

تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی بر فلور باکتریایی پوست ماهی قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

حمید سالاری جو^۱، محمدرضا کلباسی^{۲*}، اسماعیل عبدالله زاده^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، استان مازندران، نور، پست الکترونیکی: h.salary1365@gmail.com

۲- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، استان مازندران، نور، پست الکترونیکی: kalbassi_m@modares.ac.ir

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی منابع طبیعی- فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، استان مازندران، نور، پست الکترونیکی: abdollahzadeh@rocketmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۲۸

* نویسنده مسوول

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۰

© نشریه علمی - پژوهشی اقیانوس شناسی ۱۳۹۱، تمامی حقوق این اثر متعلق به نشریه اقیانوس شناسی است.

چکیده

نانو ذرات نقره به دلیل داشتن خاصیت ضد باکتریایی ۵۶ درصد نانو مواد تولید شده را در سطح جهان به خود اختصاص می دهد. از این رو در صورت رهایش نانوذرات نقره به بوم سامانه های آبی، خطرات جبران ناپذیری را برای موجودات زنده این بوم سامانه ها بویژه باکتری های همزیست به همراه خواهد داشت. هدف از مطالعه ی حاضر، بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر فلور طبیعی باکتریایی پوست ماهی قزل آلی رنگین کمان است. جهت اطمینان از کیفیت نانوذرات نقره از دستگاه های JCP، EDX، TEM، Zetasizer و اسپکترومتر استفاده گردید. پس از ۱۴ روز نگهداری ماهیان در غلظت های ۱، ۰/۱ و صفر میلی گرم در لیتر نانوذرات نقره، تعداد باکتری های مزوفیل، سرمادوست، انتروباکتریاسه و باکتری های اسید لاکتیک پوست ماهیان به روش پورپلیت مورد شمارش قرار گرفت. نتایج نشان داد با افزایش غلظت نانوذرات نقره جمعیت باکتری های لاکتیک اسید پوست ماهیان به طور معنی داری کاهش یافت و باکتری های مزوفیل و انتروباکتریاسه از لحاظ آماری تاثیرپذیری کمتری در برابر نانوذرات نقره از خود نشان دادند. در حالی که با افزایش غلظت نانوذرات نقره، جمعیت باکتری های سرمادوست پوست ماهیان به طور معنی داری افزایش یافت. تحلیل نتایج نشان می دهد که خواص ضد باکتریایی نانو نقره به صورت انتخابی بوده و بسته به نوع گروه باکتری مورد مطالعه متفاوت است.

کلمات کلیدی: نانوذرات نقره، فلور باکتریایی، قزل آلی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*).

۱. مقدمه

شیمیایی و زیست شناسی دارای خصوصیات منحصر به فرد و جدیدی در مقایسه با ذرات بزرگتر از خود هستند (Chen and Schluesener, 2008; Farkas et al., 2010; Singh et al., 2009). طی سال های اخیر فناوری جدید نانو در ایران و کشورهای مختلف

نانوفناوری به مطالعه و ساخت موادی در ابعاد ۱-۱۰۰ نانومتر اطلاق می شود، به طوری که این مواد نانومتری از لحاظ فیزیکی،

نصب پارس (تهران- ایران) تهیه شده بود، استفاده شد. نانو نقره مذکور توسط سازمان ثبت اختراعات ایالات متحده آمریکا با شماره ۲۰۰۹۰۱۳۸۲۵ به ثبت رسیده است (Nia, 2011).

به منظور اطمینان از کیفیت نانو ذرات نقره خریداری شده، برخی خواص آن پیش از شروع آزمایش، مورد سنجش قرار گرفت. میزان بار سطحی یا پتانسیل زتا و همچنین اندازه ذرات موجود در کلئوئید نانو ذرات نقره توسط دستگاه Zetasizer (Instruments Inc, UK, Model: 3000HSa Malvern) اندازه‌گیری شد (Angelescu et al., 2010; Farkas et al., 2011). همچنین جهت تعیین غلظت واقعی نقره موجود در کلئوئید نانو ذرات نقره، از روش طیف‌سنجی اتمی نشری پلاسما جفت شده‌ی القایی (ICP-AES, Model:3410 ARL, Switzerland) استفاده شد (Farkas et al., 2011). شکل و اندازه‌ی نانو ذرات نقره در حالت خشک نیز با بررسی تصویر میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM) تعیین گردید (Angelescu et al., 2010; Farkas et al., 2011). بررسی خلوص کلئوئید نانوذرات نقره استفاده شده در مطالعه حاضر، با استفاده از دستگاه EX200 Energy- EDX (dispersive X-ray analyzer, Horiba, Japan) صورت گرفت (Farkas et al., 2011; Farré et al., 2009) و همچنین به منظور ارزیابی اندازه ذرات نقره سوسپانسیون شده موجود در کلئوئید مصرفی از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (Spectra-MAX-(PLUS) 384 UV-visible spectrophotometer (Molecular Devices, USA) استفاده شد (Angelescu et al., 2010).

۲-۲. نگهداری ماهی

تعداد ۹۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۲۵ گرم از مزارع پرورشی خریداری و به آزمایشگاه تحقیقاتی آبزیان دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی تربیت مدرس منتقل شد. در این تحقیق از آب کلرزدایی شده توسط تیوسولفات سدیم و هوادهی شدید استفاده شد. در ابتدای دوره شاخص‌های شیمیایی آب مورد سنجش قرار گرفت.

ماهیان برای سازگاری با شرایط آزمایشگاهی به مدت یک هفته در مخازن ۳۰۰ لیتری آب شیرین نگهداری و با غذای تجاری ساخت کارخانه چینه تغذیه شدند. سپس، ۴۸ ساعت قبل از شروع آزمایشات، غذاهای ماهیان قطع گردید تا از جذب نانو ذرات به مواد غذایی و مدفوع ماهیان جلوگیری شود (Oecd, 1998).

جهان وارد عرصه‌های مختلف علمی و صنعتی شده است. اگرچه دامنه کاربرد نانو فناوری در علوم مختلف در حال افزایش است، اما نگرانی‌های زیادی در رابطه با پتانسیل خطرات نانوذرات برای سلامتی انسان و محیط زیست وجود دارد (Tiede et al., 2009). از جمله نانومواد که به میزان زیادی در صنعت تولید و مصرف می‌شوند می‌توان به نانوذرات نقره (۰/۵۶)، لوله‌های کربنی (۰/۱۷)، تیتانیوم اکسید (۰/۹)، سیلیکا (۰/۷)، روی (۰/۷) و طلا (۰/۴) اشاره نمود (Mantovani et al., 2009). نانو ذرات نقره به دلیل داشتن خصوصیات ویژه‌ی ضد میکروبی بیشترین سهم نانو مواد تولید شده در جهان را به خود اختصاص می‌دهند (Choi et al., 2009). بنابراین با توجه به تولید و مصرف انبوه نانو ذرات نقره و احتمال بالای رهایش آنها به محیط زیست و بوم سامانه‌های آبی این احتمال وجود دارد که مخاطراتی را برای موجودات زنده ایجاد نمایند. حتی پیش‌بینی شده در سال ۲۰۱۰، در حوزه‌ی کشورهای اتحادیه اروپا نانو نقره موجود در مواد پلاستیکی و منسوجات، ۱۵٪ از کل نقره رها شده در محیط‌های آبی را تشکیل می‌دهد (Bilberg et al., 2010; Choi et al., 2009; Tolaymat et al., 2010). در این راستا اکوتوکسیکولوژی نانو مواد در محیط‌های آبی زمینه تحقیقاتی جدیدی است که توجه محققین را به خود جلب نموده است (Colvin, 2003).

به دلیل تولید بسیار زیاد نانوذرات نقره و رهایش به محیط‌های آبی و نیز بالا رفتن میزان سمیت آنها در این بوم‌سامانه‌ها، لزوم بررسی اثرات این نانومواد بر موجودات زنده بوم‌سامانه‌های آبی، به‌خصوص باکتری‌های همزیست با دیگر موجودات که نقش بسیار مهمی در زنجیره‌های غذایی ایفا می‌کنند، از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. بنابراین هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی تاثیر نانوذرات نقره بر فلور باکتریایی پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. نانوذرات نقره

برای انجام این آزمایش از کلئوئید نانو ذرات نقره^۱ با نام تجاری Nanocid و غلظت اسمی ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر که از شرکت نانو

^۱ Argent- Nano Particles

داده شد. پس از انعقاد لایه‌ی اول، ۱۰ میلی لیتر محیط کشت بر روی لایه اول ریخته شد. پلیت‌های کشت داده شده بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد شمارش شدند (Ben-Gigley et al., 1998). جهت شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک از محیط کشت deMan Rogosa and Sharpe agar (MRS) (Schartau, Chemie, Spain) استفاده شد (Ben-Gigley et al., 1998). طریقه‌ی کشت باکتری‌های اسید لاکتیک نیز همانند باکتری‌های انتروباکتریاسه بود. پلیت‌ها پس از ۲-۳ روز دوره انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد شمارش شدند. به‌منظور تایید نتایج، پلیت‌های کنترل نیز در نظر گرفته شد. جمعیت باکتری‌ها به‌صورت لگاریتم تعداد کلنی در cm^2 ($\log \text{cfu}/\text{cm}^2$) بیان شد.

۲-۵. آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزارهای Excel 2007 و SPSS 17.0 انجام شد. برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov و برای تعیین تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (در سطح ۵ درصد) و آزمون دانکن استفاده شد.

۳. نتایج

نتایج به‌دست آمده از دستگاه زتاسایزر نشان داد که اندازه‌ی ذرات نقره موجود در کلونید نانو ذرات نقره استفاده شده در این تحقیق بین ۱۶۳/۵-۳/۹ نانومتر و متوسط قطر آنها ۵۴/۸ نانومتر بوده است (شکل ۱). به‌طور کلی ۵۴/۱ درصد این ذرات قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر و ۴۵/۹ درصد آن‌ها قطر بین ۱۰۰ تا ۱۶۵ نانومتر داشتند. نتایج حاصل از آنالیزهای انجام شده توسط میکروسکوپ الکترون عبوری (شکل ۲A) نشان داد که متوسط اندازه نانو ذرات نقره در حالت خشک $8/44 \pm 25/90$ نانومتر بوده است.

تفاوت به‌دست آمده بین اندازه نانو ذرات نقره در حالت خشک و کلونید، ناشی از اختلاف در روش مورد استفاده در اندازه‌گیری و نیز تشکیل توده و افزایش اندازه ذرات در حالت کلونید است.

پس از تعیین محدوده‌ی کشندگی نانوذرات نقره برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، غلظت‌های آزمایشی نانو ذرات نقره ۰/۱ و ۱ میلی گرم بر لیتر همراه با گروه شاهد در نظر گرفته شد (ASTM, 2007). ماهیان به مدت ۱۴ روز و در سه تکرار در آکواریوم‌هایی که حاوی ۳۰ لیتر آب بودند در معرض دوزهای مذکور قرار گرفتند. این آزمایش مطابق روش‌های استاندارد سازمان OECD و تحت شرایط ساکن-تجدید^۱ انجام شد. به‌طوری‌که آب آکواریوم‌ها هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض و دزهای نانو نقره مد نظر مجدداً در مخازن برقرار می‌شد (OECD, 1984).

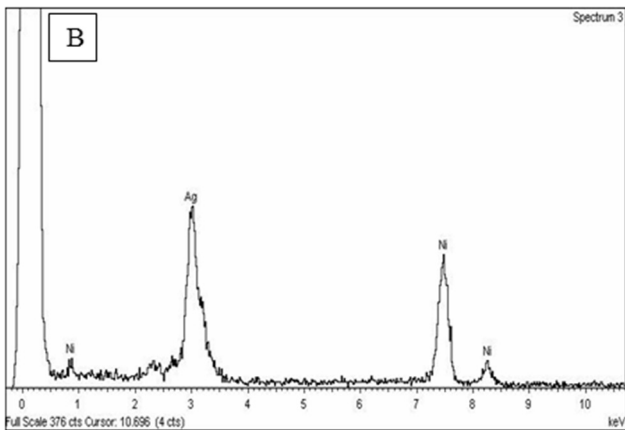
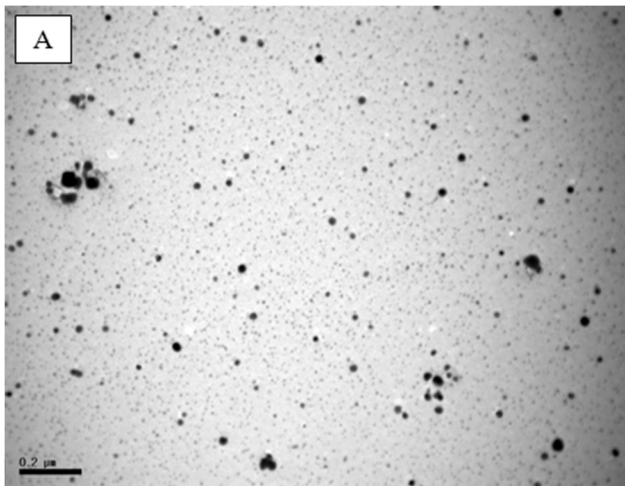
۲-۳. آزمایشات میکروبی پوست

پنج ماهی از هر کدام از آکواریوم‌های شاهد با تیمار ۰/۱ و ppm ۱ به‌طور تصادفی انتخاب گردید. پوست ماهیان با کمک اسکالپل استریل از ناحیه پهلو و بالای خط جانبی به ابعاد $2 \times 3 \text{ cm}$ جداسازی شد. سپس ۲ گرم پوست با کمک قیچی استریل کاملاً ریز شد و در ۱۸ ml سرم فیزیولوژی استریل ۰/۸۵٪ هموزن شد. سپس رقت‌های اعشاری (۱:۱۰) از مایع هموزن شده تهیه گردید (Ben-Gigley et al., 1998; Gonzalez et al., 1999).

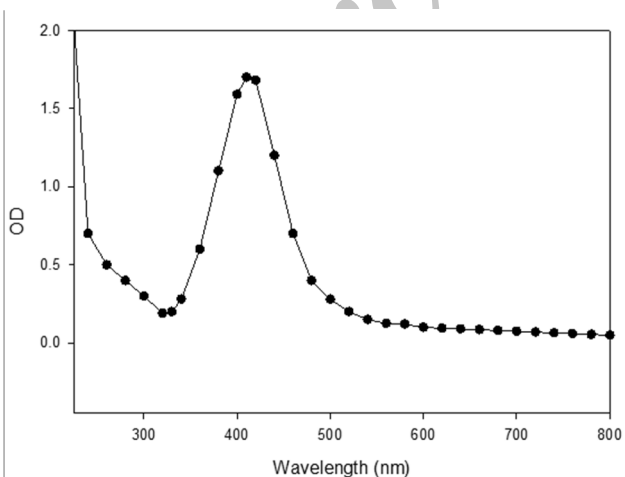
۲-۴. تهیه محیط‌های کشت، انکوباسیون و شمارش باکتری

جهت شمارش کل باکتری‌های مزوفیل و باکتری‌های سرمادوست، محیط کشت Plate count agar (Merk) مورد استفاده قرار گرفت. بعد از ساخت محیط کشت، ۰/۱ میلی لیتر از نمونه‌های تهیه شده مطابق دستور العمل بالا به روش pour plate کشت داده شد. شمارش پلیت‌های کشت داده شده برای باکتری‌های مزوفیل پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و شمارش باکتری‌های سرمادوست پس از ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۷ درجه سانتیگراد انجام شد (Ben-Gigley et al., 1998). جهت شمارش انتروباکتریاسه از محیط کشت Violet Red Bile Glucose VRBGA (Agar) (Merk) استفاده شد. نمونه‌های تهیه شده به میزان ۰/۱ میلی لیتر مطابق دستورالعمل بالا بر روی این محیط به روش pour plate کشت

¹ Static-renewal

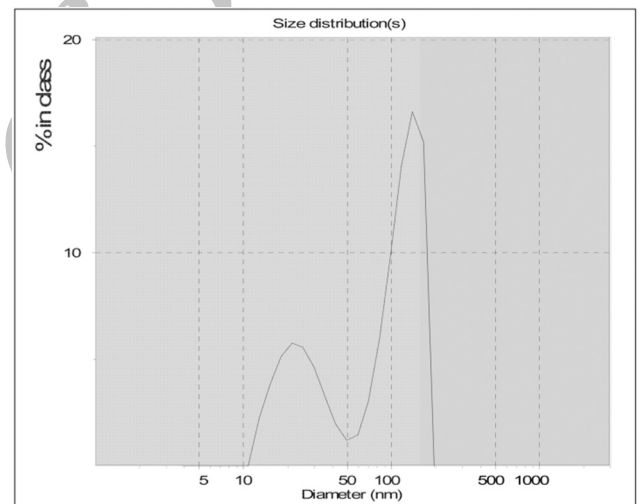


شکل ۲: (A) تصویر میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM) و (B) آنالیز EDX نانوذرات نقره



شکل ۳: پیک جذب نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه اسپکترومتر (UV-vis spectra)

طبق نتایج حاصل از دستگاه زتاسایزر، بار سطحی نانو ذرات نقره موجود در کلوئید مذکور به‌طور میانگین $1/0.3 \pm 0/13$ میلی‌ولت بود. همچنین بر اساس نتایج روش طیف سنجی اتمی نشری پلاسمای جفت شده القایی (ICP)، غلظت حقیقی نقره در کلوئید نانوذرات نقره ۳۹۸۰ میلی‌گرم بر لیتر تعیین گردید، که با غلظت گزارش شده توسط کارخانه تولید کننده (۴۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) اختلاف بسیار کمی داشت. نتایج حاصل از EDX نشان داد که تنها عنصر نقره در کلوئید نانوذرات استفاده شده وجود داشته است (شکل ۲B). همچنین اطلاعات حاصل از اسکن نانوذرات نقره توسط دستگاه اسپکترومتر (UV-vis) نشان داد که ماده‌ی مذکور دارای اوج (پیک) جذبی ۴۲۰ نانومتر هستند. به‌طوری‌که این پیک جذب حاکی از وجود ذرات نقره در ابعاد نانومتری است (شکل ۳).



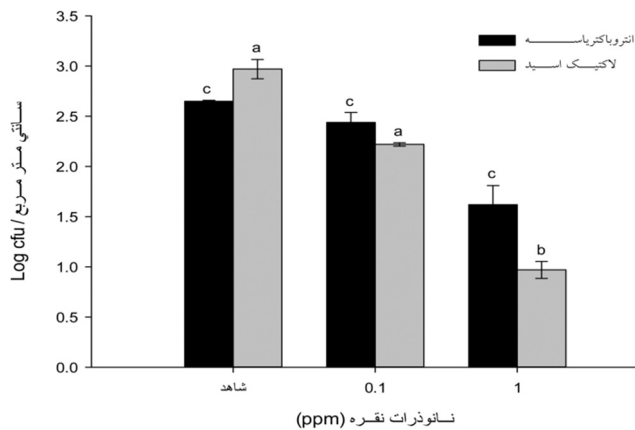
شکل ۱: توزیع اندازه ذرات در کلوئید نانوذرات نقره بر اساس نتایج دستگاه Zeta Sizer

نتایج حاصل از اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب استفاده شده در آزمایش در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: پارامترهای فیزیکی و شیمیایی اندازه‌گیری شده آب آکواریوم‌ها، قبل از انجام آزمایشات

نوع آب	شوری (ppt)	pH	بی کربنات (mg/L)	کربنات کلسیم (mg/L)	سدیم (mg/L)	کلراید (mg/L)	آمونیم کل (mg/L)	قلیائیت کل (mg/L)	ν
شیرین	۰/۴	-۸/۳ ۷/۹	۳۲۰	۱۰۲	۱۳/۸	۳۴/۹	۰/۱	۳۲۶	۴۱

لاکتیک اسید (LAB) در تیمار ۱ ppm به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد و تیمار ۰/۱ ppm نانو ذرات نقره است. مشابه باکتری‌های لاکتیک اسید، میانگین تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسه نیز در تیمار ۱ ppm کمتر از گروه شاهد و تیمار ۰/۱ ppm بود. اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P < 0/05$).



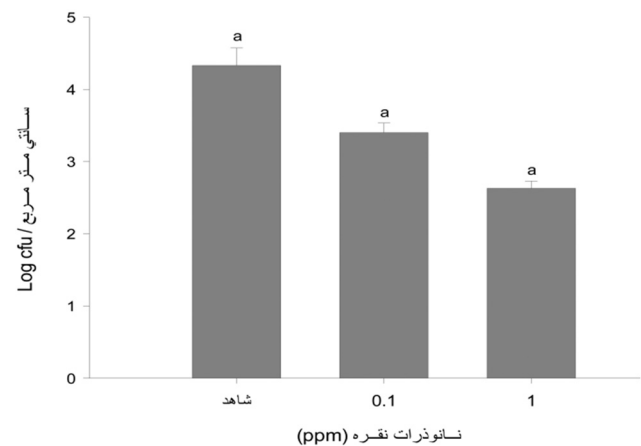
نمودار ۳: اثر نانوذرات نقره بر انتروباکتریاسه و باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از ۱۴ روز

۴. بحث و نتیجه‌گیری

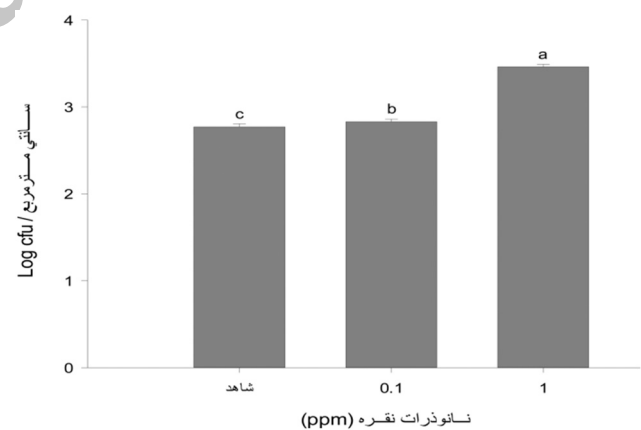
در مطالعه‌ی حاضر میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل پوست ماهیان شاهد پس از ۱۴ روز در حد $4/07 \pm 0/56 \log \text{cfu/cm}^2$ (میانگین \pm SD) بود. Gonzalez و همکاران (۱۹۹۹) تعداد باکتری‌های مزوفیل را در پوست قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی کمتر از مطالعه حاضر گزارش کردند. با توجه به اینکه شرایط محیط زیستی اثر قابل توجهی بر روی میکرو فلور پوست ماهی دارد (Cahill, 1990)، دلیل افزایش باکتری‌های مزوفیل در گروه شاهد مطالعه حاضر را می‌توان به شرایط متفاوت آزمایشگاهی و اختلاف سطح استرس نسبت داد. با افزایش غلظت نانوکلوئید نقره در آب آکواریوم‌ها تعداد باکتری‌های مزوفیل به‌طور جزئی کاهش یافت. به‌طوری‌که این نتایج با یافته‌های سایر محققین که بیانگر خاصیت ضد باکتریایی این نانوذرات است مطابقت دارد (Morones et al., 2005; Panáček et al., 2006; Shahverdi et al., 2007).

میانگین تعداد باکتری‌های سرمادوست در پوست گروه شاهد $2/77 \log \text{cfu/cm}^2$ بود که این میزان با مطالعه Gonzalez و همکاران (۱۹۹۹) مطابقت نشان داد. برخلاف باکتری‌های مزوفیل با افزایش غلظت نانوذرات نقره کلوئیدی از ۰/۱ به ۱ ppm تعداد

نمودارهای ۱ و ۲ به‌ترتیب میانگین شمارش کل باکتری‌های مزوفیل و باکتری‌های سرمادوست را در واحد سطح پوست ماهی نشان می‌دهند. اگرچه میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل پوست پس از ۱۴ روز نگهداری در غلظت ۱ ppm نانو کلوئید نقره ($3/31 \pm 0/08$) کمتر از تیمارهای شاهد بود اما ($4/07 \pm 0/56$) و ۰/۱ ppm ($3/59 \pm 0/21 \log \text{cfu/cm}^2$) بود اما این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P < 0/05$).



نمودار ۱: اثر نانوذرات نقره بر باکتری‌های مزوفیل پوست ماهی پس از ۱۴ روز



نمودار ۲: اثر نانوذرات نقره بر باکتری‌های سرمادوست پوست ماهی پس از ۱۴ روز نگهداری

جمعیت باکتری‌های سرمادوست در تیمار ۱ ppm به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و تیمار ۰/۱ ppm بیشتر شد ($P < 0/05$). همچنین میانگین تعداد باکتری‌های سرمادوست در پوست گروه شاهد در حد $2/77 \log \text{cfu/cm}^2$ تعیین گردید.

میانگین تعداد انتروباکتریاسه و لاکتیک اسید (LAB) در واحد سطح پوست در نمودار ۳ آورده شده است. تعداد باکتری‌های

اشرشیاکلاهی انجام شد، مشخص گردید که خواص ضد باکتریایی نانوذرات نقره در بین تمامی سویه‌های اشرشیاکلاهی به‌طور معنی‌داری متفاوت است. نتایج مطالعه مذکور نشان داد تفاوت در ضخامت دیواره پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم مثبت و منفی نمی‌تواند دلیل اصلی کاهش یا افزایش خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره در باکتری‌ها باشد (Ruparella et al., 2008). از سوی دیگر مطالعات نشان داده است که بار الکتریکی منفی سطح باکتری‌ها (گروه‌های فسفره و سولفور) موجب جذب نانوذرات نقره به خود می‌شود (Lin et al., 1998; Morones et al., 2005). بنابراین احتمالاً وجود اختلاف بار الکتریکی سطحی بین باکتری‌های گوناگون می‌تواند موجب اختلاف در میزان جذب نانوذرات نقره به خود و در نهایت موجب تفاوت در خاصیت ضد باکتریایی نانونقره علیه سوش‌های مختلف باکتریایی شود.

البته فرض فوق احتیاج به تحقیقات بیشتری دارد. در مجموع می‌توان گفت خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره برای گروه‌های مختلف باکتریایی مورد مطالعه متفاوت و منحصر به‌فرد است. با توجه به تاثیرپذیری فلور پوست ماهی از محیط پیرامون و همچنین تنوع زیاد فلور باکتریایی پوست ماهی، پیشنهاد می‌گردد ضمن تخلیص گونه‌های مختلف باکتریایی و پایش روند تغییرات آنها طی دوره نگهداری تحت غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره، برای هر سویه در محیط آزمایشگاهی تست‌های تشخیص حساسیت باکتری^۱ به نانوذرات مذکور مورد بررسی قرار گیرد. بدین ترتیب می‌توان با بررسی اثر نانوذرات به‌صورت اختصاصی علیه سویه‌های باکتریایی مختلف پوست و همچنین اثر متقابل تیمار (غلظت‌های نانوذرات نقره) × باکتری (باکتری‌های رقیب) تفسیر جامع‌تری از نتایج به‌دست آمده ارایه نمود.

۵. سپاسگزاری

بدین وسیله از جناب آقای مهندس محمد خضری به‌دلیل همکاری‌های صمیمانه نهایت تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

Angelescu, D.G.; Vasilescu, M.; Somoghi, R.; Donescu,

باکتری‌های سرمادوست افزایش یافت. به‌طور کلی اگرچه نانوذرات نقره دارای پتانسیل ضد میکروبی وسیعی است، اما ممکن است گونه‌های باکتریایی نیز وجود داشته باشند که نانوذرات نقره توانایی کنترل رشد آنها را به‌طور کامل نداشته باشد و یا تنها با به تعویق انداختن رشد و تکثیر آنها، تا مدت زمان طولانی از ازدیاد آنها در محیط جلوگیری کند (Sondi and Salopek-Sondi, 2004). از سوی دیگر با توجه به اینکه در مطالعه حاضر تعداد باکتری‌های رقیب نظیر باکتری‌های لاکتیک اسید در پوست ماهیان تیمار ppm ۱ به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافته بود. احتمالاً دلیل افزایش باکتری‌های سرمادوست را می‌توان به اثر نانوذرات نقره در جهت حذف باکتری‌های رقیب نظیر باکتری‌های LAB و در پی آن افزایش باکتری‌های سرمادوست پوست مانند سدوموناس‌ها، فلاوو باکتریوم‌ها و دیگر باکتری‌ها نسبت داد (Cahill, 1990). لازم به ذکر است که باکتری‌های LAB قادراند با تولید ترکیبات ضد میکروبی نظیر لاکتیک اسید و باکتریوسین‌ها سایر باکتری‌های رقیب را حذف کنند (de Arauz et al., 2009; Shrivastava et al., 2007; Zhou et al., 2010). بنابراین ممکن است با کاهش باکتری‌های اسید لاکتیک، زمینه رشد باکتری‌های سرمادوست فراهم شده باشد.

باکتری‌های اسید لاکتیک در مقایسه با انتروباکتریاسه در مواجهه با نانوذرات نقره آسیب‌پذیری بیشتری داشتند (نمودار ۳). به‌طوری‌که جمعیت باکتری‌های LAB پوست ماهیان نگه داشته شده در آکواریوم‌های حاوی ۰/۱ و ۱ ppm نانوذرات نقره نسبت به گروه شاهد به‌ترتیب ۰/۳۳ و ۳/۰۶ برابر کاهش نشان دادند. اما جمعیت انتروباکتریاسه در تیمارهای ۰/۱ و ۱ ppm نسبت به گروه شاهد به‌ترتیب ۰/۸۶ و ۱/۶ برابر کاهش یافته بود. در برخی مطالعات بیان شده که خواص ضد باکتریایی ناشی از نانوذرات نقره در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی با هم متفاوت است و اظهار شده که نفوذ نانوذرات نقره در غشای باکتری‌های گرم منفی به‌دلیل داشتن لایه‌ی پپتیدوگلیکان نازک‌تر (۷-۸ نانومتر) نسبت به باکتری‌های گرم مثبت (۲۰-۸۰ نانومتر) بیشتر بوده و در نهایت منجر به مرگ این باکتری‌ها می‌شود (Shrivastava et al., 2007). اما نتایج مطالعه‌ی حاضر در مورد جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک (گرم مثبت) و باکتری‌های انتروباکتریاسه (گرم منفی) با فرض مذکور در تضاد است (Ringø and Gatesoupe, 1998). علاوه بر این، در آزمایشاتی که توسط Jayesh و همکاران (۲۰۰۸) بر روی سویه‌های مختلف

¹ Antimicrobial Susceptibility Testing

- in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. *Aquatic Toxicology*, 101: 117-125.
- Farkas, J.; Christian, P.; Urrea, J.A.G.; Roos, N.; Hasselöf, M.; Tollefsen, K.E.; Thomas, K.V., 2010. Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 96: 44-52.
- Farré, M.; Gajda-Schranz, K.; Kantiani, L.; Barceló, D., 2009. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393: 81-95.
- Gonzalez, C.J.; Lopez-Diaz, T.M.; Prieto, M.; Otero, A., 1999. Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*), and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Food Protection*, 174, 62: 1270-1277.
- Lin, Y.S.E.; Vidic, R.D.; Stout, J.E.; McCartney, C.A.; Yu, V.L., 1998. Inactivation of *Mycobacterium avium* by copper and silver ions. *Water research*, 32: 1997-2000.
- Mantovani, E.; Porcari, A.; Meili, C.; Widmer, M., 2009. Framing nano project: A multistakeholder dialogue platform framing the responsible development of nanosciences and nanotechnologies. *Mapping Study on Regulation and Governance of Nanotechnologies*. AIRI/Nanotec IT, January.
- Morones, J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Ramirez, J.T.; Yacaman, M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16: 2346.
- Nia, J.R., 2011. Preparation of colloidal nanosilver. *Google Patents*.
- OECD., 1984. Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study. *OECD guidelines for the testing of chemicals* (No. 204).
- OECD., 1998. *OECD guidelines for testing of chemicals*. OECD Publishing.
- D.; Teodorescu, V.S., 2010. Kinetics and optical properties of the silver nanoparticles in aqueous L64 block copolymer solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 366: 155-162.
- ASTM., 2007. *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macro invertebrates, and Amphibians 1.* Annual Book of ASTM Standards 96 (Reapproved 2007): 1-22.
- Ben-Gigley, B.; Vieites Baptista de Sousa, J.M.; Villa, T.G., 1998. Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection* 174, 61: 608-615.
- Bilberg, K.; Malte, H.; Wang, T.; Baatrup, E., 2010. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology*, 96: 159-165.
- Cahill, M.M., 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology*, 19: 21-41.
- Chen, X.; Schluesener, H., 2008. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology letters*, 176: 1-12.
- Choi, O.; Clevenger, T.E.; Deng, B.; Surampalli, R.Y.; Ross, Jr, L.; Hu, Z., 2009. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water research*, 43: 1879-1886.
- Colvin, V.L., 2003. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 21: 1166-1170.
- De Arauz, L.J.; Jozala, A.F.; Mazzola, P.G.; Vessoni Penna, T.C., 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20: 146-154.
- Farkas, J.; Christian, P.; Gallego-Urrea, J.A.; Roos, N.; Hasselöf, M.; Tollefsen, K.E.; Thomas, K.V., 2011. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles

- Williams, P.M.; Maffei, T.G.G.; Wright, C.J.; Doak, S.H., 2009. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30: 3891-3914.
- Sondi, I.; Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275: 177-182.
- Tiede, K.; Hassellöv, M.; Breitbarth, E.; Chaudhry, Q.; Boxall, A., 2009. Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *Journal of Chromatography A*, 1216: 503-509.
- Tolaymat, T.M.; El Badawy, A.M.; Genaidy, A.; Scheckel, K.G.; Luxton, T.P.; Suidan, M., 2010. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the Total Environment*, 408: 999-1006.
- Zhou, G.; Xu, X.; Liu, Y., 2010. Preservation technologies for fresh meat—A review. *Meat Science*, 86: 119-128.
- Panáček, A.; Kvítek, L.; Pucek, R.; Kolár, M.; Večerová, R.; Pizurova, N.; Sharma, V.K.; Tat'jana Nevečná, a.; Zboril, R., 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110: 16248-16253.
- Ringø, E.; Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160: 177-203.
- Ruparelia, J.P.; Chatterjee, A.K.; Duttgupta, S.P.; Mukherji, S., 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta biomaterialia*, 4: 707-716.
- Shahverdi, A.R.; Fakhimi, A.; Shahverdi, H.R.; Minaian, S., 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3: 168-171.
- Shrivastava, S.; Bera, T.; Roy, A.; Singh, G.; Ramachandrarao, P.; Dash, D., 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18: 225103.
- Singh, N.; Manshian, B.; Jenkins, G.J.S.; Griffiths, S.M.;