截更多的银, 从而降低对纳米银的敏感性^[9]。

目前, 关于纳米银的杀菌机理仍存在争论, 主要大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等模式细菌为研究对象, 一般认为纳米银会在细菌表面形成穿孔, 导致内容物外流, 产生抗菌作用; 纳米银颗粒进入细胞后, 还会对DNA造成损伤,

引起细胞凋亡^[23-25, 28-29]。此外, 纳米银的抗菌效果还受到颗粒尺寸及环境条件影响, 如pH、离子强度等^[9], 因此, 将来在养殖水体中使用时还要考虑上述因素。

纳米银在水产病原控制中的研究还处于起步阶段^[30], 将来可以通过扩大植物来源筛选(比如藻类、能够富集重金属植物等), 并进一步优化反应控制条件(包括反应温度、硝酸银浓度、分散剂稳定剂筛选等)^[29], 针对常见水产病原菌筛选出抗菌效果最佳的纳米银, 逐步替代抗生素。

参考文献:

- [1] 曾涛. 水产养殖中几种抗生素替代物的应用[J]. 北京农业, 2012, (21): 95.
Zeng T. Aquaculture several antibiotics in the application of substitutes[J]. Beijing Agriculture, 2012, (21): 95(in Chinese).
- [2] 姚晓东. 抗生素在水产养殖中应用存在的问题及对策[J]. 农业与技术, 2016, 36(24): 103.
Yao X D. Problems and solutions of antibiotics used in aquaculture[J]. Agriculture and Technology, 2016, 36(24): 103(in Chinese).
- [3] Kim J S, Kuk E, Yu K N, *et al.* Antimicrobial effects of silver nanoparticles[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2007, 3(1): 95-101.
- [4] El-Sheekh M M, El-Kassas H Y. Application of biosynthesized silver nanoparticles against a cancer promoter cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15(16): 6773-6779.
- [5] 汪江节. 纳米改性植物灭螺剂的制备及其灭螺增效性能的研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2011.
Wang J J. Study on preparation of nano-modified plant molluscicide and its molluscicidal synergistic properties[D]. Hefei: Anhui University, 2011(in Chinese).
- [6] Kowalska-góralaska M, Senze M, Polechoński R, *et al.* Biocidal properties of silver-nanoparticles in water environments[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2015, 24(4): 1641-1647.
- [7] 王权, 王茜. 制备银纳米线专利技术分析[J]. *信息记录材料*, 2016, 17(5): 62-65.
Wang Q, Wang X. Patent analysis of the synthesis of silver nanowires[J]. *Information Recording Materials*, 2016, 17(5): 62-65(in Chinese).
- [8] Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi S, *et al.* Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods[J]. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2014, 9(6): 385-406.
- [9] Ahmed S, Ahmad M, Swami B L, *et al.* A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise[J]. *Journal of Advanced Research*, 2016, 7(1): 17-28.
- [10] 王盟盟, 钱君超, 张玉珠, 等. 生物模板法制取微纳米多孔材料[J]. 材料导报, 2013, 27(S2): 197-200, 204.
Wang M M, Qian J C, Zhang Y Z, *et al.* Synthesis of micro-nano hollow materials by biological templates[J]. *Materials Review*, 2013, 27(S2): 197-200, 204(in Chinese).
- [11] Murugesan S, Elumalai M, Dhamotharan R. Green synthesis of silver nano particles from marine alga *Gracilaria edulis*[J]. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 2011, 4(1): 105-110.
- [12] Mahanty A, Mishra S, Bosu R, *et al.* Phytoextracts-synthesized silver nanoparticles inhibit bacterial fish pathogen *Aeromonas hydrophila*[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2013, 53(4): 438-446.
- [13] 李焰, 杨小燕, 林跃鑫, 等. 银杏叶有效成分提取与抑菌效果研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2006, 42(15): 54-56.
Li Y, Yang X Y, Lin Y X, *et al.* Study on extraction and antibacterial effects of active ingredients in leaves of *Ginkgo biloba*[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2006, 42(15): 54-56(in Chinese).
- [14] 曾献, 龚玉子, 王焕姣. 银杏叶的药理作用[J]. *湖南林业科技*, 2008, 35(1): 6-8.
Zeng X, Gong Y Z, Wang H J. Pharmacological action of *Ginkgo biloba* leaves[J]. *Hunan Forestry Science & Technology*, 2008, 35(1): 6-8(in Chinese).
- [15] 韦琮智, 丛新奇, 叶淑红. 银杏多糖的抑菌性研究[C]//中国食品科学技术学会第十三届年会论文集. 北京: 中国食品科学技术学会, 2016: 169-170.
Wei C Z, Cong X Q, Ye S H. Research on the bacteriostatic activities of polysaccharides from leaves of *Ginkgo biloba* and endophytic bacterium[C]//Abstracts of the 13th Annual Meeting of Chinese Institute of Food Science and Technology. Beijing: Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016: 169-170(in Chinese).
- [16] 张庆红, 王洪星, 谷洪燕. 银杏叶化学成分及提取分离研究概况[C]//山东省药学会第一届学术年会论文集(上). 济南: 山东省药学会, 2005: 364-367.
Zhang Q H, Wang H X, Gu H Y. Review of chemical

- composition analysis and extraction techniques for *Ginkgo biloba* leaves[C]//Proceedings of the 1st Annual Meeting of Shandong Pharmaceutical Association. Ji'nan: Shandong Pharmaceutical Association, 2005: 364-367(in Chinese).
- [17] Ahmed K, Ahmed N, Siddiqui M T, *et al.* Green synthesis of silver nano particles by plant leaf extract[J]. *Fuust Journal of Biology*, 2016, 6(1): 61-64.
- [18] Song J Y, Kim B S. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2009, 32(1): 79-84.
- [19] 孙彩华, 何佳奇, 余朝辉. 不同形态纳米银的制备及其杀菌性能的研究[J]. *中国医药导报*, 2015, 12(34): 15-19.
- Sun C H, He J Q, Yu C H. Study of different forms of nanometer silver preparation and bactericidal performance[J]. *China Medical Herald*, 2015, 12(34): 15-19(in Chinese).
- [20] 熊旭华. 不同形态纳米银的制备及其杀菌性能研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- Xiong X H. Preparation of silver nanostructures with different shapes and its antibacterial activity[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014(in Chinese).
- [21] 姜宇, 李福艳, 刘冲冲, 等. 山楂提取物生物合成纳米银对四种常见水产病原菌的抑制作用[J]. *海洋与湖沼*, 2016, 47(1): 253-260.
- Jiang Y, Li F Y, Liu C C, *et al.* Biosynthesized silver nanoparticles using hawthorn fruit extract and their antibacterial activity against four common aquatic pathogens[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(1): 253-260(in Chinese).
- [22] Jena J, Pradhana N, Dash B P, *et al.* Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using microalga *Chlorococcum humicola* and its antibacterial activity[J]. *International Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2013, 3(1): 1-8.
- [23] 谢小保, 李文茹, 曾海燕, 等. 纳米银对大肠杆菌的抗菌作用及其机制[J]. *材料工程*, 2008(10): 106-109.
- Xie X B, Li W R, Zeng H Y, *et al.* Study of antimicrobial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*[J]. *Journal of Materials Engineering*, 2008(10): 106-109(in Chinese).
- [24] 魏殿军, 王剑飞, 于晓旭. 纳米银抗菌机制的研究[C]//第六届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛论文汇编. 长沙: 中国微生物学会临床微生物学专业委员会, 2015: 252.
- Wei D J, Wang J F, Yu X X. Antibacterial mechanism of silver nanoparticles on bacteria[C]//Proceedings of Microbiology and Immunology Symposium in the 6th China Congress of Clinical Microbiology. Changsha: Clinical Microbiology Division of Chinese Society for Microbiology, 2015: 252(in Chinese).
- [25] 段晓杰, 杜晓丹, 张蓓蓓. 纳米银对金黄色葡萄球菌的抗菌作用及其机制研究[J]. *生物医学工程与临床*, 2015, 19(3): 237-240.
- Duan X J, Du X D, Zhang B B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* and the underlying mechanism[J]. *Biomedical Engineering and Clinical Medicine*, 2015, 19(3): 237-240(in Chinese).
- [26] Velmurugan P, Hydroose M, Lee SM, *et al.* Synthesis of silver and gold nanoparticles using cashew nut shell liquid and its antibacterial activity against fish pathogens[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2014, 54(2): 196-202.
- [27] El-Sheekh M M, El-Kassas H Y. Algal production of nano-silver and gold: their antimicrobial and cytotoxic activities: a review[J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2016, 14(2): 299-310.
- [28] 谢小保, 李文茹, 袁英姿, 等. 纳米银对金黄色葡萄球菌的抑制及其作用机制[C]//雪莲杯第10届功能性纺织品及纳米技术应用研讨会论文集. 常州: 北京纺织工程学会, 2010: 520-524.
- Xie X B, Li W R, Yuan Y Z, *et al.* Study of the antimicrobial effect and mechanism of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*[C]//Proceedings of the 10th Symposium of Functional Textiles and Nanotechnology Applications. Changzhou: Beijing Textile Engineering Institute, 2010: 520-524(in Chinese).
- [29] Mathew P P, Thankachen N, Abraham E. Green synthesis and applications of silver nano particles[J]. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 2016, 3(5): 233-240.
- [30] Sarkar B, Mahanty A, Netam S P, *et al.* Inhibitory role of silver nanoparticles against important fish pathogen, *Aeromonas hydrophila*[J]. *International Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2012, 2(4): 70-74.

Green synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal effects against aquaculture pathogens

FENG Qi¹, MENG Na², ZHAO Yanshi¹, HU Chunfeng¹, QI Lu¹, ZHU Shanyuan^{1*}

(1. Jiangsu Key Laboratory for High-Tech Research and Development of Veterinary,
Jiangsu Agri-animal Husbandry College, Taizhou 225300, China;

2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: With the development of aquaculture, far more attention has been paid to safety in fish drugs usage. In order to find alternatives to antibiotics, silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized using extracts of *Ginkgo* leaves with AgNO₃ in this study. The synthesized silver nanoparticles were characterized by UV-Visible spectrophotometer, transmission electron microscope and X ray diffraction spectrum. The antibacterial efficacy was assessed against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and common bacterial pathogens in aquaculture including *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila*, by using cylinder plate method, broth macrodilution method and bacteriostasis kinetic experiments. The results showed that the absorbance maximum was observed at 460 nm corresponding to the plasmon absorbance of the AgNPs. Transmission electron microscope revealed that the AgNPs had an average size below 10 nm. The X-Ray Diffraction (XRD) spectrum of the nanoparticles confirmed the formation of metallic silver. The AgNPs synthesised in this research exhibited good antibacterial efficacy against the test pathogens. This investigation demonstrated that the green synthesis of AgNps with leaves of *Ginkgo biloba* was not only fast and convenient but also cost effective and ecofriendly, which has good prospects in control of aquaculture diseases.

Key words: aquacultural pathogenic bacteria; silver nanoparticles; *Ginkgo biloba* leaves; antibacterial effects

Corresponding author: ZHU Shanyuan. E-mail: 477684452@qq.com

Funding projects: Jiangsu Natural Science Foundation (BK20151576); Jiangsu Agri-animal Husbandry College Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (201712806061Y); Jiangsu Agri-animal Husbandry College Enterprise Horizontal Supporting Project (NSFPT201853)