

## تأثیر خواص ضد باکتریایی نانوذره اکسید روی بر بار باکتریایی کل و بار باکتریایی گرم

منفی در محیط‌های آکواریوم آب شیرین دارای ماهی قرمز

*(Carassius auratus Linnaeus, 1758)*سمیرا فرامرزپور<sup>۱</sup>، سیده صدیقه حسینی<sup>۲\*</sup>، محمد سوداگر<sup>۱</sup> و محمد مازندرانی<sup>۱</sup><sup>۱</sup> گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، گروه تکثیر و پرورش آبزیان<sup>۲</sup> گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی/دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۹

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱

## چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات کنترل‌کننده جمعیت باکتری‌ها در آب محیط پرورش ماهیان بسیار مورد توجه قرار گرفته است، در این راستا انتخاب ماده ضد عفونی‌کننده با خاصیت ضد باکتریایی مناسب از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. در این مطالعه نانوذره اکسیدروی به روش سل-ژل سنتز شده و پس از تعیین حداقل غلظت باکتری کشی (Minimum bactericidal concentration) نانوذره اکسیدروی به روش استاندارد رقت‌های سریالی ماکروداپلوشن، جمعیت باکتریایی محیط آکواریوم در دو مرحله شامل آکواریوم‌های دارای ماهی قرمز و آکواریوم‌های فاقد ماهی مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله اول غلظت‌های صفر، ۲ و ۴ برابر MBC و در مرحله دوم غلظت‌های صفر، ۲، ۴ و ۸ برابر MBC در زمان‌های موردنظر به آب آکواریوم‌ها افزوده و روند ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی مورد بررسی قرار گرفت. MBC نانوذره اکسیدروی برای جمعیت باکتریایی محیط آکواریوم ۰/۳۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. بیشترین روند کاهش بار باکتریایی کل در مواجهه با نانوذره اکسیدروی در غلظت ۴ برابر MBC و بعد از ۵ روز مشاهده شد. نتایج بار باکتریایی کل آب محیط آکواریوم در محیط فاقد ماهی نشان‌دهنده روند کاهش در غلظت ۲ برابر MBC بود در حالی که در غلظت ۴ و ۸ برابر MBC فعالیت ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی نسبت به شاهد کاهش و بار باکتریایی کل محیط آکواریوم از روز ۱۰ افزایش یافت، بنابراین با توجه به اثرات ضد باکتریایی قابل قبول نانوذره اکسیدروی بر جمعیت باکتریایی محیط آکواریوم، این ماده می‌تواند به‌عنوان یک ماده ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ZnO، ضد باکتریایی، MBC.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۷۳۲۵۴۰۸۵۸، پست الکترونیکی: Hosseini.s@goums.ac.ir

## مقدمه

اکسیدهای فلزی غیرآلی به‌طور فزاینده‌ای برای فعالیت‌های ضد میکروبی استفاده می‌شوند. مزایای اصلی استفاده از اکسیدهای فلزی ثبات، استحکام، عمر مفید طولانی و فعالیت ضد میکروبی در برابر پاتوژن‌های مختلف می‌باشد (۳ و ۴). فعالیت ضد باکتری پودر MgO، CaO و اکسیدروی در مقابل برخی از گونه باکتری‌های بررسی شد،

در سال‌های اخیر، دانش فناوری نانو به‌عنوان پتانسیل عظیم برای ایجاد انقلابی بزرگ در صنعت آبی‌پروری و شیلات مطرح شده که می‌تواند روش‌های جدیدی در آبی‌پروری، بیوتکنولوژی، ژنتیک، تکثیر و بهداشت آبزیان باشد. این مواد در اشکال نانو دارای خواص منحصر به فرد فیزیکی، شیمیایی و الکتریکی می‌باشند (۱۰ و ۲۰).

بالایی در این موجودات می‌شود که در این صورت شرایط برای فعالیت بیشتر باکتری‌های فرصت‌طلب و بیماری‌زا فراهم می‌گردد. بنابراین کنترل شرایط تحت پرورش بخصوص جمعیت باکتریایی این محیط می‌تواند در کنترل سلامت ماهیان مفید باشد به همین دلیل در این بررسی اثرات ضد باکتریایی نانوذره اکسید روی بر کنترل جمعیت باکتریایی محیط آکواریوم مورد بررسی قرار گرفته است.

### مواد و روشها

**شرایط پرورش ماهی:** این مطالعه در زمستان ۹۳ در مرکز آبی‌پروری شهید ناصر فضلی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت، به این منظور تعداد ۴۸ قطعه ماهی قرمز با میانگین وزنی  $5/70 \pm 0/98$  گرم و میانگین طول  $6/93 \pm 6/63$  تهیه و به مدت ۲ هفته با شرایط جدید سازگار و با غذای تجاری بیومار به میزان ۳ درصد بیومس ۲ بار در روز غذادهی شدند. در طی دوره پرورش دمای آب، pH و سختی آب به ترتیب  $16/98 \pm 0/71$ ،  $7/87$  و  $260$  ppm اندازه‌گیری و ثبت شدند.

**طرح آزمایش:** این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی (CRD) در ۷ تیمار با ۳ تکرار که شامل ۳ تیمار در محیط آکواریوم فاقد ماهی و ۴ تیمار در محیط آکواریوم دارای ماهی قرمز انجام گرفت، ماهیان به صورت تصادفی به ۶ آکواریوم با حجم آبیگری  $33/04$  انتقال یافتند، سپس به منظور انجام آزمایش تیمار بندی انجام شد.

**آماده‌سازی نانوذره اکسیدروی:** پودر پیش‌ساز استات روی (شرکت مرک آلمان) با فرمول  $Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$  و جرم مولکولی  $219/5 \mu g/mL$  تهیه و برای سنتز نانوذره اکسیدروی استفاده گردید. ۵ گرم استات روی با ۵۰ میلی-لیتر آب مقطر دیونیزه در ارلن ریخته و در حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳-۴ ساعت به نحوی مخلوط گردید تا به یک‌پنجم حجم اولیه رسید، محلول به دست‌آمده محلول کلونیدی بود، پس‌از آن به مدت ۱۲

اکسید روی دارای فعالیت ضد میکروبی قابل توجه در محدوده pH طبیعی (pH= ۷) می‌باشد و یکی از عناصر ضروری محسوب می‌شود (۱۷).

تحقیقات اندکی درخصوص مکانیسم عمل نانوذره اکسیدروی در محیط آکواریوم و برای آبیان انجام شده، اما تصور می‌شود تولید هیدروژن پراکسید یک عامل اصلی فعالیت ضد باکتری می‌باشد، همچنین اتصال ذرات بر روی سطح باکتری با توجه به نیروهای الکترواستاتیک می‌تواند یک مکانیزم ضد باکتریایی باشد (۲۵ و ۲۷). نانوذرات اکسید روی فعالیت ضد باکتری قوی در طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها دارند، مکانیسم غالب برای فعالیت‌های ضد باکتری این نانوذره فعل و انفعالات شیمیایی بین  $H_2O_2$  و باکتری‌ها می‌باشد، چراکه به محض تماس باکتری با ذرات اکسیدروی، نفوذ به پوشش سلول و به هم‌ریختگی غشاء باکتری جهت مهار رشد باکتری می‌شود با اتصال یون  $Zn^{+2}$  به غشاء میکروارگانیسم‌ها فاز تأخیر رشد میکروبی طولانی می‌شود (۲۷).

نانوذرات از جمله مواد مفید جهت از بین بردن آلاینده‌های موجود در آب می‌باشد، با توجه به اینکه استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های ماهیان سبب مقاوم شدن برخی باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های گرم منفی می‌شود، امروزه از نانوذرات جهت حذف برخی باکتری‌ها از طریق روش بهینه جهت پاک‌سازی آب استخر پرورش ماهی استفاده می‌شود. ماهی قرمز قدیمی‌ترین ماهی زینتی پرورش‌یافته در چین بوده است و امروزه از رایج‌ترین ماهیانی است که در آکواریوم‌ها یافت می‌شود، این ماهی به‌عنوان مدل آزمایشگاهی و مناسب مطرح می‌شود. بیماری‌های باکتریایی شایع‌ترین مشکل عفونی ماهیان زینتی است و اکثر عفونت‌های باکتریایی توسط ارگانیسم‌های گرم منفی ایجاد می‌شوند (۱۴).

قرار گرفتن ماهی در محیط آکواریوم متفاوت از شرایط طبیعی می‌باشد، لذا در شرایط مختلف منجر به استرس

گردد در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از انکوباسیون جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتریایی مقدار ۱۰۰ میکرولیتر، از لوله‌های فاقد کدورت در محیط نوترینت آگار کشت داده و پس از گذشت زمان لازم، شمارش کلنی انجام گرفته و MBC تعیین شد (National Committee for Clinical Necls, Laboratory Standards, 2000). جهت جلوگیری از وقوع احتمال خطا در کلیه مراحل کار، این آزمایش با سه تکرار انجام گرفت (۱۵).

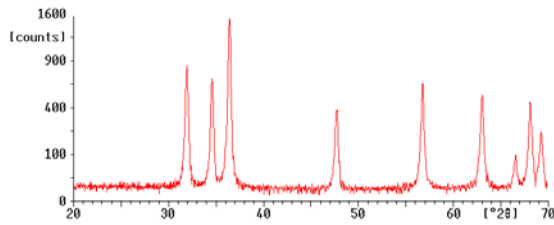
آزمایشات ضد باکتریایی در آب محیط آکواریوم: با در نظر گرفتن غلظت‌های مختلف MBC نانوذره اکسیدروی، خواص ضد باکتریایی این ماده با گذشت زمان در دو مرحله شامل آکواریوم‌های دارای ماهی قرمز و آکواریوم‌های فاقد ماهی مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تعیین MBC نانوذره اکسیدروی، در مرحله اول سه تیمار شامل تیمار شاهد و دو تیمار با دو غلظت دو و چهار برابر MBC و به آب آکواریوم‌های حاوی ماهی قرمز اضافه شد و در ۶ ساعت، روزهای ۱، ۵، ۱۰، ۱۶، ۲۱ و ۲۸ اثر حداقل غلظت باکتری-کشی نانوذره اکسید روی در مقایسه با گروه شاهد بررسی گردید، همچنین در مرحله دوم چهار تیمار شامل تیمار شاهد و سه تیمار با سه غلظت دو، چهار و هشت برابر MBC نانوذره اکسیدروی به آب آکواریوم‌ها فاقد ماهی اضافه شد و در طی روزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۵، ۲۵ و ۳۰ اثر حداقل غلظت باکتری‌کشی نانوذره اکسیدروی بررسی گردید، به طوری که در شرایط استریل بوسیله پیت استریل از نزدیک بستر تیمارها نمونه برداری شد. جهت تعیین بار باکتریایی آب رقت‌های سریالی تهیه و از هر رقت ۰/۱ سی‌سی در محیط کشت جامد حاوی آگار به روش پورپلیت کشت گردید. در این مطالعه محیط کشت نوترینت آگار برای مطالعه بار باکتریایی کل و نیز محیط کشت مک-کانکی آگار برای مطالعه جمعیت باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده قرار گرفت، پس از گذشت ۴۸ ساعت از انکوباسیون پلیت‌ها در انکوباتور، پلیت‌هایی که بین ۳۰ تا

ساعت در فور با دمای  $5 \pm 10$  درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. تا به تدریج خشک شود. پس از آن در کوره الکتریکی در دمای  $5 \pm 300$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲-۲۴ ساعت قرار داده شد تا کریستال‌ها کامل و پودر سفیدرنگ حاصل شود (۸). ماده مؤثر نانوذره سنتز شده  $123 \text{ ppm}$  محاسبه شد. برای تأیید پراکنش مناسب و مشخص کردن فازهای کریستالی نمونه و اندازه‌گیری خصوصیات ساختاری نانوذره اکسیدروی از آزمون (X ray diffraction) XRD استفاده شد (۱۶).

تهیه سوسپانسیون باکتریایی آب آکواریوم: پس از گذشت ۲ هفته سازگاری ماهیان، نمونه باکتریایی از آب کف آکواریوم معادل با کدورت نیم مک فارلند ( $10^6 \times 1/5$  باکتری در هر میلی‌لیتر) تهیه شد. برای اطمینان از ایجاد کدورت مذکور، جذب آن به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی-فرابنفش (USA; UNICO-2100) در محدوده طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان جذب در محدوده ۰/۸ تا ۰/۱ تنظیم شد (۷).

تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) نانوذره اکسید روی بر باکتری‌های آب آکواریوم به روش ماکرودایلوشن: جهت بررسی کمیت باکتری‌کشی نانوذره اکسید روی از روش استاندارد رقت‌های سریالی ماکرودایلوشن استفاده و حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد (MIC)، حداقل غلظت کشندگی اکسیدروی (MBC) تعیین گردید. برای تعیین MIC از یک سری ۱۲ تایی از لوله‌های آزمایش استفاده شد. یک لوله به عنوان کنترل مثبت (حاوی نانوذره اکسیدروی به علاوه محیط کشت) و یک لوله به عنوان کنترل منفی (حاوی سوسپانسیون میکروبی به علاوه محیط کشت) که جهت تأیید عدم ایجاد کدورت در نظر گرفته شد. در ۱۲ لوله ابتدا رقت‌هایی از نانوذره اکسیدروی با مقدار ۱/۶ اضافه و سوسپانسیون باکتریایی با مقدار استاندارد و مساوی به میزان ۰/۱ سی‌سی تلقیح گردید، سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی

ایکس در شکل ۱ نشان داده شده است، شدت پیک‌ها و عرض نسبتاً کم آن‌ها نشان‌دهنده درجه بالای بلوری محصولات می‌باشد، به طوری که پیک‌ها نشان‌دهنده ساختار هگزاگونال (شش‌وجهی) اکسیدروی و حالت کریستالی آن در شکل ۱ می‌باشد.



شکل ۱- تصویر XRD از نانوذره اکسیدروی

نتایج تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) نانوذره اکسیدروی بر باکتری‌های محیط آکواریوم، در جدول ۱ آورده شده است. همان‌گونه که نشان داده شده است در روش رقت‌های سریالی ماکرودایلوشن باکتری‌ها تا رقت ۴ لوله‌گذاری رشد یافت و غلظت ۰/۳۵ میکروگرم در میلی‌لیتر علیه باکتری‌های مورد مطالعه دارای حداقل غلظت باکتری‌کشی در جدول ۱ محاسبه شد.

جدول ۱- نتایج مربوط به MBC و غلظت‌های مورد استفاده برای مطالعه ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی

نمونه مورد بررسی	MBC (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۲ برابر MBC (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۴ برابر MBC (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۸ برابر MBC (میکروگرم در میلی‌لیتر)
باکتری‌های محیط آکواریوم	۰/۳۵	۰/۷	۱/۴	۲/۸

برابر MBC باگذشت زمان تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0/05$ )، همچنین بیشترین روند کاهش بار باکتریایی کل در مواجهه با نانوذره اکسیدروی در غلظت ۴ برابر MBC و بعد از ۶ ساعت مشاهده شد. باین‌حال در این غلظت از روز ۵ روند افزایش بار باکتریایی مشاهده شد درحالی‌که در غلظت ۲ برابر MBC روند کاهشی تا انتهای دوره ادامه پیدا کرد درحالی‌که در تیمار شاهد (فاقد نانوذره اکسیدروی) روند افزایش بار باکتریایی مشاهده شد (جدول ۲).

۳۰۰ کلنی داشتند انتخاب و تعداد کلنی آن‌ها شمارش شد. سپس برای هر نمونه، به‌منظور گزارش تراکم باکتریایی (CFU)، تعداد کلنی‌های شمارش‌شده در پلیت، در ضریب و نسبت معکوس رقت مربوطه ضرب شده و نتیجه نهایی که بار باکتریایی موجود در یک میلی‌لیتر نمونه آب آکواریوم بود، حاصل گردید (Institute of Standard and Industrial Research of Iran, 2007).

تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها در محیط نرم‌افزار SPSS, 18 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 انجام گرفت. با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) مقایسه سطوح کلیه فاکتورها در بین تیمارهای مختلف و زمان‌های نمونه‌گیری انجام شد و تفاوت معنی‌داری در بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan) به دست آمد.

## نتایج

جهت بررسی ساختار کریستالی نانوذره اکسیدروی از روش XRD استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیز پراش اشعه

فعالیت ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی بر بار باکتریایی آب محیط آکواریوم در طی زمان و غلظت‌های مختلف نانوذره بررسی شد، جدول تغییرات بار باکتریایی (داده‌ها لگاریتمی و به‌صورت X+I نرمال شدند) نسبت به زمان ترسیم شد. نتایج حاصل از آزمون دانکن سطوح مختلف حداقل غلظت باکتری‌کشی نانوذره اکسیدروی از نظر تعداد کلنی‌های رشد یافته در یک واحد میلی‌لیتر آب آکواریوم نشان داد.

با توجه به نتایج بار باکتریایی کل آب محیط آکواریوم در محیط حاوی ماهی بین تیمارهای شاهد، ۲ برابر MBC و ۴

جدول ۲- مقادیر (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) تأثیر فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های (۲ و ۴ برابر MBC) نانوذره اکسید روی در مدت ۶ ساعت، ۱، ۲۸، ۲۱، ۱۶، ۱۰، ۵ روز بر بار باکتریایی کل محیط آکواریوم دارای ماهی قرمز

غلظت نانوذره اکسید روی (میکروگرم در میلی-لیتر)							غلظت نانوذره اکسید روی (میکروگرم در میلی-لیتر)
روز ۲۸	روز ۲۱	روز ۱۶	روز ۱۰	روز ۵	روز ۱	۶ ساعت	
۵/۹۸ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>Aa</sup>	۵/۸۲ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>Aa</sup>	۵/۴۸ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>Aab</sup>	۵/۰۳ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>Aa</sup>	۴/۹۸ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>Aa</sup>	۴/۸۸ $\pm$ ۰/۲۲ <sup>Aab</sup>	۴/۴۲ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>Aa</sup>	۰
۳/۹۷ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>Ba</sup>	۳/۱۱ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>Bbc</sup>	۳/۰۹ $\pm$ ۰/۲۲ <sup>Bbc</sup>	۲/۷۶ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>ABbc</sup>	۲/۲۰ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>Cc</sup>	۱/۸۵ $\pm$ ۰/۲۲ <sup>Bbc</sup>	۱/۶۷ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>Bab</sup>	MBC برابر ۲
۴/۵۸ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>Cabc</sup>	۴/۱۶ $\pm$ ۰/۲۲ <sup>Bc</sup>	۳/۸۸ $\pm$ ۰/۰۸ <sup>Babc</sup>	۳/۶۶ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>Bbc</sup>	۲/۴۵ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>Babc</sup>	۱/۹۶ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>ABa</sup>	۱/۰۸ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>ABab</sup>	MBC برابر ۴

حروف کوچک a,b,c نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی (میکروگرم در میلی‌لیتر) با شاهد می‌باشد.

حروف بزرگ A,B,C نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین زمان‌های مختلف با شاهد می‌باشد.

حروف کوچک و بزرگ با همدیگر نشان‌دهنده اختلاف معنادار غلظت نانوذره (میکروگرم در میلی‌لیتر) در زمان‌های مختلف می‌باشد ( $P < 0,05$ ).

با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ( $P < 0,05$ )، و با افزایش غلظت نانوذره و گذشت زمان تأثیر فعالیت ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی تا روز ۱۰ نسبت به کنترل کاهش یافته و از روز ۱۶ فعالیت ضد باکتریایی اکسیدروی کاهش یافته و افزایش رشد باکتریها مشاهده گردید (جدول ۳).

نتایج حاصل از خاصیت ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی در برابر باکتری‌های گرم منفی محیط آکواریوم دارای ماهی قرمز. باتوجه به اینکه جمعیت غالب باکتری‌های محیط آکواریوم، باکتری‌های گرم منفی می‌باشند روند کاهش بار باکتریایی گرم منفی محیط آکواریوم در مواجهه با نانوذره اکسیدروی در هر دو غلظت ۲ و ۴ برابر MBC در مقایسه

جدول ۳- مقادیر (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) تأثیر فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های (۲ و ۴ برابر MBC) نانوذره اکسید روی در مدت ۶ ساعت، ۱،

۵، ۱۰، ۱۶، ۲۱، ۲۸ روز بر بار باکتریایی گرم منفی محیط آکواریوم دارای ماهی قرمز

غلظت نانوذره اکسید روی (میکروگرم در میلی‌لیتر)							غلظت نانوذره اکسید روی (میکروگرم در میلی‌لیتر)
روز ۲۸	روز ۲۱	روز ۱۶	روز ۱۰	روز ۵	روز ۱	۶ ساعت	
۵/۷۸ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>Ac</sup>	۵/۱۴ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>Ad</sup>	۵/۲۲ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>Abc</sup>	۵/۰۸ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>Ab</sup>	۴/۸۹ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>Ac</sup>	۴/۳۵ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>Ab</sup>	۴/۱۲ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>Aa</sup>	۰
۲/۵۸ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>Bab</sup>	۲/۴۲ $\pm$ ۰/۱۵ <sup>Ba</sup>	۲/۳۶ $\pm$ ۰/۱۵ <sup>Babc</sup>	۱/۶۹ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Bc</sup>	۲/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Cc</sup>	۲/۸۰ $\pm$ ۰/۲۷ <sup>Bbc</sup>	۳/۴۵ $\pm$ ۰/۲۱ <sup>Bab</sup>	MBC برابر ۲
۲/۳۲ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>Bab</sup>	۲/۱۴ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>Bb</sup>	۲/۱۳ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>Bb</sup>	۱/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Bb</sup>	۱/۸۸ $\pm$ ۰/۲۶ <sup>Ba</sup>	۲/۳۵ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>Bab</sup>	۲/۶۰ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>Bab</sup>	MBC برابر ۴

حروف کوچک a,b,c نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی (میکروگرم در میلی‌لیتر) با شاهد می‌باشد.

حروف بزرگ A,B,C نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف با شاهد می‌باشد.

حروف کوچک و بزرگ با همدیگر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار غلظت نانوذره (میکروگرم در میلی‌لیتر) در زمان‌های مختلف می‌باشد ( $P < 0,05$ ).

زمان تا روز ۷ مشاهده شد، این روند در غلظت ۲ برابر MBC تا انتهای دوره ادامه یافت درحالی‌که در غلظت ۴ و ۸ برابر MBC فعالیت ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی نسبت به شاهد کاهش و بار باکتریایی کل محیط آکواریوم افزایش یافته است به طوری‌که در غلظت ۸ برابر MBC این روند افزایش باشدت بیشتری مشاهده شد. در غلظت ۸ برابر MBC اختلاف معنی‌داری نسبت به ۲ و ۴ برابر کاهش بار باکتریایی مشاهده شد ( $P < 0,05$ )، (جدول ۴).

نتایج حاصل از خاصیت ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی در برابر باکتری‌های محیط آکواریوم فاقد ماهی نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۲، ۴ و ۸ برابر حداقل غلظت باکتری‌کشی نانوذره اکسیدروی از نظر تعداد کلنی‌های رشد یافته در یک واحد میلی‌لیتر آب آکواریوم، در یک‌زمان مشخص در مقایسه با گروه شاهد بود ( $P < 0,05$ ). باتوجه به جدول ۴ روند کاهش بار باکتریایی کل در غلظت‌های ۲، ۴ و ۸ برابر MBC باگذشت

جدول ۴- مقادیر (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) تأثیر فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های (۲ و ۴ برابر MBC) نانوذره اکسیدروی در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۳۰ تأثیر فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی با گذشت زمان بر بار باکتریایی کل محیط آکواریوم فاقد ماهی

غلظت نانوذره اکسید روی (میکروگرم در میلی‌لیتر)								غلظت نانوذره اکسید روی (میکروگرم در میلی‌لیتر)
روز ۳۰	روز ۲۵	روز ۱۵	روز ۱۰	روز ۷	روز ۵	روز ۳	روز ۱	
۵/۵۴ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>Ac</sup>	۵/۳۳ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>Ade</sup>	۵/۲۴ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>Acde</sup>	۵/۱۲ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>Ab</sup>	۴/۱۲ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>AcD</sup>	۴/۸۸ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>Ade</sup>	۴/۵۷ $\pm$ ۰/۱۴ <sup>Aa</sup>	۴/۳۱ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>Abc</sup>	۰
۳/۳۷ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>Cb</sup>	۳/۲۶ $\pm$ ۰/۰۱۷ <sup>Cbc</sup>	۳/۱۷ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>Cb</sup>	۳/۰۴ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>Bbc</sup>	۲/۶۰ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>Bc</sup>	۳/۱۲ $\pm$ ۰/۰۱۸ <sup>BCbc</sup>	۳/۹۱ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>Ba</sup>	۳/۸۸ $\pm$ ۰/۰۱۰ <sup>Ba</sup>	۲ برابر MBC
۳/۶۷ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>Cab</sup>	۳/۸۳ $\pm$ ۰/۰۸ <sup>Cab</sup>	۳/۶۵ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>Bab</sup>	۳/۴۳ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>Ba</sup>	۲/۶۶ $\pm$ ۰/۰۲۵ <sup>Bc</sup>	۳/۸۲ $\pm$ ۰/۰۳۳ <sup>Bb</sup>	۳/۷۶ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>Cab</sup>	۳/۵۰ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>Cab</sup>	۴ برابر MBC
۴/۱۸ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>Ba</sup>	۳/۹۳ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>Ba</sup>	۳/۶۴ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>BCb</sup>	۳/۰۳ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>Bc</sup>	۲/۴۷ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>Be</sup>	۲/۶۵ $\pm$ ۰/۰۸ <sup>Cde</sup>	۲/۶۹ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>Dde</sup>	۲/۷۵ $\pm$ ۰/۰۲۱ <sup>Dd</sup>	۸ برابر MBC

حروف کوچک a,b,c نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی (میکروگرم در میلی‌لیتر) با شاهد می‌باشد.

حروف بزرگ A,B,C نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف با شاهد می‌باشد.

حروف کوچک و بزرگ با همدیگر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار غلظت نانوذره (میکروگرم در میلی‌لیتر) در زمان‌های مختلف می‌باشد ( $P < 0,05$ ).

نتایج حاصل از خاصیت ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی در برابر باکتری‌های گرم منفی محیط آکواریوم فاقد ماهی در جدول ۵ نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطوح ۲، ۴ و ۸ برابر حداقل غلظت باکتری‌کشی نانوذره اکسیدروی از نظر تعداد کلنی رشد یافته در یک واحد میلی‌لیتر آب آکواریوم، در یک‌زمان مشخص با گروه شاهد بود ( $P < 0,05$ ). نانوذره اکسیدروی در برابر باکتری‌های گرم

منفی فعالیت ضد باکتریایی بسیار بالایی را نشان داد، به‌طوری‌که با افزایش غلظت این نانوذره از ۲ برابر MBC به ۴ و ۸ برابر MBC روند کاهش بار باکتریایی در روز ۱۰ مشاهده شد، همچنین با گذشت زمان این خاصیت افزایش یافت، به‌طوری‌که در انتهای دوره، محیط آکواریوم فاقد بار باکتریایی گرم منفی شد (جدول ۵).

جدول ۵- مقادیر (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) تأثیر فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های (۲ و ۴ برابر MBC) نانوذره اکسید روی در مدت تأثیر فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی با گذشت زمان بر بار باکتریایی گرم منفی محیط آکواریوم فاقد ماهی

غلظت نانوذره اکسید روی (میکروگرم در میلی‌لیتر)								غلظت نانوذره اکسید روی (میکروگرم در میلی‌لیتر)
روز ۳۰	روز ۲۵	روز ۱۵	روز ۱۰	روز ۷	روز ۵	روز ۳	روز ۱	
۵/۷۱ $\pm$ ۰/۰۸ <sup>Ad</sup>	۵/۲ $\pm$ ۰/۱۸ <sup>Ad</sup>	۵/۵۸ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>Acd</sup>	۵/۱۲ $\pm$ ۰/۰۲ <sup>AcD</sup>	۵/۲۴ $\pm$ ۰/۰۸ <sup>Ad</sup>	۵/۱۷ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>Abc</sup>	۴/۶۷ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Aab</sup>	۴/۰۶ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>Aa</sup>	۰
۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Bd</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Bd</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Bd</sup>	۱/۳۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Bc</sup>	۱/۷۵ $\pm$ ۰/۰۲۱ <sup>Bab</sup>	۲/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>BCc</sup>	۲/۳۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Bb</sup>	۲/۶۷ $\pm$ ۰/۰۱۸ <sup>Ba</sup>	۲ برابر MBC
۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Bc</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Bc</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Bc</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Cc</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Cc</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Cc</sup>	۲/۰۲ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>Bb</sup>	۲/۴۵ $\pm$ ۰/۰۱۸ <sup>Ba</sup>	۴ برابر MBC
۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>B</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>B</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>B</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>C</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>C</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>C</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>C</sup>	۰/۰۰ $\pm$ ۰/۰۰ <sup>C</sup>	۸ برابر MBC

حروف کوچک a,b,c نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی (میکروگرم در میلی‌لیتر) با شاهد می‌باشد.

حروف بزرگ A,B,C نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های مختلف با شاهد می‌باشد.

حروف کوچک و بزرگ با همدیگر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار غلظت نانوذره (میکروگرم در میلی‌لیتر) در زمان‌های مختلف می‌باشد ( $P < 0,05$ ).

## بحث

باتوجه به استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌ها و حضور این مواد در محیط‌زیست باعث ایجاد مقاومت در باکتری‌های بیماری‌زا، مشکلات زیست‌محیطی و آسیب به طبیعت می‌شود، از این رو مواد جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در بهداشت آبزیان ضروری می‌باشد (۲۱).

ترکیبات ضد باکتریایی دیگری نیز شناسایی شده که می‌توان به اثر عصاره‌ها، ترکیبات شیمیایی اشاره نمود. سیف زاده و خانی پور در سال ۱۳۹۴ بابررسی و مقایسه خواص ضد باکتریایی کاتچین، فرولیک اسید و عصاره دانه انگور بر باکتری‌های عامل مسمومیت غذایی در میگوی پاشفید غربی پرورشی دریافتند که شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه‌های تیمار شده با کاتچین بیشترین مقدار و در نمونه‌های عمل‌آوری شده با عصاره دانه انگور کمترین مقدار بود (۱).

باتوجه به پیشرفت فناوری نانو و کاربردهای مختلف آن در علوم جدید، جباری و همکاران در سال ۱۳۹۳ به بررسی تأثیر نانوذره کیتوسان در درمان سوختگی بر روی مدل موشی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۸ پرداخته و مشاهده نمودند که تعداد و کاهش قطر ضایعه نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (۲). نانوذرات نقش‌های دیگری نیز دارند که از آن جمله می‌توان به مطالعات فرانسیسکو و همکاران در سال ۲۰۰۸ حداقل غلظت باکتری‌کشی برای نانوذره اکسیدروی به صورت محلول ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد در این مطالعه اندازه نانوذره مورد استفاده ۵۰۰ نانومتر بود، باتوجه به استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌ها و حضور این مواد در محیط‌زیست باعث ایجاد مقاومت در باکتری‌های بیماری‌زا، مشکلات زیست-محیطی و آسیب به طبیعت می‌شود، از این رو مواد جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در بهداشت آبزیان ضروری می‌باشد (۶).

همچنین با توجه به مطالعات جونز، ری، رانجیت، مانا و همکاران در سال ۲۰۱۱ افزایش اندازه نانوذرات اکسیدروی

باعث کاهش فعالیت باکتری‌کشی این مواد می‌شود. در تحقیق انجام‌شده حداقل غلظت باکتری‌کشی نانوذره اکسیدروی برای باکتری‌های محیط آکواریوم ۰/۳۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد که این تفاوت می‌تواند به علت اندازه نانوذرات مورد استفاده، شرایط کشت و باکتری‌های موجود در محیط آکواریوم باشد (۱۸ و ۱۱).

بر اساس مطالعات ابی، کارن، فرانجیتون، گلن و همکاران در سال ۲۰۰۸ حداقل غلظت باکتری‌کشی نانوذرات اکسید روی محلول، برای باکتری *اشرشیا کلی* ۰/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد درحالی‌که برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* به ترتیب ۲۲۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (۵).

در این مطالعه نیز از نانوذره اکسیدروی به علت خاصیت ضد میکروبی جهت کاهش بار باکتریایی آب محیط آکواریوم استفاده شد، به طوری‌که با افزایش غلظت نانوذرات اکسیدروی، بار باکتریایی در مقایسه با گروه شاهد به سرعت کاهش یافت که بیانگر افزایش فعالیت باکتری‌کشی نانوذرات در غلظت‌های بالاتر تا زمان ۵ روز می‌باشد که در کلیه جداول و غلظت‌ها این کاهش بار باکتریایی نسبت به شاهد معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ) (جدول های ۲ و ۵).

در مطالعه سوآوی و همکاران (۲۰۰۱) با بررسی خاصیت کشندگی محلول پودر آهک حرارت دیده بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* مشاهده کردند، رشد باکتری‌ها در فواصل زمانی نمونه‌برداری، دارای روند کاهشی ولی نوسان داشته، که علت این نوسان را رشد مجدد برخی باکتری‌ها در طول دوره آزمایش بیان کردند که در این مطالعه هم نوسانات رشد باکتری در روزهای مختلف مشاهده گردید (۱۳، ۲۳ و ۲۴).

در مطالعه حاضر خاصیت ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی در دو غلظت ۲ و ۴ برابر MBC این نانوذره در محیط آکواریوم دارای ماهی قرمز، بر علیه بار باکتریایی کل و بار

اکسید روی در غلظت  $6 \mu\text{g/mL}$  تا ۹۵٪ باکتری‌ها را حذف می‌کند (۱۴)، همچنین یاماموتو در سال ۲۰۰۱ با بررسی تأثیر سایز بر فعالیت ضد باکتریایی اکسیدروی نشان داد، اکسیدروی در محدوده ۱۰۰ نانومتر تا ۰/۸ میکرومتر فعالیت ضد باکتریایی مناسبی دارد و با افزایش غلظت آن بر باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* این فعالیت ضد باکتریایی افزایش می‌یابد (۲۶ و ۲۲). در مطالعه حاضر نیز به بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی با ابعاد ۸۰ نانومتر و غلظت‌های ۲ و ۴ برابر MBC پرداخته شد و مشاهده گردید که با افزایش غلظت نانوذره اکسید روی اثر ضد باکتریایی آن در محیط آکواریوم افزایش می‌یابد.

بر اساس نتایج، روند کاهش بار باکتریایی کل در غلظت-های ۲، ۴ و ۸ برابر MBC باگذشت زمان تا روز ۷ مشاهده شد، این روند در غلظت ۲ برابر MBC تا انتهای دوره ادامه یافت در حالی که در غلظت ۴ و ۸ برابر MBC فعالیت ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی نسبت به شاهد کاهش و بار باکتریایی کل محیط آکواریوم افزایش‌یافته است به طوری که در غلظت ۸ برابر MBC این روند افزایش باشدت بیشتری مشاهده شد البته این موضوع نمی‌تواند بیانگر رابطه خطی بین غلظت- خاصیت ضد میکروبی نانوذرات باشد زیرا در غلظت‌های بالاتر احتمال ایجاد مقاومت و سازگاری در برخی سویه‌ها وجود دارد. این‌که در تحقیقات حسین زاده و همکاران در سال ۲۰۱۲ باکتری *سودوموناس آئروژینوزوا* در غلظت ۲ برابر Minimum MIC (inhibitory concentration) مقاوم بود، این باکتری از جمله باکتری‌های گرم منفی بیماری‌زا در آبی‌پروری می‌باشد (۹). براساس نتایج تأثیر نانوذره اکسیدروی بر بار باکتریایی گرم منفی، این نانوذره فعالیت ضد باکتریایی بسیار بالایی را نسبت به جمعیت باکتریایی گرم منفی نشان می‌دهد، با توجه به اینکه باکتری‌های گرم مثبت دارای لایه پپتیدوگلیکان ضخیم می‌باشند، بنابراین در این مطالعه تأثیر باکتری‌کشی نانوذره اکسیدروی اثر بیشتری بر باکتری‌های

باکتریایی گرم منفی انجام شد بیان داشتند، میزان مرگ باکتری‌ها با افزایش زمان تماس و غلظت نانوذرات اکسیدروی در هر دو گروه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت افزایش می‌یابد که با نتایج مطالعه حاضر در خصوص خاصیت ضد باکتریایی نانوذره اکسیدروی در محیط آکواریوم دارای ماهی قرمز مطابقت دارد به طوری که با افزایش غلظت نانوذره و گذشت زمان در هر دو تیمار ۲ و ۴ برابر MBC نسبت به تیمار شاهد (فاقد نانوذره اکسیدروی) بار باکتریایی کل و بار باکتریایی گرم منفی تا روز ۵ کاهش‌یافته است در روزهای بعدی این روند کاهش بار باکتریایی نوسان داشته و فقط در غلظت ۲MBC نانوذره توانست اثر مهارکنندگی کم اما پایداری را باگذشت زمان بر بار باکتریایی کل ایجاد نماید (جدول‌های ۵ و ۲).

بر اساس مطالعات انجام‌شده بسیاری از باکتری‌های محیط آکواریوم باکتری‌های گرم منفی می‌باشند و اکثر عفونت‌های باکتریایی توسط ارگانسیم‌های گرم منفی ایجاد می‌شوند که شامل *آئرو موناس هیدروفیلا*، *آئروموناس سالمونیسیدا*، *فلاوباکتریوم کولامنار* (علت بیماری کلومناریس)، و *بیرئو* و گونه‌های *سودوموناس* می‌باشند (UF/IFAS Fact Sheets FA-14 *Aeromonas Infections*, FA-31 *Vibrio Infections of Fish and FA-11 Columnaris disease*). استرپتوکوکوس‌ها گروه بزرگی از باکتری‌های گرم مثبت ایجادکننده بیماری در ماهیان می‌باشند (UF/IFAS Circular 57 *Streptococcal Infections in Fish*) (۱۲، ۱۴) و (۱۹) براساس مطالعه حاضر، نانوذرات اکسیدروی بر باکتری‌های گرم منفی محیط آکواریوم دارای ماهی خاصیت ضد باکتریایی بالاتری را نسبت به جمعیت باکتری‌های کل نشان دادند.

تأثیر نانوذره اکسیدروی بر گونه‌های *بیرئو* به‌عنوان عامل بیماری‌زا در محیط آکواریوم توسط *سارواس* و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطالعه شد، این نانو ذرات توانایی حذف آلودگی باکتریایی شامل گونه‌های *بیرئو* از آب‌های بخش ساحلی خلیج فارس را دارا می‌باشند، به طوری که نانوذره



کل در غلظت ۲ برابر MBC مطابقت داشت. در خصوص اثر زمان در این مطالعه چون از کلوئید اکسیدروی استفاده شده که در این کار سنتز شده استفاده گردید و ویژگی کلوئید داشتن ۱۰۰ درصد ماده فعال دارویی است در غلظت بسیار پایین ۱/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب مهار گردیده ولی به دلیل خاصیت رسوبی ذرات کلوئیدی باگذشت زمان خاصیت ضد میکروبی کاهش یافته بود.

با توجه خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسیدروی، این ماده می‌تواند در غلظت ۱/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و هر ۵ روز یک‌بار به محیط آکواریوم، جهت ضد عفونی و مهار رشد بار باکتریایی آکواریوم استفاده گردد و می‌تواند در کنترل سلامت ماهیان بخصوص کنترل جمعیت باکتری‌های فرصت‌طلب و بیماری‌زای محیط آکواریوم باشد.

#### تشکر و قدردانی

از کمک‌های کارشناسان آزمایشگاه گروه تکثیر و پرورش آبزیان کمال تشکر می‌گردد، همچنین به جهت حمایت مالی از جانب معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری (ستاد ویژه توسعه فناوری نانو) سپاسگزاری می‌گردد.

گرم منفی نسبت باکتری‌های گرم مثبت نشان داد که به مکانیزم اثر اکسیدروی و تأثیرگذاری بیشتر بر غشاء سلولی اشاره دارد (۱۷). آزمایش‌های باکتری‌شناسی جهت تشخیص عوامل بیماری‌زای موجود در نتیجه آلودگی در آب می‌باشد. باکتری‌های ایجادکننده آلودگی آب شامل *استرپتوکوکوس فکالیس* و *کلستریدیوم پرفرژنز*، همچنین باسیل‌های گرم منفی شامل *اشریشیاکلی* و *انتروباکتریا ترورژنز* می‌باشند (۱۸، ۱۹ و ۲۰).

با توجه به مطالعات حسین زاده و همکاران ۲۰۱۲ میزان کاهش جمعیت باکتری *اشریشیاکلی* به‌عنوان یک باکتری گرم منفی، در طی زمان با سرعت بالاتری در غلظت ۲ برابر MIC صورت گرفت. همچنین زانگ در سال ۲۰۰۹ رفتار ضد باکتری نانوذره اکسیدروی در زمان‌های ذخیره‌سازی متفاوت (۱، ۹۰ و ۱۲۰ روز) بررسی کردند و روند کاهش در جمعیت باکتری *اشریشیاکلی* پس از ۱ روز ذخیره‌سازی در غلظت ۲ برابر MIC مشاهده شد (۲۱). در حالی که در روزهای ۹۰ و ۱۲۰ کاهش جمعیت باکتریایی با سرعت بیشتری انجام شد، همچنین در غلظت ۱۰ گرم در لیتر نانوکلوئید در زمان‌های ۹۰ و ۱۲۰ روز، ۱۰۰ درصد رشد باکتری‌ها مهار شدند که با نتایج مطالعه حاضر مبتنی بر کاهش جمعیت باکتریایی گرم منفی و جمعیت باکتریایی

#### منابع

- سیف زاده، م. و خانی پور، ع.، ۱۳۹۴. بررسی و مقایسه خواص ضدباکتریایی کانتچین، فرولیک اسید و عصاره دانه انگور بر باکتری‌های عامل مسمومیت غذایی در میگوی پافید غربی پرورشی (*Litopenaeus vannamei*). مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۸، شماره ۳، صفحات ۳۵۳-۳۶۰.
- جباری، ن.، پریور، ک.، و حیاتی رودباری، ن.، ۱۳۹۴. تأثیر نانوذره کیتوسان در درمان سوختگی بر روی مدل موشی. مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۸، شماره ۳، صفحات ۲۹۲-۲۸۲.
- Atmaca, S., Gul, K., and Clcek, R., 2011. The effect of zinc on microbial growth. *Turk J Med Sci* 1998; 28: 595-597. Rather MA, Sharma R and Aklakur M. Nanotechnology: A Novel Tool for Aquaculture and Fisheries Development. *J IJFA J*; 23, PP: 12-25.
- Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedett, M. F., and Fiévet, F., 2006. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*. 6, PP: 866-870.
- Eby, D., Karen, M., Farrington, E., and Glenn, R., 2008. Synthesis of Bioinorganic Antimicrobial Peptide Nanoparticles with Potential

- Therapeutic Properties. *Journal of Biomacromolecules*, 9(9), PP: 2487-2494.
- 6- Francisco, J., Ruiz, F., Corina, D., and Martinez, F., 2008. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide and gold. *Nanomedicine*, 4(3), PP: 237-240.
  - 7- Hahm, D. H., Yeom, M., Lee, E. H., Shim, I., Lee, H. J., and Kim, H. Y., 2001. Effect of *Scutellariae radix* as a novel antibacterial herb on the ppk (Polyphosphate kinase) mutant of *Salmonella typhimurium*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11, PP: 1061-1065.
  - 8- Hosseini, S. S., Joshaghani, H. R., and Eskandari, M., 2013. Assessment of nanoparticle zinc oxide antifungal activity against *Candida dubliniensis* biofilms by Colorimetric, *Journal Sci Medical*. 12 (1), PP: 70-80.
  - 9- Hosseinzadeh, A., Samarghandi, M., Alikhani, M., and Asgari, G. h., 2012. ZnO nanoparticles influence the kinetics of gram positive and negative bacteria death. *J Babil university of medical sic*. 14(5), PP: 13-19.
  - 10- Jiang, W. H., and Xing, B., 2009. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles, *Environmental Pollution*, 157, PP: 1619-1625.
  - 11- Jones, N., Ray, B., Ranjit, K. T., and Manna, A. C., 2008. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms, *FEMS Microbiology Letters*, 279, PP: 71-76.
  - 12- Jayaseelan, C., Rahuman, A. A., Kirthi, A. V., Marimuthu, S., Santhoshkumar, T., Bagavan, A. and Rao, K. B., 2012. Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 90, PP: 78-84.
  - 13- Maness, P. C., 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: to ward an understanding of its killing mechanism. *Applied Environmental Microbiology*. 65, PP: 40-94.
  - 14- Matyar, F., Din cerss kaya, A., and Colak, O., 2004. Prevalence and resistance to antibiotics in Gram negative bacteria isolated from retail fish in Turkey. *Annals of microbiology*. 54, PP: 151-160.
  - 15- Nccls (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard. PP: M7- A5.
  - 16- Nebauer, E., Merkel, U., and Würfl, J., 1997. Structure and stability studies on W, WSi, SiN/GaAs systems by XRD *Semicond Sci Technol*; 12(9), PP: 1072-8.
  - 17- Ohira, T., Yamamoto, O., Iida, Y., and Nakagawa, Z. E., 2008. Antibacterial activity of ZnO powder with crystallographic orientation. *J Mater Sci Mater\_Med*. 19(3), PP: 1407-1412.
  - 18- Raghupathi, K. R., Koodali, R. T., and Manna, A. C., 2011. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles, *Langmuir*. 27(7), PP: 4020-4028.
  - 19- Raissy, M., Momtaz, H., Moumeni, M., Ansari, M., and Rahimi, E., 2011. Molecular detection of *Vibrio spp*, in lobster hemolymph, *African Journal of Microbiology Research*. 5, PP: 1697-1700.
  - 20- Rather, M. A., Sharma, R., and Aklakur, M., 2011. Nanotechnology: A Novel Tool for Aquaculture and Fisheries Development, *A Prospective Mini-Review*, *Aquacult*. 23, PP: 12-25.
  - 21- Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., and Mukherji, S., 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*. 4(3), PP: 707-716.
  - 22- Sarwar, S., Chakraborti, S., Bera, S., Sheikh, I. A., Hoque, K. M., Chakrabarti, P., 2016. The antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against *Vibrio cholerae*: Variation in response depends on biotype. *Nanomedicine*, 12(6), PP: 1499-509.
  - 23- Sawai J, Shiga H, Kojima H., 2001, Kinetic analysis of the bactericidal action of Heated Scallop- shell powder. *Int J Food Microbiology*. 200; 30(71); 211-18.
  - 24- Soawei, J., Shiga, H., and Kojima, H., 2001. Kinetic analysis of death of bacteria in CaO powder slurry, *Int Biodeter Biodegr*. 47(1), PP: 23-6.
  - 25- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, GRamachandrarao, P. and Dash, D., 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles, *Nanotech*, 18, PP: 225103-225112.

- 26- Yamamoto, O., 2001. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *International Journal of Inorganic Materials*, 3, PP: 643-646.
- 27- Zhang, Q., Dandeneau, C. S., Zhou, X., and Cao, G., 2009. ZnO Nanostructures for Dye-Sensitized Solar Cells, *Advanced Materials*, 21, PP: 4087-4108.

## The effect of antibacterial properties of zinc oxide nanoparticles on total count of bacterial and Gram-negative bacterial in the fresh water aquariums with goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758)

Faramarzpour S.<sup>1</sup>, Hosseini S.S.<sup>2</sup>, Sudagar M.<sup>1</sup> and Mazandarani M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fishery Dept., Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Laboratory Sciences Research Center/Laboratory Science Dept., Faculty of Paramedicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, I.R. of Iran

### Abstract

In recent years the using of population controlling component for bacteria in the water of the fish is highly regarded. In this context, the selection of appropriate disinfectant with antibacterial property is very important. In this study zinc oxide nanoparticles were synthesized by sol-gel method and the minimum bactericidal concentration (MBC) of zinc oxide nanoparticles were evaluated to standard methods broth macrodilution serial dilutions, to determine the bacterial population in the aquarium environment includes two steps aquarium with goldfish and aquarium without fish. In the first step, concentrations of 0, 2 and 4 times of the MBC and in the second step, concentrations of 0, 2, 4 and 8 times of the MBC at special times added to aquarium water and antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles were studied. MBC were measured 0.35 mg/ mL for bacterial populations of aquarium environment. The most process of observed to reducing the total count of bacterial in concentrations of 4 times was observed after 5 days. The result of total count of bacterial aquarium environmental without fish, indicate declines in 2 times of MBC until end of period while the concentration of 4 and 8 times of MBC, decreased the antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles and total count of bacterial aquarium environment increased from 10 day. Therefore, due to the effects of zinc oxide nanoparticles acceptable antibacterial bacterial on the population of aquarium environment, it can be used as an antibacterial agent.

**Key words:** ZnO, antibacterial, MBC.