

جایگزینی آنتی بیوتیک با نانوذرات نقره در رقیق کننده های اسپرم گاو

نسیم حیاتی رودباری^{۱*}، سیروس امیری نیا^۲، کاظم پرپور^۳، ریحانه سیدعلیان^۴

^۱ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

^۲ موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

^۳ استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

^۴ کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: نانو ذرات نقره با قطری حدود ۱ تا ۱۰۰ نانومتر به عنوان عنصر ضد میکروبی در داروسازی کاربرد دارند. کاربرد وسیع آن ها در زندگی امروزی و مقاومت باکتری های بیماری زا به آنتی بیوتیک ها که در سال های اخیر ظاهر شده است، دلیل مهمی برای جایگزینی آنتی بیوتیک ها با نانو نقره می باشد، اما نانو ذرات دارای خواص سمیتی نیز می باشند که تا به امروز در مورد آن به طور دقیق مطالعه نشده است.

مواد و روش ها: در این تحقیق ما آنتی بیوتیک ها را با غلظت های مختلف محلول نانوذرات نقره با قطر ۲۰ نانومتر در رقیق کننده های منی گاو جایگزین کردیم و میزان زنده مانی، تحرک و حرکت پیش رونده اسپرم ها را در زمان های متوالی ۱ و ۳ ساعت بعد با استفاده از سیستم نرم افزاری کاسا (CASA) ارزیابی کردیم. گروه های مورد بررسی در پژوهش حاضر شامل: گروه شم بدون آنتی بیوتیک و نانوذرات نقره، گروه آنتی بیوتیک از ۸ گروه باقی مانده یک گروه به عنوان گروه آنتی بیوتیک و ۷ گروه دیگر به عنوان گروه های نانو نقره در نظر گرفته شد. به گروه آنتی بیوتیک با دریافت پنی سیلین و استرپتومایسین از هر کدام به میزان ۱ میلی گرم بر میلی لیتر و گروه های نانونقره که به ترتیب نانو نقره را با غلظت های ۰/۰۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۳، ۰/۰۵، ۰/۰۷، ۰/۰۹، ۰/۱۱ میلی لیتر محلول نانونقره دریافت کردند.

یافته ها: میزان زنده مانی، تحرک و حرکت پیش رونده اسپرم ها در تیمارهای مختلف در $P < 0.005$ تفاوتی نداشت در حالی که گروه تیمار ۰/۱۱ میلی لیتر محلول نانو نقره پس از ۱ ساعت و ۳ ساعت به ترتیب در $P < 0.005$ و $P < 0.001$ تفاوت معنی داری را نشان داد. همچنین در بررسی ما بر روی میکروارگانیسم های موجود در مایع منی مشخص گردید که اثرات نانو نقره مشابه آنتی بیوتیک هایی همانند پنی سیلین و استرپتومایسین می باشد. همچنین نشان داده شد نمونه شم دارای باکتری گرم مثبت می باشد. تیمارهای آنتی بیوتیک و غلظت های ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی لیتر نانو نقره دارای مقدار کمی باکتری بود و تیمارهای حاوی نانونقره با غلظت های بیشتر تقریباً عاری از هر گونه میکروارگانیسم بود.

نتیجه گیری: بر اساس یافته های این مطالعه دوز ۰/۰۵ mL نانو نقره قطر ۲۰ نانومتر در ضمن دارا بودن خواص ضد میکروبی در حد مطلوب، آسیبی از نظر زنده مانی و حرکت پیش رونده که دو شاخص مهم باروری هستند به اسپرم ها وارد نمی سازد و می تواند جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک ها در رقیق کننده های اسپرم باشد.

کلمات کلیدی: نانو ذرات نقره، رقیق کننده های منی، اسپرم گاو، آنتی بیوتیک ها

مقدمه

زمینه های مختلف از زندگی در جهان گسترش یافته است. یکی از نمونه های نانوترکیبات، نانونقره می باشد که در الکترونیک، صنعت ساختمانی و تکنولوژی شیمیایی و در داروسازی به عنوان یک عنصر ضدباکتریایی و ضدقارچی تاثیرگذار می باشد (۷). نانو

نانوتکنولوژی یک شاخه رو به رشد از علم می باشد که در

آدرس نویسنده مسئول: تهران - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

تهران گروه زیست شناسی

Email: nasimhayati@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۷/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۲۷

منبع انرژی پایه برای اعمال سلول و زنده مانی استفاده می کند. اسپرم این انرژی را برای فعالیت هایی چون: هایپراکتیواسیون و واکنش آکروزومی، برای نفوذ به اووسیت و تحرک نیاز دارد. برای تامین این انرژی، اسپرم به مواد خارج سلولی نیازمند است (۱). ارزیابی های مرسوم منی تازه شامل حجم بدون ژل، غلظت اسپرم، تحرک و مورفولوژی است. روش ارزیابی کامپیوتری نمونه منی که به Computer Automated Semen CASA (Analyzer) معروف شده است، برای ارزیابی نمونه های منی در کارهای پژوهشی به ویژه برای بررسی باروری به کار برده می شود و دقیق ترین روش کمی ارزیابی منی است که غلظت اسپرم، درصد اسپرم زنده (جنبا) همراه با حرکت پیش رونده و حرکت دورانی (چرخشی) و مورفولوژی اسپرم را تعیین می کند (۱). شواهد محکمی وجود دارد که نانو نقره گونه های اکسیژن فعال ROS را تولید می کند. رادیکالهای آزاد به دو نوع ROS و RNS دسته بندی میشوند. از نظر فیزیولوژیکی رادیکال آزاد به بلوغ اسپرم، کاپاسیته شدن آن، هایپراکتیو شدن آن، واکنش آکروزومی و آمیختگی اسپرم- تخمک کمک میکند. از نظر پاتولوژیکی رادیکالهای آزاد باعث پراکسیداسیون لیپید، آسیب DNA و آپوپتوز میشود. ROS در سطح فیزیولوژیکی برای عملکرد مناسب اسپرم ضروری میباشد (۸). به این طریق نانو نقره با فعال سازی ROS ممکن است باعث ایجاد دو خاصیت ضدباکتریایی و پتانسیل سمیت برای سلول های زنده بدن موجودات شوند که در این کار تحقیقاتی به بررسی این خصوصیت می پردازیم (۷).

مواد و روش ها

این مطالعه در مرکز اصلاح نژاد دام کشور انجام شد. منی پس از سازش گاو به انزال در مهبل مصنوعی، هفته ای ۲ بار به مدت ۱۲ هفته جمع آوری شد. نمونه های جمع آوری شده در عرض ۱۰ دقیقه به آزمایشگاه منتقل و در حمام آب ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می شد. پس از ثبت حجم نمونه انزال شده با استفاده از لوله مدرج، نمونه به نسبت مناسب رقیق شده و از نظر پارامترهایی همانند زنده مانی (بقا)، تحرک، جنبایی پیشرونده و مورفولوژی با سیستم نرم افزاری کاسا ارزیابی شد. در این آزمایش از رقیق کننده سترات سدیم به میزان ۲/۹۱ gr در ۱۰۰ mL آب مقطر و ۷ mL گلیسرین و ۲۰ mL زرده تخم مرغ استفاده شد. سپس رقیق کننده در ۱۰ فالكون ۱۵ mL هر کدام

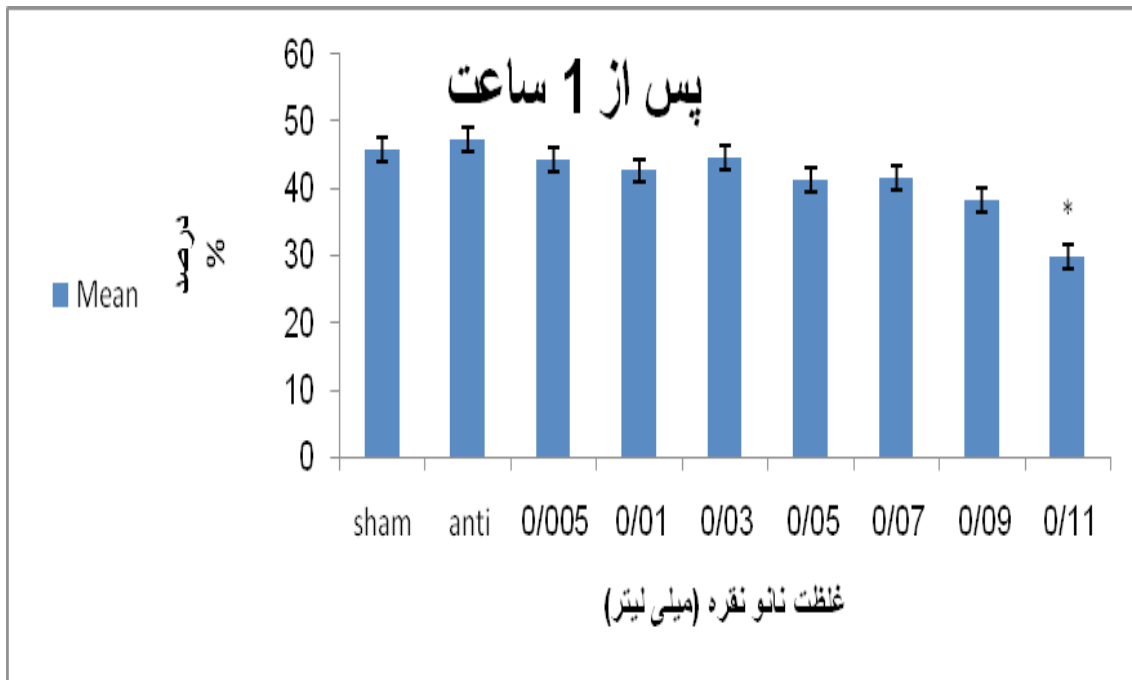
ذرات نقره نسبت به آنتی بیوتیک ها دارای مزایایی می باشند که در زیر به تعدادی از آنها اشاره می شود: باکتری ها به نانو ذرات نقره مقاومت پیدا نمی کنند، زیرا این ذرات بر روی قسمت های مختلف و آنزیم های متعددی موثر هستند. نانوذرات نقره بر روی طیف گسترده ای از باکتری ها موثر هستند و بر روی سلولهای انسانی اثر سوء ندارند زیرا سلولهای انسانی به صورت بافت هستند. بر خلاف آنتی بیوتیکها که پس از واکنش با سلول تغییر شکل یافته و بی اثر می شوند، نانوذرات نقره پس از اثر بر میکروبهها آزاد شده و بر میکروارگانیسمهای دیگر تاثیر می گذارند (۲). افزایش مقاومت باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک ها باعث بروز مشکل جدی در سلامت عمومی می شود. بنابراین یک انگیزه قوی برای بهبود آنتی بیوتیکهای جدید وجود دارد. اندازه و سایز نانو مواد شبیه و هم اندازه بسیاری از مولکول ها و ساختارهای زیستی می باشد. بنابراین نانو مواد می توانند برای تحقیقات و استفاده های بیو دارویی مفید باشند که از جمله آنها کاربرد آنها بر رقیق کننده های مایع منی می باشد (۸) pH منی گاو ۶/۸-۷ و اسمولالیته آن تقریباً ۳۲۰ میلی اسمول است. (۵) سر اسپرم گاو، بیضی شکل است و هسته ای پهن دارد که کروماتین آن متراکم است. قسمت قدامی هسته سر اسپرم، به وسیله آکروزوم پوشیده شده است (۱۰). آکروزوم، غشای دو لایه ای است که آنزیم هایی مانند آکروزین، هیالورونیداز، زونالازین، استرازها و هیدرولازها را دارد. این آنزیم ها، بین غشاهای بیرونی و درونی آکروزوم هستند (۱) در واقع آکروزوم اسپرم از سه ناحیه ی راسی (Apical piece)، اصلی (Principal piece) و استوایی (Equatorial piece) تشکیل شده است. بخش استوایی آکروزوم در زمان لقاح نخستین بخش از اسپرم است که به تخمک می چسبد. بخشهای راسی و اصلی آکروزوم کلاهک آکروزوم را تشکیل می دهند. (۳) فلاژلوم دارای بخش هایی به نام گردن است که در فرو رفتگی سطح پسین هسته، قرار می گیرد و از عقب به ۹ تار ضخیم می چسبد که تقریباً در سراسر فلاژلوم ادامه دارند. بخشی از فلاژلوم که بین گردن و آنولوس قرار دارد، قطعه میانی نام دارد که مرکز آن را آکسونوم تشکیل می دهد؛ آکسونوم در سراسر فلاژلوم ادامه می یابد. اسپرم یکی از کوچکترین سلول های بدن است و توانایی ذخیره کردن انرژی را ندارد. اسپرم از آدنوزین تری فسفات (ATP) به عنوان

Excel هیستوگرام ها ترسم گردید.

یافته ها

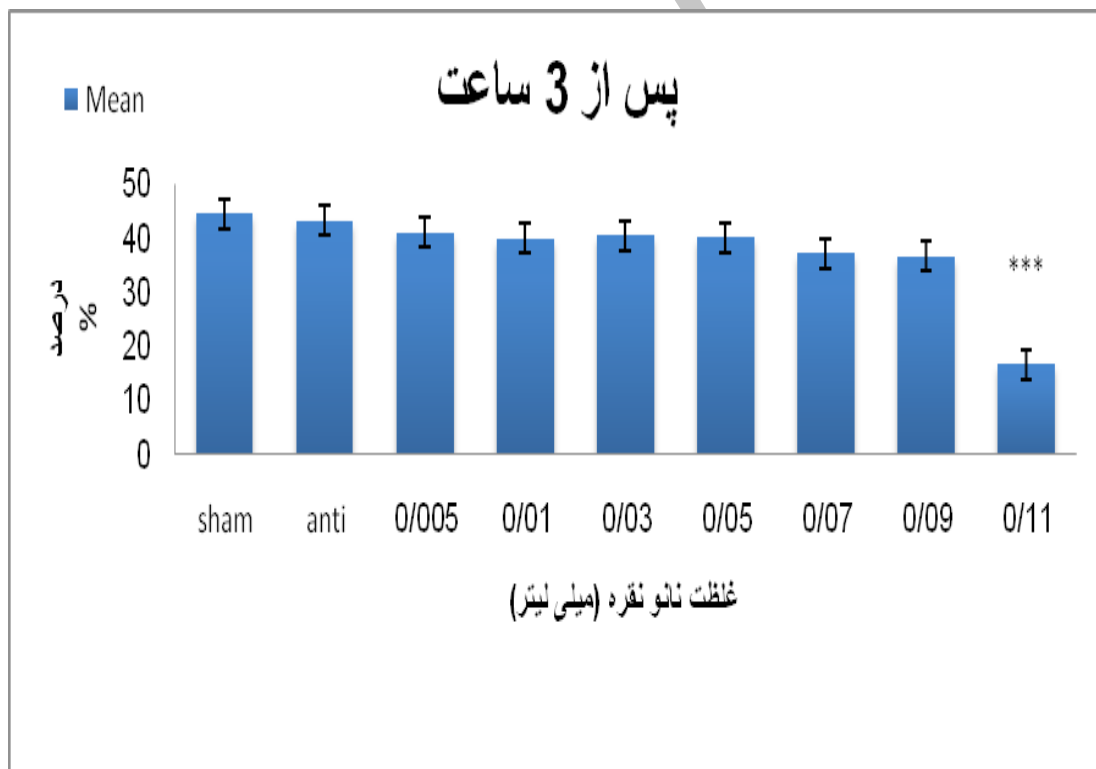
یکی از پارامترهای ارزیابی میزان باروری اسپرم، میزان حرکت پیش رونده آن است. در حقیقت اسپرمی که دارای حرکت پیش رونده است اسپرم زنده ای می باشد و از لحاظ مورفولوژیکی تا حدود زیادی می توان گفت اسپرم سالمی است. در این پروژه با استفاده از سیستم کاسا به ارزیابی حرکت رو به جلو نمونه های اسپرمی پرداختیم و اسپرم های دارای حرکت رو به جلوی بیشتر از ۴۰٪ به عنوان اسپرم های زنده و سالم در نظر گرفته شد. هیستوگرام بدست آمده در زمان ۱ ساعت پس از رقیق سازی مشخص می سازد که اختلاف معنی داری در میزان حرکت پیش رونده اسپرم در بین گروه های آزمایشی به جز گروه حاوی دوز ۰/۱۱ میلی لیتر محلول نانوقره دیده نمی شود. ($P < 0/05$) (هیستوگرام ۱). در مرحله دوم ارزیابی اسپرمی در زمان ۳ ساعت پس از رقیق سازی مایع منی حرکت پیش رونده اسپرم مطالعه شد. پس از ثبت اطلاعات و بررسی آماری داده ها مشخص گردید که در تمامی گروه های آزمایشی، اسپرم ها دارای حرکت پیش رونده قابل قبولی می باشند و در مقایسه با هم تفاوت معنی داری را نشان نمی دهند ($P > 0/05$). در حالی که دوز ۰/۱۱ میلی لیتر نانوقره در رقیق کننده در مقایسه با سایر نمونه ها دارای اختلاف معنی دار ($P < 0/001$) می باشد. به عبارت دیگر در دوزهای بالاتر ۰/۱۱ میلی لیتر محلول نانوسیلور کاهش چشمگیری در حرکت پیش رونده و باروری اسپرم و افزایش مرگ و میر مشاهده شد (هیستوگرام ۲).

به میزان ۱۰ mL تقسیم بندی شد. یک فالكون به عنوان گروه شم در نظر گرفته شد، به فالكون دوم به میزان ۰/۰۷ gI پنی سیلین ۵ میلیون واحد در میلی لیتر و ۰/۱ gI استرپتومایسین اضافه شد. به فالكون های بعدی به ترتیب دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹، ۱/۱، میلی لیتر محلول PPM ۱۰۰۰ نانو نقره سایز ۲۰ نانومتر به عنوان تیمار آزمایشی اضافه شد. سپس تیمارها در حمام آب ۳۷ سانتی گراد قرار داده شد. پس از رسیدن دمای تیمارها به ۳۷ سانتی گراد نمونه های منی را به نسبت مناسب ۱:۲۰ به تیمارها اضافه و طی یک مرحله رقیق کردیم. سپس به ارزیابی تیمارها پس از ۰/۵ و ۳ ساعت با استفاده از سیستم کاسا پرداخته شد و تیمارها از لحاظ پارامترهایی همانند زنده مانی، جنبایی پیشرونده اسپرم ها با یکدیگر مقایسه شدند. در ادامه این آزمایش از هر کدام از تیمارها به میزان ۱ mL جدا و برای تست آنتی بیوتیکی به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شد. در آزمایشگاه میکروبیولوژی بر روی تیمارها تست شمارشی کلنی های میکروبی انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا نمونه های یک میلی لیتری به طور جداگانه سه بار در لوله های آزمایش حاوی ۹ mL آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ رقیق شده و سپس در پلیت های حاوی محیط کشت نوترینت آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. در ارزیابی خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره بررسی هر نمونه و شمارش تعداد کلنی های تشکیل شده صورت گرفت. در حقیقت هر کلنی تشکیل شده از ۱۰۰۰ باکتری با واحد uL/mL می باشد. مدت زمانی که باید به باکتری فرصت داده شود تا باکتری رشد کرده و کلنی تشکیل دهد در حدود ۴۸-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در درون انکوباتور می باشد که در این پژوهش حدودا تا ۳۶ ساعت به باکتری ها فرصت داده شد. پس از آن بررسی و مقایسه پلیت ها از نظرنوع و تعداد کلنی های میکروبی صورت گرفت. نهایتا بر روی انواع کلنی های موجود در تیمار شاهد رنگ آمیزی گرم انجام شد تا نوع باکتری های موجود به طور دقیق تعیین شود. اعداد به دست آمده به طور خام به کامپیوتر داده و آنگاه تحلیل و مقایسه ی بین میانگین این اعداد با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶ و آنالیز واریانس یک طرفه on-way (Anova) و تست توکی (Tukey) با در نظر گرفتن انحراف معیار (SE) انجام داده شد و سپس با استفاده از نرم افزار



هیستوگرام ۱- مقایسه میانگین میزان حرکت رو به جلو اسپرمی در رقیق کننده های شم، آنتی بیوتیک ورقیق کننده های حاوی دوزهای مختلف محلول نانوقره پس از یک ساعت ($\bar{x} \pm SE$) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

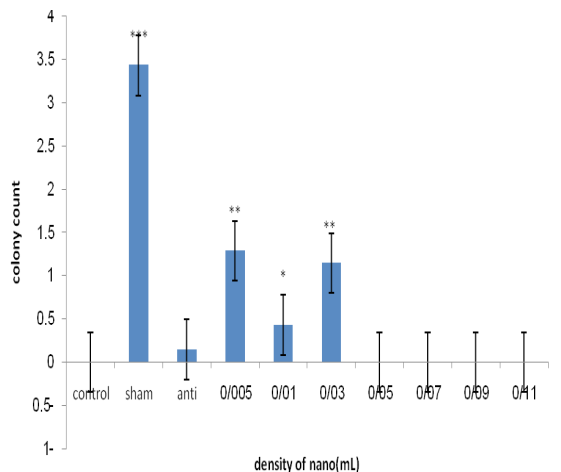
($\bar{x} \pm SE$) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)



هیستوگرام ۲- مقایسه میانگین میزان حرکت رو به جلو اسپرمی در اکستندره های شم، آنتی بیوتیک واکستندره های حاوی دوزهای مختلف محلول نانوقره پس از سه ساعت

($\bar{x} \pm SE$) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

غیربیماریزا است و به دلیل داشتن کاتالاز وقتی در کنار آب اکسیژنه قرار گیرد حباب اکسیژن می دهد. اما میزان آلودگی ها را با شمارش تعداد کلونی ها می توان سنجید. پس از شمارش تعداد کلنی ها همانطور که در هیستوگرام مشخص شده است. در دوز بیشتر از ۰/۰۵ میلی لیتر محلول نانو نقره تقریباً هیچ نوع آلودگی یافت نشد. هرچند در دوزهای پایین تر محلول نانونقره نیز نسبت به نمونه شام میزان آلودگی کمی مشاهده می شود. بدین ترتیب خاصیت آنتی بیوتیکی نانوذرات نقره به اثبات می رسد. خواص ضد میکروبی نانو ذرات نقره نیز دارای اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0.001$) (هیستوگرام ۳). در بررسی های کلنی ها و رنگ آمیزی گرم مشخص شد باکتری ها از نوع استرپتوباسیل و کوکسی (استافیلوکوک) و گرم مثبت می باشند که نانو ذرات نقره قادر است رشد آن ها را مهار کند.



هیستوگرام ۳ - مقایسه میانگین تعداد کلنی های میکروبی در نمونه های شام، آنتی بیوتیک و دوزهای مختلف محلول نانو سیلور.

بحث

تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۰ توسط Ahamed و همکاران انجام شد نشان داد که نانو نقره بسته به اندازه و دوز و مدت زمان تأثیر گذاری بر روی بافت های سلولی مختلف با مکانیسم های متفاوت از قبیل نکروز، آپوپتوزیس، کاهش عملکرد سلولی، کاهش عملکرد میتوکندریایی، استرس اکسیداتیو و قطعه قطعه کردن DNA باعث القاء سمیت در محیط های زیستی و سلولی می شود. (۴) در مورد سلول های بنیادی اسپرماتوگونی موش تأثیر $5\text{-}\mu\text{g}/\text{cm}^3$ محلول نانونقره سایز ۱۵ به

پس از اینکه پلیت ها را از محیط انکوباتور خارج کردیم، در زیر هود، درب پلیت ها را برداشته و پلیت های حاوی محیط کشت را به لحاظ ظاهری بررسی کردیم. در نگاه اول تغییر رنگ محیط کشت نشان دهنده شروع آلودگی است. کلنی های میکروبی دارای اشکال، اندازه و رنگ متفاوت می باشند که از روی نوع کلنی ها تا حدی نوع باکتری قابل تشخیص می باشد. در بیشتر پلیت هایی که از آلودگی میکروبی نتیجه شد ۴ نوع کلنی مشاهده شد: ۱- کلنی هایی که به صورت دایره های معلق در محیط کشت دیده می شدند و دارای رنگ شیری بودند. ۲- کلنی هایی که به صورت دایره های ریز زیادی در کنار هم قرار داشتند و از لحاظ ظاهری مانند رنگ پاشیده شده بودند (شکل ۱-الف) ۳- کلنی هایی که به صورت دایره ای بزرگ بودند و دارای رنگ تیره تری بودند و به صورت منفرد قرار داشتند و اغلب دارای حاشیه ای نامنظم بودند (شکل ۱-ب) ۴- کلنی هایی که به صورت تجمع تعداد معدودی دایره (۲-۳ کلنی) با حاشیه ای منظم در کنار هم جا داشتند. (شکل ۱-ب) از روی ظاهر این کلونی ها تا حدود زیادی می توان پی برد که ۳ نوع کلنی اول حاصل باکتری باسیل و نوع آخر حاصل باکتری کوکسی می باشد. در آلودگی های قارچی اغلب در روی محیط کشت تغییر رنگ ریشه ماندی دیده می شود. اما برای تشخیص دقیق تر نوع باکتری های موجود از رنگ آمیزی گرم استفاده شد. تقریباً تمامی باکتری های موجود در مایع منی استفاده شده. در این تحقیق از نوع باکتری های گرم مثبت بودند که به رنگ بنفش دیده می شوند. به طور مثال باسیلوس سوبتیلیس به صورت مستطیل منظم با دو انتهای کشیده است و به صورت معلق در محیط کشت دیده می شود. باکتری استافیلوکوک به صورت دایره های خوشه انگوری و باکتری استرپتوباسیل به صورت میله های زنجیروار مشاهده می شود. با این وجود گاهی کلنی های باکتری در رنگ آمیزی گرم نیز خیلی شبیه هم دیده می شوند. مانند دو باکتری استافیلوکوک و استرپتوکوک. برای افتراق این دو از هم، تست تکمیلی دیگری به کار گرفته شد. در این تست از آب اکسیژنه استفاده شد. مقدار کوچکی از کلنی باکتری ها را با آب اکسیژنه مخلوط کردیم. کوکسی استرپتوکوک بیماریزا است و چون کاتالاز منفی است اثر آب اکسیژنه را خنثی نمی کند، اما کوکسی استافیلوکوک

برهم کنش مستقیم با باکتری ها به وجود می آورد قطری حدود ۱-۱۰ نانومتر دارند(۵). در مطالعه ما محلول نانو نقره با قطر ۲۰ نانومتر با غلظت ۱۰۰۰ PPM در دوزهای بیشتر از ۰/۰۵ میلی لیتر دارای خواص ضد میکروبی به نسبت خوبی بود و توانست تقریباً تمامی قارچها و باکتری های موجود در نمونه های رقیق شده اسپرمی همانند باسیل و کوکسی را تخریب و از بین ببرد. هرچند در دوزهای پایین تر محلول نانونقره نیز نسبت به نمونه شم میزان آلودگی کمی مشاهده می شود. بدین ترتیب با مشاهده نتایج حاصل از آزمایشات این مطالعه، خاصیت آنتی بیوتیکی نانوذرات نقره به اثبات می رسد و می توان نانو نقره را جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک ها، در رقیق کننده های منی به حساب آورد. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان می دهد که دوز ۰/۰۵ mL نانو نقره قطر ۲۰ نانومتر در ضمن دارا بودن خواص ضد میکروبی در حد مطلوب، آسیبی از نظر زنده مانی و حرکت پیش رونده که دو شاخص مهم باروری هستند به اسپرم ها وارد نمی سازد و می تواند جایگزین مناسبی برای



شکل ۱- الف- باکتری باسیل کلنی هایی به شکل رنگ پاشیده شده. ب- باکتری باسیل کلنی هایی به شکل دایره های منفرد تیره رنگ، باکتری کوکسی به شکل تجمع تعداد معدودی کلنی های دایره ای شکل.

مدت ۲۴ ساعت بر روی این سلول ها باعث کاهش عملکرد میتوکندریایی و افزایش میزان LDH، (لاکتات دهیدروژناز) می شود(۳). در مطالعه ما بر خلاف مطالعه بالا محلول نانو نقره سایز ۲۰ نانومتر با غلظت ۱۰۰۰ PPM به مدت ۳ ساعت در دوزهای کمتر از ۰/۱ میلی لیتر محلول نانونقره در رقیق کننده منی، اثر سمیت محسوسی بر روی سلول های اسپرم نداشت و از حرکت پیش رونده اسپرم ها کاسته نشد. همچنین در زمان ۱ ساعت پس از اضافه کردن در دوزهای بالاتر از ۰/۱ میلی لیتر محلول نانونقره نیز تأثیر سمیتی کمی دیده شد. محققان دریافته اند که استفاده از نانو ذرات نقره می تواند یک راه عملی برای استفاده از خاصیت میکروب کشی آن باشد. در مطالعه ای تأثیر نانو نقره در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی ایکلاهی مورد بررسی قرار گرفت. استاف به عنوان باکتری گرم مثبت و ایکلاهی به عنوان باکتری گرم منفی استفاده شد. مشخص شده نانو نقره هر دو باکتری گرم مثبت و منفی را از بین می برد. نانو نقره بر روی باکتری های استاف با دوز ۵۰ ppm و ایکلاهی با دوز ۱۰۰ ppm بر روی باکتری ها اثر می گذارد(۱۱). در آزمایش ما بیشتر باکتری های موجود در نمونه های منی از نوع باکتری های گرم مثبت بودند که به رنگ بنفش دیده می شوند. به طور مثال باسیلوس سوبتیلیس، باکتری استافیلوکوک را می توان نام برد. این باکتری ها در نمونه شم که فاقد آنتی بیوتیک و دوزهای مختلف محلول نانونقره بود، تشکیل کلنی هایی داده بودند. در دوزهای کم نانونقره و حتی به تعداد ناچیزی در برخی از نمونه های آنتی بیوتیکی تعدادی از این کلنی ها دیده می شد. ولی در دوزهای بالاتر از ۰/۰۵ نانونقره این باکتری ها از بین رفته بودند. به گفته محققان یون های نقره با ۳ ترکیب مهم باکتری واکنش می دهند: با پپتیدوگلیکان های دیواره سلولی (۱۱) غشای پلاسمایی (۷) ، DNA سیتوپلاسمیک باکتری (۹،۱۲) و پروتئین های باکتریایی به خصوص آنزیم هایی که در مراحل حیاتی سلول شرکت دارند همانند زنجیره انتقال الکترون(۹،۱۱). Jose Ruben Morones و همکارانش در سال ۲۰۰۵ طی مطالعاتی که انجام دادند، اثر نانوذرات نقره در رنج ۱-۱۰ نانومتری بر روی باکتری گرم منفی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بررسی کردند. نتایج نشان داد که خواص ضد باکتریایی از نانوذرات به سایز بستگی دارد، تنها ذراتی که

تشکر و قدردانی

با تشکر از تمامی عزیزانی که در مرکز اصلاح نژاد دام کشور و مرکز تحقیقات علوم دامی کشور در انجام این طرح تحقیقی یاری رساندند، به خصوص آقای دکتر بحرینی، خانم نامور، خانم دکتر جواهری و آقای مهندس اشرفی.

منابع

- (۱) ضمیری محمد جواد، فیزیولوژی تولیدمثل، چاپ اول، انتشارات حق شناس، ۱۳۸۵، صفحه ۴۶.
(۲) کسری کرمانشاهی روحا، حسین خانی بهارک، نانو بیوتکنولوژی (از دیدگاه میکروبیولوژی)، چاپ اول، انتشارات دانشگاه اصفهان، ۱۳۸۶.
- (3) Abou-Haila A, Tulsiani D R P. Mammalian Sperm Acrosome Formation Content and Function. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000 ; 379:173-182.
- (4) Ahamed M, Siddiqui M K J. Low level lead Exposure and Oxidative Stress. Current Opinion Clin Chim Acta, 2007; 383: 57-64
- (5) Griggers S D L, Paccamonti R A, Thompson B E. The Effects of pH Osmolarity and Urine Contamination Equine Spermatozoa Motility. Theriogenology, 2001; 56:613-622.
- (6) Jung W K. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Appl Environ. Microbiol, 2008; 74: 2171-2178.
- (7) Karla C, Yogeshkumar M, Alexander M. S. Nano silver as a new generation of nanoparticle in biomedical. Trends in Biotechnology, 2010 ; 28 : 580-588.
- (8) Mritunjai S, Shinjini S. Nanotechnology in Medicine and Antibacterial Effect of Silver Nanoparticle. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2008 ; 3: 115 – 122.
- (9) Shrivastava S. Characterization of Enhanced Antibacterial Effects of Novel Silver Nanoparticles. Nanotechnology, 2007; 18: 225103-225112
- (10) Varner D, Johnson L. From a Sperm's Eye View- Revisiting Our Perception of This Intriguing Cell. 53th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioner, 2007; 104-177.
- (11) Yamanaka M. Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on *Escherichia coli*. Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis Appl Environ Microbiol, 2005; 71:7589-7593.
- (12) Yang W J. Food Storage Material Silver Nanoparticles Interfere With DNA Replication Fidelity and Bind With DNA. Nanotechnology, 2009; 20: 085-102.