Archive of SID

ISSN: 2476-6887; Journal of Fisheries Science and Technology. 2020;9(1):21-29

Assessment of Nano Zinc Oxide and Nano Copper Oxides' Bactericidal Effect on Some Bacterial Pathogens in Fish and Determination of Their Toxicity Degree in Rainbow trout

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Shiry N.*[1] *PhD,*
Akhlaghi M.[1] *DVSc*

How to cite this article
Shiry N Akhlaghi M. Assessment of Nano Zinc Oxide and Nano Copper Oxides' Bactericidal Effect on Some Bacterial Pathogens in Fish and Determination of Their Toxicity Degree in Rainbow trout. Journal of Fisheries Science and Technology. 2020;9(1):21-29.

ABSTRACT

Aims The present study aims to assess the toxicity of CuO and ZnO nanoparticles (NPs) at laboratory conditions on some pathogenic bacteria for the reared fish, as well as, a bioassay on rainbow trout.

Materials & Methods For this purpose, the sensitivity of some bacteria to the mentioned NPs with a reference antibiotic (florfenicol) was assayed through the well diffusion method, as well as, minimum inhibitory concentration/minimum bactericidal concentration (MIC/MBC) were determined by microdilution technique. On the other hand, the lethal toxicity test has been accomplished to the calculation of median lethal concentration (LC50) on some rainbow trout (55.3±7.6g) in static condition for the 96 consecutive hours. One-way ANOVA and Probit regression were used in order to data analysis.

Findings The results showed that NPs of copper oxide and zinc oxide could significantly inhibit the growth of *Streptococcus* iniae or kill it at 0.18 and 0.24µg/ml and more, respectively. The comparison between LC50-96h quantities of CuO NP (107.4µg/l) and ZnO NP (102.3µg/l) indicated that the CuO NP has more toxic potential.

Conclusion According to the laboratory findings, the susceptibility of *S. iniae* and *L. garvieae* to ZnO NP was close to florfenicol. The mortality in the fish species due to lethal toxicity would occur if the effective concentration of NPs on the bacterial pathogenic agents being used directly.

Keywords Nano Copper Oxide; Nano Zinc Oxide; Minimum Inhibitory Concentration; Minimum Bactericidal Concentration; Median Lethal Concentration; Rainbow trout

[1]Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Correspondence
Address: Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, 12th kilometer of Shiraz-Isfahan Road, Shiraz, Fars Province. Postal Code: 713451978.
Phone: +98 (71) 36138618
Fax: +98 (71) 32286940
nima.shiry@gmail.com

Article History
Received: June 06, 2019
Accepted: June 10, 2020
ePublished: March 14, 2020

CITATION LINKS

[1] Effect of Scutellariae radix as a novel antibacteria ... [2] Antimicrobial effect of zinc oxide ... [3] Mechanistic investigation into antibacterial ... [4] Toxicity of nanosized and bulk ZnO, ... [5] Preparation and antibacterial activity ... [6] The inhibitory effect of silver ... [7] Nanoparticles as a source for the treatment ... [8] Silver nanoparticles as a new generation ... [9] Evaluation of synergistic effect of ... [10] Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles ... [11] Use of zinc oxide nano particles ... [12] Synthesis and characterization of zinc ... [13] Comparison and determination of probable ... [14] Bioassay for toxicity assessment of zinc ... [15] Synthesis of copper oxide (CuO) nanoparticles ... [16] Effects of nanoparticles in species of ... [17] Silver nanoparticles inhibit the gill Na+/K+-ATPase ... [18] Effects of ZnO nanoparticles in the Caspian ... [19] Assessment of toxicity of nano silver on four fish ... [20] Comparison of bulk CoMo bimetallic carbide ... [21] Some histopathological aspects of ... [22] Detection and identification of virulent ... [23] Isolation and characterization of Lactococcus ... [24] Phenotypic and genetic diversity of motile ... [25] Strain specificity in antimicrobial activity ... [26] Size dependent antimicrobial properties ... [27] In vitro antimicrobial activities against ... [28] Standard methods for the examination of ... [29] Toxicity evaluation of Malathion ... [30] Effects of aqueous exposure to silver ... [31] Guidelines for the testing of chemicals fish ... [32] A simple method of estimating fifty per ... [33] Toxicity degree of malathion and assessment ... [34] Nanocatalysts ... [35] Comparative single-dose pharmacokinetics ... [36] Antimicrobial effect of ZnO ... [37] Toxicity of ZnO, CuO and TiO2 nanoparticles on ... [38] An investigation of antibacterial activity of ... [39] Comparison of molecular and histological changes ... [40] Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory ...

Copyright© 2020, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی خاصیت ضدباکتریایی نانواکسیدروی و نانواکسیدمس بر برخی عوامل باکتریایی بیماری‌زا در ماهی و تعیین درجه سمیت آنها برای قزل‌آلای رنگین‌کمان

نیما شیری* PhD
بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
مصطفی اخلاقی DVSc
بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

چکیده

اهداف: مطالعه حاضر با هدف بررسی سمیت نانواکسیدمس (CuO) و نانواکسیدروی (ZnO) در شرایط آزمایشگاهی بر روی برخی باکتری‌های بیماری‌زا در ماهیان پرورشی و همچنین زیست‌سنجی در قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شده است.

مواد و روش‌ها: بدین منظور، حساسیت برخی از باکتری‌ها نسبت به نانوذرات اشاره‌شده به همراه یک آنتی‌بیوتیک مرجع (فلورفنیکل) از طریق روش نفوذ چاهی و مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی/حداقل غلظت باکتری‌کشی (MIC/MBC) آنها با تکنیک میکرودیلوشن تعیین شد. از سویی دیگر، آزمایش سمیت کشنده به‌دلیل محاسبه میانه غلظت کشنده (LC50) بر روی تعدادی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۷/۶±۵۵/۳گرم) به‌صورت ایستایی و در ۹۶ ساعت متوالی انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از تجزیه واریانس یک‌طرفه و رگرسیون پروبیت بهره گرفته شد.

یافته‌ها: یافته‌ها حاکی از این بودند که نانوذرات اکسیدمس و اکسیدروی به ترتیب در رقت‌های بیشتر از ۰/۱۸ و ۰/۲۴میکروگرم بر میلی‌لیتر توانستند که رشد *Streptococcus iniae* را به‌طور معنی‌داری مهار کنند یا آن را از بین ببرند. مقایسه مقادیر LC50 در ۹۶ ساعت نانواکسیدروی (۱۰۷/۴میکروگرم بر لیتر) با نانواکسیدمس (۱۰۲/۳میکروگرم بر لیتر) نشان می‌دهد که نانواکسیدمس از ظرفیت مسموم‌کنندگی بیشتری برخوردار است.

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های آزمایشگاهی، حساسیت باکتری‌های *S. iniae* و *Lactococcus garvieae* به نانواکسیدروی تقریباً نزدیک به فلورفنیکل بوده است. ولی به نظر می‌رسد که به‌کارگیری مستقیم غلظت موثر نانوذرات فلزی بر عوامل باکتریایی بیماری‌زا می‌تواند سبب بروز مرگ‌ومیر ناشی از مسمومیت در ماهی قزل‌آلا شود.

کلیدواژه‌ها: نانواکسیدمس، نانواکسیدروی، حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی، میانه غلظت کشنده، قزل‌آلای رنگین‌کمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۱

*نویسنده مسئول: nima.shiry@gmail.com

مقدمه

ورود به هزاره سوم و شکوفایی فناوری نانو سبب کاربرد آن در تحقیقات حوزه بهداشت و درمان شده است. افزایش همه‌گیری‌های عفونی ناشی از بیماری‌های باکتریایی در صنعت آبزی‌پروری، توسعه مقاومت باکتریایی به عوامل آنتی‌میکروبی و معضل باقیمانده دارویی در محصول نهایی سبب به‌کارگیری جایگزین‌های نوین، کم‌خطر و ارزان‌قیمت شده است و از جمله روش‌های جایگزین، استفاده از نانوذرات است[1, 2]. مشخص شده است که نانوذرات فلزات سنگین در غلظت‌های بسیار کم، می‌توانند سبب نابودی سلول‌های پروکاریوتی شوند که مکانیزم اصلی تاثیر روی باکتری‌ها از طریق آسیب به DNA، پروتئین و تخریب دیواره سلولی است[3, 4]. در این میان، نانوذرات نقره دارای موثرترین فعالیت ضدمیکروبی علیه بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی در مقایسه با سایر نانوذرات فلزی هستند[5-7] و علی‌رغم اینکه برای طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت، سمی به شمار می‌روند، زیانی برای سلول‌های یوکاریوتی ندارند[8]. با این حال گران‌قیمت‌بودن این فلز سبب می‌شود تا کاربرد آن مقرون‌به‌صرفه نباشد.

نانوذرات تجاری اکسیدمس و اکسیدروی مورد استفاده در مطالعه حاضر، علیه برخی گونه‌های باکتریایی شامل *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (*S. epidermis*) دارای فعالیت ضدمیکروبی بالایی هستند و ترکیب آنها برای بعضی از باکتری‌ها باعث افزایش اثر باکتری‌کشی شده است[9]. نانوذرات اکسیدروی اثر ضدباکتریایی علیه پاتوژن‌های باکتریایی مختلف نظیر *اشریشیا کلی*[10]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[11] و *باسیلوس سابتیلیس* (*Bacillus subtilis*) [12] نشان داده‌اند. همچنین، مشخص شده است که این نانوذرات فلزی سمیت بسیار زیادی برای باکتری‌های رایج در لجن فاضلاب دارند، به‌طوری که محاسبه غلظت بدون اثر بازدارنده (NOEC) نشان داد که کمترین مقدار این نانوذره نیز برای باکتری‌های آزمایش‌شده فوق‌العاده سمی هستند[13]. میانه غلظت موثر (EC50) ۲۴ساعته نانوذرات اکسیدروی علیه *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۵/۴۷ و ۲/۳۸میلی‌گرم بر لیتر و NOEC برای این دو باکتری به ترتیب ۱/۱۵ و ۳/۲۸میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. بنابراین طبق معیار ارائه‌شده EPA از نظر سمیت حاد، نانواکسیدروی (ZnO) در رده سمیت متوسط قرار می‌گیرد[14]. بررسی خصوصیات باکتری‌کشی نانوذرات مس علیه عامل بیماری سپتی‌سمی هموراژیک در ماهی نیز نشان داد که این نانوذرات فلزی، در غلظت ۲۴۳میکروگرم بر میلی‌لیتر توانسته است رشد باکتری‌های *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) را تا ۹۹/۹۹% کاهش دهد. به علاوه، قطر ناحیه بازداری رشد در مقابل ترکیب نانوذرات و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین برابر با ۱۲میلی‌متر به دست آمد که به‌طور معنی‌داری از نواحی حاصل از هر یک از آنها به‌طور جداگانه بیشتر بوده است و بیانگر افزایش قدرت ضدباکتریایی ادغام این ترکیبات است[15].

در صنعت آبزی‌پروری هدف اصلی فعالان این حوزه تولید محصول بیشتر، افزایش بهره‌وری و ایمنی بالاتر در طول فرآیند تولید است. کاربردهای نانوذرات در آبزی‌پروری می‌توانند بسیار متفاوت باشند که مهم‌ترین آنها شامل به‌کارگیری مستقیم نانوذرات در غذا به‌عنوان محرک رشد، استفاده به‌عنوان واسطه حذف مواد آلی از آب و مصارف

www.SID.ir

Archive of SID

بهداشتی به‌منظور ضدعفونی سطوح و استخرها از عوامل عفونی است. از سوی دیگر، سمیت این نانوذرات برای ماهیان پرورشی کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند[16]. نانوذرات نقره می‌توانند سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های Na^+/K^+-ATPase، استیل‌کولین‌استراز (اریتروسیت) و تراز الکترولیتی پلاسما شوند و نانوذرات روی، ظهور ضایعات هیستوپاتولوژیک در بافت‌های آبشش، کبد و کلیه ماهی را افزایش داده‌اند[17,18]. همچنین، بررسی سمیت حاد در چهار گونه ماهی نشان داد که گونه‌های آکواریومی (افرا و گوپی) مقاومت بیشتری در مقابل نانوذرات نقره نسبت به ماهیان خوراکی (کپور و برزم) داشته‌اند[19].

بنابراین، مطالعه حاضر در نظر دارد تا به بررسی سمیت نانواکسیدروی و نانواکسیدمس (CuO) در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) بر روی برخی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در ماهیان پرورشی بپردازد. از طرفی لازم بوده است، با توجه به سمی‌بودن این نانوذرات برای ماهیان، درجه سمیت آنها برای قزل‌آلای رنگین‌کمان، به‌عنوان مهم‌ترین گونه آبزی‌پروری ایران تعیین شود. اطلاعات حاصل از این مطالعه می‌تواند منجر به یک جمع‌بندی در خصوص به‌کارگیری نانوذرات اکسیدمس و اکسیدروی برای مدیریت بهداشتی مزارع سردابی ایران شود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نانوذرات فلزی

ابتدا نانواکسیدروی و نانواکسیدمس تجاری از نمایندگی شرکت NanoAmor (نانوپارس؛ تهران) خریداری شدند. هر کدام از آنها، بر مبنای روش *شفیعی* و همکاران[15] در یک رآکتور Batch در فشار هیدروژن ۱۰بار در دمای ۵۰۰°C به مدت ۵ ساعت به‌منظور فعال‌سازی و آماده‌شدن برای واکنش‌های بعدی قرار داده شدند. نانوذرات احیاشده به‌صورت پودر سیاه‌رنگ درآمدند. برای تشخیص خواص کریستال‌های نانوذرات از یک دستگاه پراش‌سنج اشعه ایکس مدل XRD-6100 (Shimadzu؛ ژاپن) با یک منبع تشعشع CuKα (از لوله‌های مسی به‌عنوان آند) و یک فیلتر Ni استفاده شد. قطر کریستال‌های موجود در هر نانوذره یا به عبارت دیگر میانگین اندازه دانه‌های پودر یا L(Å) با معادله دبای- شرر به‌صورت زیر محاسبه شد[20]:

$$L = \frac{K.\lambda}{\beta.\cos\theta}$$

تست حساسیت

نمونه‌های باکتریایی (*Streptococcus iniae*، *لاکتوکوکوس گارویه* (*Lactococcus garvieae*)، *یرسینیا روکری* (*Yersinia ruckeri*)، *آئروموناس هیدروفیلا* و *آئروموناس ورونی* (*A. veronii*) از ایزوله‌های موجود در بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز (به‌دست‌آمده از ماهیان پرورشی بیمار استان فارس) بوده‌اند که پیشتر از طریق تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی مورد تایید قرار گرفته بودند[21-24]. این جدایه‌ها روی محیط‌های BHA و نوترینت آگار (مرک؛ آلمان) کشت شدند و پس از انکوباسیون به‌منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی استفاده شدند[25]. به‌منظور تعیین حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه، از روش نفوذ چاهی تشریح‌شده توسط *اعظم* و همکاران[26] با اندکی اصلاحات استفاده شده است. بر این اساس ابتدا هر باکتری به‌طور جداگانه در محیط مولرهینتون براث (MHB) کشت داده شدند و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر HITACHI 902 محلول حاوی سوسپانسیون باکتریایی با کدورتی معادل نیم مک‌فارلند در MHB تهیه شد. سپس ۱۰۰میکرولیتر از این سوسپانسیون‌ها بر روی ۳ پلیت به‌عنوان تکرار (برای هر باکتری) حاوی نوترینت آگار یا BHA استریل ریخته و در تمام سطح پلیت‌ها پخش شد. پس از استراحت ۲۰دقیقه‌ای که به‌منظور جذب باکتری‌ها در محیط کشت انجام شد، ۴ عدد چاهک به قطر ۸میلی‌متر درون محیط‌های کشت پانچ شدند. دو چاهک برای تزریق ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون‌های نانوذرات اکسیدمس و اکسیدروی (غلظت ۳۰۰میکرگرم بر میلی‌لیتر)، یک چاهک برای تزریق کنترل مثبت حاوی ۱۰۰میکرولیتر فلورفنیکل (رویان دارو؛ ایران؛ Aquaflor® 50%) با غلظت ۱۰میلی‌گرم بر لیتر و چاهک دیگر برای تزریق کنترل منفی حاوی ۱۰۰میکرولیتر آب مقطر مورد استفاده قرار گرفتند. سپس تمامی پلیت‌ها (مجموعاً ۱۸ عدد) در دمای ۲۵°C انکوباسیون خود را گذراندند. پس از گذشت حدود ۲۴ ساعت، اندازه قطر هاله عدم رشد به‌وسیله کولیس مدرج اندازه گرفته شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC)

تعیین MIC و MBC نانوذرات فلزی به روش میکرودایلوشن در MHB و با استفاده از پلیت‌های ۹۶خانه‌ای انجام شد. بدین منظور از کشت تازه باکتری‌ها در کدورتی معادل نیم مک‌فارلند تهیه شد و با رقیق‌سازی ۱ به ۱۰۰ در نهایت کدورت 10^6CFU بر میلی‌لیتر به دست آمد. رقت‌های مختلف نانوذرات شامل ۰/۰۱، ۰/۰۳، ۰/۰۶، ۰/۱۲، ۰/۱۸، ۰/۲۴ و ۰/۳میکروگرم بر میلی‌لیتر در محیط MHB تهیه شدند. سپس در پلیت ۹۶خانه‌ای پلی‌استایرن میزان ۱۰۰میکرولیتر از رقت‌های مختلف نانوذرات فلزی به همراه ۱۰۰میکرولیتر سوسپانسیون باکتری‌های مورد مطالعه (به‌طور جداگانه) در سه تکرار ریخته شد[27]. کنترل‌های مثبت و منفی این آزمایش به ترتیب شامل محیط کشت و باکتری (بدون نانوذرات) و محیط کشت (بدون باکتری و نانوذرات) بودند. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۲۵°C در گرمخانه قرار داده شدند. در پایان، کدورت در طول موج ۶۲۰نانومتر توسط الایزا میکروپلیت ریدر ELx 808 (Bio Tek؛ ایالات متحده) خوانده شد. کمترین غلظت مورد استفاده از سوسپانسیون نانوذرات که مانع رشد (کاهش کدورت) در مقایسه با گروه کنترل شده بود، به‌عنوان MIC/MBC در نظر گرفته شد.

جانوران آزمایشی و شرایط نگهداری آنها

تعداد اسمی ۱۰۰ قطعه قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن ۳/۶±۵۵/۷گرم از یکی از مراکز پرورش ماهی سردابی استان فارس

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه شدند و به کارگاه بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز انتقال یافتند. این ماهیان به‌منظور سازش‌پذیری در تانک‌های ونیروی ۵۰۰لیتری دارای جریان آب تازه و هوادهی مداوم، به مدت ۲-۱ هفته نگهداری شدند. در طول این دوره، این ماهیان با غذای کنسانتره ایرانی (۲ بار در روز) و تا پیش از تقسیم‌شدن در تانک‌های مربوط به هر گروه آزمایشی تغذیه شدند. منبع آب یک حلقه چاه با دبی ۳-۱لیتر بر ثانیه در محل انجام مطالعه بوده است. تعویض آب روزانه تانک‌های آزمایشی به میزان حداکثر ۲۰% حجم هر تانک بود و هوادهی از طریق یک هواده مرکزی انجام می‌شد. فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب نظیر سختی کل، قلیایی‌بودن، TSS، TDS و EC پیش از آغاز آزمایش و براساس روش استاندارد APHA سنجیده و به ترتیب معادل ۳۴۴/۵، ۹۳/۲۷، ۳۵/۲۷ و ۲۲۱۰میلی‌گرم بر لیتر و ۲/۳۲میکروزیمنس بر سانتی‌متر ثبت شدند. به علاوه مقدار اکسیژن محلول و pH آب نیز در طول دوره آزمایش‌ها به ترتیب با روش وینکلر (بر پایه اکسیداسیون یون دوظرفیتی منگنز) و با استفاده از pHمتر دیجیتال مورد پایش قرار گرفتند و به ترتیب در دامنه‌های ۶-۵میلی‌گر بر لیتر و ۷/۹-۷/۶ تنظیم شدند[28]. دمای آب به‌طور روزانه از طریق ترمومتر جیوه‌ای سنجیده شد و کنترل و تثبیت آن در محدوده ۱۷-۱۶°C و در زمان مقتضی با استفاده از هیتر شعله‌ای صورت می‌گرفت.

آزمایش سمیت کشنده

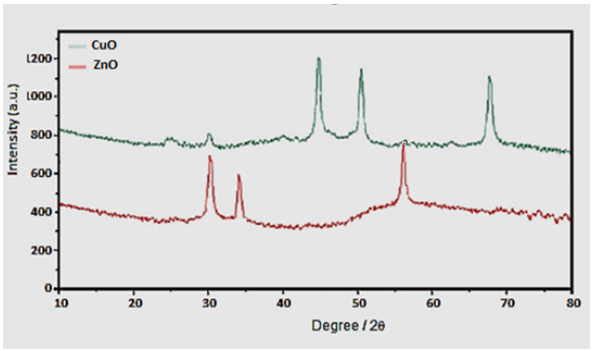
برای آزمایش‌های زیست‌سنجی (سمیت کشنده) نخست محدوده غلظت‌های هر سم (یا آلاینده) و فاصله لگاریتمی آن با انجام یک آزمایش مقدماتی (پایلوت) تعیین می‌شود، سپس آزمایش اصلی انجام خواهد شد[29]. بدین منظور، ۳ غلظت نانوذرات اکسیدمس و اکسیدروی شامل ۵۰، ۲۵۰، ۶۵۰میکروگرم بر لیتر بر مبنای نتایج *اسکون* و همکاران[30] انتخاب شدند و مورد سنجش برای ۴۸ ساعت در شرایط استاتیک آب تانک‌های آزمایشی قرار گرفتند. کمترین غلظت‌هایی که ۱۰۰% ماهیان تانک در دوره آزمایش تلف شدند، به‌عنوان مبنای آزمایش اصلی برگزیده شدند. زیست‌سنجی نانوذرات اکسیدروی و اکسیدمس بر روی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی براساس راهنمای OECD (شماره ۲۰۳) انجام شد[31]. بدین ترتیب ابتدا محدوده غلظت‌های هر نانوذره و فاصله لگاریتمی آنها با استفاده از یک پایلوت تعیین شد. غلظت‌های آزمایش اصلی سمیت حاد برای قزل‌آلای رنگین‌کمان به ترتیب برابر با ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰ و ۶۴۰میکروگرم بر لیتر تعیین و ماهیان با دامنه وزنی مناسب و نزدیک به هم، پس از سازش‌پذیری در ۵ تیمار و ۲ تکرار به‌صورت تصادفی تقسیم شدند (۸ ماهی به ازای هر تانک). آزمایش براساس دستورالعمل اشاره‌شده، به‌صورت استاتیک و در ۹۶ ساعت متوالی بود و شرایط فیزیکی و شیمیایی آب در طول آزمایش پایش و نزدیک به شرایط دوره سازش‌پذیری تنظیم شد. در طول دوره آزمایش‌ها غذادهی قطع شده بود. مرگ‌ومیر ماهیان در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی نرمال‌بودن و وضعیت همگنی داده‌های حاصل از تست‌های حساسیت و MIC/MBC از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. در صورت نرمال‌بودن از آنالیز واریانس یک‌طرفه همراه با آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه گروه‌های آزمایشی بهره گرفته شد. در صورت احراز عدم همگنی داده‌ها، آزمون‌های غیرپارامتریک هم‌تراز به کار گرفته شدند. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به ثبت تلفات ماهیان در زیست‌سنجی از روش رگرسیون پروبیت استفاده شد[32] که به ترتیب منجر به تعیین شاخص‌های LC10، LC50 و LC90 شد. همچنین کمیت‌های حداکثر غلظت مجاز سم (MATC) و حداقل غلظت موثر (LOEC) براساس روابط تشریح‌شده در مطالعات پیشین به دست آمدند[33]. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزارهای Excel 2016 و SPSS 20.0 انجام شدند.

یافته‌ها

نتایج آنالیز پراش پرتوهای ایکس نمونه‌های نانوذرات فلزی نشان داد که پیک‌های مربوط به نانواکسیدمس (بالایی) و نانواکسیدروی (پائینی) به ترتیب در $2\theta=$ ۴۴/۷۸۳۳ و $2\theta=$ ۵۶/۳۰۹۳ نمایان شده‌اند. همچنین افزایش عملکرد از نظر بازتابش اشعه ایکس برای نانواکسیدمس (۱۲۱۳/۵a.u.) نسبت به نانواکسیدروی (۸۰۷/۲a.u.) دیده شد (نمودار ۱). بیشینه قطر کریستال‌ها یا ذرات موجود در هر یک از آنها قطر ذرات براساس معادله شرر، برای نانواکسیدمس و نانواکسیدروی به ترتیب معادل ۴۱/۴۸ و ۴۹/۶نانومتر برآورد شده است.



نمودار ۱) پراش پرتوی ایکس مربوط به کریستال‌های نانواکسیدمس و نانواکسیدروی

نتایج حساسیت‌های برخی عوامل باکتریایی بیماری‌زا در ماهی نسبت به نانوکاتالیزورهای اکسیدروی و اکسیدمس و همچنین فلورفنیکل (به‌عنوان کنترل) بر مبنای میانگین قطر هاله عدم رشد در جدول ۱ ارایه شده است.

بر مبنای این یافته‌ها، باکتری‌های گرم مثبت *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* نسبت به نانواکسیدروی وضعیت

www.SID.ir

Archive of SID

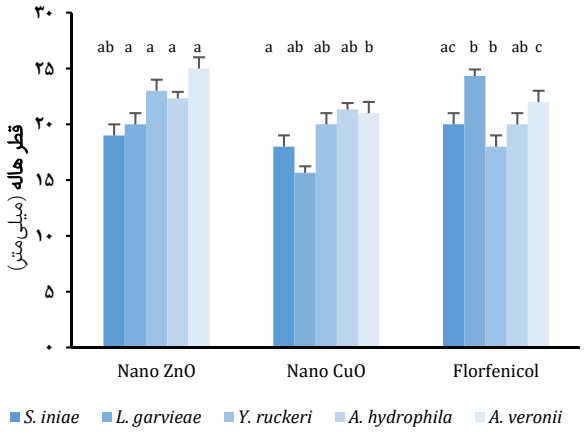
میانه دارند، اما نسبت به نانواکسیدمس مقاوم هستند. عامل بیماری دهان قرمز و آئروموناس‌های متحرک همگی نسبت به وجود نانوذرات اکسیدروی حساس هستند. اما شواهد نشان می‌دهد که نانواکسیدمس شدت مهارکنندگی/کشندگی کمتری دارد و پاتوژن‌های گرم منفی حالت بینابینی نسبت به این نانوذره فلزی داشته‌اند.

نتایج حاکی از وجود تفاوت معنی‌داری بین اثر ضدباکتریایی موارد مورد استفاده علیه عوامل باکتریایی بیماری‌زا بوده است ($p<0/05$)، به‌جز گونه *استرپتوکوکوس اینیایی* که این خاصیت بین تمامی مواد آزمایشی از نظر آماری یکسان بود ($p>0/05$). نتایج آزمون تعقیبی در نمودار ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱) درجه حساسیت برخی عوامل باکتریایی بیماری‌زا در ماهیان پرورشی به نانوذرات فلزی بر مبنای قطر هاله عدم رشد

گونه پاتوژن	نانوکاتالیزور/کنترل	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)*	درجه حساسیت**
Streptococcus iniae	نانواکسیدروی	۱۹	I
	نانواکسیدمس	۱۸	R
	فلورفنیکل	۲۰	I
Lactococcus garvieae	نانواکسیدروی	۲۰	I
	نانواکسیدمس	۱۵/۶	R
	فلورفنیکل	۲۴/۳	S
Yersinia ruckeri	نانواکسیدروی	۲۳	S
	نانواکسیدمس	۲۰	I
	فلورفنیکل	۱۸	R
Aeromonas hydrophila	نانواکسیدروی	۲۲/۳	S
	نانواکسیدمس	۲۱/۳	I
	فلورفنیکل	۲۰	I
Aeromonas veronii	نانواکسیدروی	۲۵	S
	نانواکسیدمس	۲۱	I
	فلورفنیکل	۲۲	S

* میانگین ۳ تکرار در آزمایش و با احتساب قطر چاهک (۸میلی‌متر)؛ ** S: حساس؛ I: میانه؛ R: مقاوم



نمودار ۲) مقایسه میانگین‌های اثر نانواکسیدروی، نانواکسیدمس و فلورفنیکل بر عوامل پاتوژن؛ حروف مختلف در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی هستند ($p<0/05$).

براساس این یافته‌ها، حساسیت *لاکتوکوکوس گارویه* به نانواکسیدروی به‌طور معنی‌داری بیشتر از حساسیت به نانواکسیدمس است و هر دو نانوذره از نظر آماری خاصیت ضدباکتریایی ضعیف‌تری نسبت به آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل نشان دادند. به‌طور معنی‌داری هاله عدم رشد *یرسینیا روکری* و آئروموناس‌ها در مقابل نانواکسیدروی بزرگ‌تر از دو مورد دیگر بوده است ($p>0/05$) و از این نظر قدرت کشندگی/مهارکنندگی نانواکسیدمس و فلورفنیکل فاقد تفاوت آماری بودند ($p>0/05$).

نتایج مهارشدگی عوامل باکتریایی بیماری‌زای مورد مطالعه در برابر غلظت‌های نانوذرات اکسیدروی و اکسیدمس در جدول‌های ۲ و ۳ ارایه شده است.

جدول ۲) مهارشدگی (شفافیت) عوامل باکتریایی بیماری‌زا در برابر غلظت‌های نانوذرات روی

گونه	غلظت نانواکسیدروی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)**							
	صفر	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۶	۰/۱۲	۰/۱۸	۰/۲۴	۰/۳
S. iniae	+ (C+*)	+	+	+	+	+	-	-
L. garvieae	+ (C+)	+	+	+	+	-	-	-
Y. ruckeri	+ (C+)	+	+	-	-	-	-	-
A. hydrophila	+ (C+)	+	+	-	-	-	-	-
A. veronii	+ (C+)	+	+	-	-	-	-	-
NP* **	- (C-)	-	-	-	-	-	-	-

* گروه‌های شاهد شامل C+ (کنترل مثبت) دارای محیط کشت و باکتری؛ C- (کنترل منفی) دارای محیط کشت؛ ** + نشان‌دهنده کدورت (رشد پرگنه‌ها) و - نشان‌دهنده شفافیت (مهارشدگی رشد پرگنه‌ها) است؛ *** NP: بدون پاتوژن

جدول ۳) مهارشدگی (شفافیت) عوامل باکتریایی بیماری‌زا در برابر غلظت‌های نانوذرات مس

گونه	غلظت نانواکسیدمس (میکروگرم بر میلی‌لیتر)							
	صفر	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۶	۰/۱۲	۰/۱۸	۰/۲۴	۰/۳
S. iniae	+ (C+)	+	+	+	+	-	-	-
L. garvieae	+ (C+)	+	+	+	+	+	-	-
Y. ruckeri	+ (C+)	+	+	+	-	-	-	-
A. hydrophila	+ (C+)	+	+	+	-	-	-	-
A. veronii	+ (C+)	+	+	+	-	-	-	-
NP* **	- (C-)	-	-	-	-	-	-	-

به استناد این یافته‌ها، نانوذرات اکسیدمس و اکسیدروی به ترتیب در رقت‌های بیشتر از ۰/۱۸ و ۰/۲۴میکروگرم بر میلی‌لیتر توانستند که رشد *استرپتوکوکوس اینیایی* را به‌طور معنی‌داری مهار کنند ($p<0/05$). غلظت‌های کمتر فاقد تفاوت معنی‌دار با کنترل مثبت هستند ($p>0/05$). همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) نانواکسیدروی برای *لاکتوکوکوس گارویه*، *یرسینیا روکری*، *آئروموناس هیدروفیلا* و *آئروموناس ورونی* به ترتیب برابر با ۰/۱۸، ۰/۰۶، ۰/۰۶ و ۰/۰۶میکروگرم بر میلی‌لیتر و این کمیت مربوط به نانواکسیدمس برای همین عوامل پاتوژن به ترتیب معادل ۰/۲۴، ۰/۱۲، ۰/۱۲ و ۰/۱۲میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

www.SID.ir

Archive of SID

براساس میزان مرگ‌ومیر در آزمایش سمیت، میانگین مقادیر LC10، LC50 و LC90 در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ترکیبات نانواکسیدروی و نانواکسیدمس برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان محاسبه شد (α= ۰/۹۵) و به ترتیب در جدول‌های ۴ و ۵ نشان داده شده‌اند.

جدول ۴) میانگین آماری مقادیر حاصل از آزمایش سمیت کشنده نانواکسیدروی بر قزل‌آلای رنگین‌کمان در زمان‌های مختلف (برحسب میکروگرم بر لیتر)

غلظت کشنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC10	۲۳۷/۲۰±۱۳/۸	۲۰۱/۱۵±۳۷/۲	۷۹/۹±۰۶/۱۴	۳۲/۴±۱/۹
LC50	۱۱۶۶/۱۰۸±۸/۵	۹۸۱/۹۵±۷۴/۰۸	۴۸۱/۹۰±۹۴/۳	۱۰۷/۱۱±۴/۲
LC90	۵۷۵۴/۶۴۳±۴	۴۷۸۶/۱۸۹±۳	۲۹۵۱/۳۴۵±۲۱	۳۵۴/۳۶±۸۱

جدول ۵) میانگین آماری مقادیر حاصل از آزمایش سمیت کشنده نانواکسیدمس بر قزل‌آلای رنگین‌کمان در زمان‌های مختلف (برحسب میکروگرم بر لیتر)

غلظت کشنده	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC10	۱۸۷/۱۲±۹۳/۰۶	۱۳۲/۲۴±۷۴/۸	۹۰/۱۳±۳۶	۳۰/۷±۶۹/۶
LC50	۸۹۷/۹۹±۴۳/۹	۵۳۳/۷۸±۳۵/۱	۳۲۳/۶۵±۵۶/۱۴	۱۰۲/۴۱±۳۳/۹
LC90	۴۲۸۵/۸۱۲±۴۸	۲۳۰۶/۴۳۱±۷۴	۱۱۶۱/۱۳۹±۴۵	۳۴۱/۷۳±۱۹

مقادیر LC50 در ۹۶ ساعت، MATC و LOEC نانواکسیدروی برای ماهیان آزمایشی به ترتیب برابر با ۱۰۷/۴، ۱۰/۷ و ۳۲/۱میکروگرم بر لیتر و مقادیر مربوط به نانواکسیدمس به ترتیب معادل ۱۰۲/۳، ۱۰/۲ و ۳۰/۷میکروگرم بر لیتر به دست آمدند. بدین ترتیب نانواکسیدمس در زمان برابر، خاصیت سمیت و کشندگی بیشتری نسبت به نانواکسیدروی نشان داد که البته این تفاوت معنی‌دار نیست (p>۰/۰۵). معمول‌ترین عارضه برای ماهیان مسموم‌شده با این نانوذرات بروز اختلالات تنفسی بود که در معاینه روزانه دیده می‌شد.

بحث

نانوذرات فلزی که به‌عنوان واکنش‌گر ضدباکتریایی در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفتند، دارای ویژگی‌های ساختاری خاصی در کریستال‌های خود بودند. بر این اساس نانواکسیدمس عملکرد بازتابشی بهتری نسبت به نانواکسیدروی از خود نشان داد ولی در زمان دیرتری توسط آشکارساز اشعه ایکس ثبت شد که در عمل این مزیت را بی‌اثر می‌کند. ویژگی مهم دیگر، قطر ذرات بود که براساس آن مشخص شد نانوذرات اکسیدمس اندکی ریزتر بودند. این ویژگی سبب می‌شود تا سطح نسبت به حجم افزایش یابد و به نوعی بهبود عملکرد کاتالیزوری را در پی دارد. ارزیابی سطح تماس نانوکاتالیزورها با محیط پیرامون آنها، در مطالعه مورفولوژیک اهمیت بسیاری دارد، زیرا اکثر نانومواد کاتالیزوری با ایجاد یک سطح یا محل انجام واکنش واسطه، منجر به سرعت‌بخشیدن و بهبود پیشرفت واکنش‌ها (در اینجا اثر ضدباکتریایی) می‌شوند. بنابراین هر چه سطح تماس کاتالیزور با محیط بیشتر باشد، کارآیی آن بیشتر خواهد بود. پس ساختارهای پفکی‌شکل می‌توانند سطح تماس خوبی با محیط داشته باشند[34].

در بررسی آزمایشگاهی که در مطالعه حاضر بر روی سمیت نانوذرات صورت گرفت، مشخص شد که حساسیت باکتری‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *لاکتوکوکوس گارویه* به نانواکسیدروی تقریباً نزدیک به آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل بوده است. این آنتی‌بیوتیک یک داروی ضدباکتریایی وسیع‌الطیف و چهار برابر بیشتر بر روی باکتری‌های گرم مثبت موثر است[35]. نانواکسیدمس نتوانسته است نسبت به گروه کنترل تاثیر چندانی بر روی مهار رشد یا کشتن باکتری‌های ذکرشده داشته باشد، اما در مقابل گروه‌های دیگر باکتری که همگی گرم منفی بودند نظیر آئروموناس‌های متحرک و انتروباکتری‌ها (یرسینیا) هر دو نانوذرات مورد بررسی، دارای توان ضدباکتریایی مناسبی بودند.

این اختلاف در حساسیت نسبت به نانوذرات مورد مطالعه، می‌تواند ناشی از تفاوت ساختار دیواره سلولی این عوامل پاتوژن از منظر زیست‌شناسی تکاملی باشد. به عبارت دیگر، وجود مقادیر بالای زنجیره‌های پپتیدوگلیکان توانسته است حفاظت بیشتری از باکتری‌های گرم مثبت در مقابل این نانوذرات انجام دهد. این نکته در تحقیقات پیشین نیز مورد تایید قرار گرفته است. درواقع مکانیزم اصلی نانوذرات روی[36] و نانواکسیدمس[37] تخریب دیواره سلولی است و باکتری‌های گرم منفی ناتوانی بیشتری نسبت به این مکانیزم تخریبی از خود نشان خواهند داد[4].

علی‌رغم اینکه فلزات روی و مس در ماهیت خود دارای سمیت مشابهی هستند[8]، همچنین از نظر ساختاری نانواکسیدمس مورد استفاده شامل کریستال‌های ریزتر و عملکرد بازتابشی بهتری است، اما خاصیت ضدباکتریایی ضعیف‌تری نسبت به نانواکسیدروی در مقابل باکتری‌های مختلف به‌ویژه *لاکتوکوکوس گارویه* از خود نشان داد. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی/کشندگی این نانوذرات نیز این مساله را تایید می‌کند. اگرچه در مورد *استرپتوکوکوس اینیایی* حداقل غلظتی از نانواکسیدروی که توانسته سبب مهار یا مرگ‌ومیر این باکتری شود (۰/۱۸میکروگرم بر میلی‌لیتر) کمتر از همین کمیت برای نانواکسیدمس (۰/۲۴میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود که حاکی از قدرت ضدباکتریایی بالاتر نانوذره حاوی مس برای تخریب فیزیولوژیک باکتری ذکرشده بود.

با این حال، در مورد سایر باکتری‌های بیماری‌زا در ماهی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند، به‌طور عمومی نانواکسیدروی در غلظت‌های کمتری توانست خاصیت ضدباکتریایی خود را نشان دهد. مقایسه مقادیر MIC نانواکسیدروی برای *استرپتوکوکوس اینیایی* در مطالعه *محمدبیگی* و همکاران[38] (۰/۰۱۵میکروگرم بر میلی‌لیتر) با کمیت مشابه در مطالعه حاضر، حاکی از این است که سویه جداشده از مناطق شمالی ایران (استان‌های تهران، مازندران و گلستان) حساسیت بیشتری نسبت به جدایه استان فارس داشته است. این در حالی است که مقایسه اثر باکتری‌کشی نانواکسیدمس بر *آئروموناس هیدروفیلا* نشان داد که جدایه شهرکرد[15] نسبت به این نانوکاتالیزور بسیار مقاوم‌تر از جدایه فارس بوده است (۲۴۳ در مقابل ۰/۰۶میکروگرم بر میلی‌لیتر) و این اختلاف بیش از ۴۰۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

برابری شاید به‌دلیل تفاوت در متدولوژی تعیین MIC باشد. برابری مقادیر MIC و MBC می‌تواند به این دلیل باشد که نانوذرات اکسیدمس و اکسیدروی فاقد قدرت مهارکنندگی رشد برای باکتری‌های هدف هستند و با کشتن آنها از طریق تخریب دیواره سلولی، تغییر فشار اسمزی و پلاسمولیز حاصل از آن، سبب کنترل جمعیت بیوفیلم‌ها می‌شود[2]. بنابراین فاقد هرگونه مکانیزمی همانند برخی آنتی‌بیوتیک‌ها (نظیر فلورفنیکل) در جهت مهارکنندگی رشد هستند و از این منظر وابسته به غلظت نیستند[4].

در خصوص آزمایش زیست‌سنجی نانوذرات و تعیین سمیت کشنده آنها برای قزل‌آلای رنگین‌کمان، با توجه به اینکه طی دوره سازش‌پذیری ماهیان هیچ تلفاتی دیده نشد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت مرگ‌ومیر ماهیان در طول دوره آزمایش ناشی از افزودن نانوذرات فلزی به آب باشد. مقایسه مقادیر LC50 در ۹۶ ساعت نانواکسیدروی (۱۰۷/۴میکروگرم بر لیتر) با نانواکسیدمس (۱۰۲/۳میکروگرم بر لیتر) نشان می‌دهد که برخلاف اثر ضدباکتریایی، نانواکسیدمس از ظرفیت توکسیک (مسموم‌کنندگی) بیشتری برخوردار است. مقایسه سمیت نانوذرات نقره برای کپور معمولی حاکی از این است که در مطالعه حاضر نانوذرات فلزی دارای سمیتی نزدیک به ۱۰۰ برابر کمتر هستند، علی‌رغم اینکه معمولاً کپور معمولی مقاومت بیشتری در برابر آلاینده‌ها نسبت به قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد[29, 33].

مهم‌ترین عارضه پاتولوژیک مشاهده‌شده در ماهیان مسموم اختلالات تنفسی است که علت عمده مرگ نیز می‌تواند باشد. این مساله در تحقیقات پیشین با نشان‌دادن تغییر در ریخت فیلامنت‌های آبشش و سرکوب بیان ژن‌های مرتبط با دفع یون‌ها در سلول‌های آبششی در ماهی زبرا دانیو[39]، تجمع زیستی در لاملاهای اولیه آبشش قزل‌آلای رنگین‌کمان[30]، رخداد فیزیولوژیک هیپوکسی در سوف اروپایی[40]، مهارشدگی آنزیم Na+/K+-ATPase سلول‌های آبششی ماهی زبرا دانیو[17] و بروز هم‌جوشی شدید در لاملاهای ثانویه ماهی کلمه[18] مورد تایید قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری

مقایسه بالاترین میزان MIC/MBC (۰/۲۴قسمت در میلیون) با میانگین LC50 در ۹۶ ساعت (۰/۱قسمت در میلیون) نشان می‌دهد که به‌کارگیری مستقیم غلظت موثر نانوذرات فلزی بر عوامل باکتریایی بیماری‌زا می‌تواند سبب بروز مرگ‌ومیر ناشی از مسمومیت در ماهی قزل‌آلا شود. درواقع زمانی که غلظت نانوذرات به حد حداقل غلظت مهارکنندگی/کشندگی خواه در پلاسما و خواه در محیط برسد و بتواند اثرگذار باشد، ماهی دچار مسمومیت شده است. با توجه به اینکه غلظت پیشنهادی نانواکسیدمس/نانواکسیدروی (۰/۲۴قسمت در میلیون) برای درمان قزل‌آلای رنگین‌کمان بیمار ایمن نیست، پیشنهادهای ذیل به‌منظور بهره‌برداری از پتانسیل ضدباکتریایی این نانوذرات ارایه می‌شوند:

الف) به‌کارگیری نانوذرات اکسیدروی و اکسیدمس صرفاً در جهت ضدعفونی سطوح، استخرها و حوضچه‌های مورد استفاده در بخش پرواربندی، تراف‌ها وانکوباتورهای مورد استفاده در تکثیر و کارکردهایی بدین شکل در سایر مراحل تولید، توصیه می‌شود. با توجه به نیاز به غلظت بسیار اندک برای رسیدن به حد کشندگی به نظر می‌رسد که استفاده از این نانوذرات توجیه اقتصادی داشته باشد که البته نیازمند انجام تحقیقات امکان‌سنجی فنی- اقتصادی در این زمینه است.

ب) بارگذاری نانوذرات اکسیدروی و اکسیدمس بر روی درام‌فیلتر با امکان شارژ دوره‌ای آنها که البته می‌بایست آزمایش‌های سمیت حاد و مزمن برای ماهیان پرورشی نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان و همچنین بررسی وجود باقیمانده نانوفلزات در جهت اطمینان از سلامت مصرف‌کنندگان انجام شود. ساخت این نانوفیلتر و استفاده از آن می‌تواند منجر به کاهش مصرف مواد ضدعفونی‌کننده، آنتی‌بیوتیک‌ها و غیره در مزارع پرورشی شود. همچنین به‌کارگیری این روش به همراه لامپ‌های فرابنفش و ازناتور قابلیت این را دارد که مدیریت بهداشتی یک مزرعه را تا حد قابل قبولی تامین کند.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله نویسندگان از جناب آقای مهندس محمد *سعید فریدونی* مسئول آزمایشگاه بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز صمیمانه سپاسگزاری می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی: لازم است که تاکید شود تمامی فرآیندهای مرتبط با ماهیان مورد آزمایش در این مطالعه، اعم از ذخیره‌سازی یا نمونه‌برداری از آیین‌نامه اخلاق زیستی دانشگاه شیراز برای نگهداری و استفاده از جانوران مهره‌دار در مطالعات آزمایشگاهی (IACUC. No. 4687/63) پیروی کرده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: نیما شیری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۹۰%)؛ مصطفی اخلاقی (نویسنده دوم)، پژوهشگر فرعی (۱۰%)

منابع مالی: تمامی هزینه‌های انجام مطالعه حاضر توسط مرکز نوآوری و کارآفرینی دانشگاه شیراز (هسته کارآفرینی دانشکده دامپزشکی) پرداخت شده است و تمامی منافع مادی احتمالی این طرح تحقیقاتی متعلق به مرکز مذکور خواهد بود.

منابع

1- Hahm DH, Yeom MJ, Lee EJ, Shim IS, Lee HJ, Kim HY. Effect of Scutellariae radix as a novel antibacterial herb on the ppk (Polyphosphate kinase) mutant of Salmonella typhimurium. J Microbiol Biotechnol. 2001;11(6):1061-5.

2- Mozahhab N. Antimicrobial effect of zinc oxide nanoparticles on luminescence bacteria (Vibrio species) isolated from shrimp ponds on the southeast of Iran [Dissertation]. Mashhad: Ferdowsi University of Mashhad; 2014. [Persian]

3- Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Daskalakis N, Jeuken L, Povey M, et al. Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E.

www.SID.ir

Archive of SID

coli. J Nanopart Res. 2010;12(5):1625-36.
4- Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier HC, Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. Chemosphere. 2008;71(7):1308-16.
5- Gong P, Li H, He X, Wang K, Hu J, Tan W, et al. Preparation and antibacterial activity of Fe3O4@ Ag nanoparticles. Nanotechnology. 2007;18(28):285604.
6- Soltani M, Ghodratnema M, Ahari H, Ebrahimzadeh Mousavi HA, Atee M, Dastmalchi F, et al. The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, Streptococcus iniae, Lactococcus garvieae, Yersinia ruckeri and Aeromonas hydrophila. J Vet Res. 2009;3(2):137-42.
7- Ravikumar S, Gokulakrishnan R, Raj JA. Nanoparticles as a source for the treatment of fish diseases. Asian Pac J Trop Dis. 2012;2(Suppl 2):S703-6.
8- Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv. 2009;27(1):76-83.
9- Hoseinzadeh E, Alikhani MY, Samarghandy MR. Evaluation of synergistic effect of commercial zinc oxide and copper oxide nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria by fraction inhibitory concentration index. J Zanjan Univ Med Sci Health Serv. 2012;20(82):31-43. [Persian]
10- Padmavathy N, Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles-an antimicrobial study. Sci Technol Adv Mater. 2008;9(3):035004.
11- Rajendra R, Balakumar C, Ahammed HA, Jayakumar S, Vaideki K, Rajesh E. Use of zinc oxide nano particles for production of antimicrobial textiles. Int J Eng Sci Technol. 2010;2(1):202-8.
12- Meruvu H, Vangalapati M, Chippada SC, Bammidi SR. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles and its antimicrobial activity against Bacillus subtilis and Escherichia coli. Rasayan J Chem. 2011;4(1):217-22.
13- Toolabi A, Zare MR, Rahmani A, Zare M, Asadi A, Sarkhosh M, et al. Comparison and determination of probable toxicity of ZnO nanoparticle by four current bacteria in wastewater sludge. J North Khorasan Univ Med Sci. 2013;5(2):397-403. [Persian]
14- Naddafi K, Zare MR, Younesian M, Rastkari N, Alimohammadi M, Mousavi N. Bioassay for toxicity assessment of zinc oxide and titanium oxide to Escherichia coli ATCC 35218 and Staphylococcus aureus ATCC 25923 Bacteria. Iran J Health Environ. 2011;4(2):171-80. [Persian]
15- Shaffiey SF, Ahmadi M, Shaffiey SR, Shapoori M, Varshoie H, Azari F. Synthesis of copper oxide (CuO) nanoparticles and surveying its bactericidal properties against Aeromonas Hydrophila bacteria. J Fasa Univ Med Sci. 2015;5(1):36-43. [Persian]
16- Khosravi-Katuli K, Prato E, Lofrano G, Guida M, Vale G, Libralato G. Effects of nanoparticles in species of aquaculture interest. Environ Sci Pollut Res. 2017;24(21):17326-46.
17- Katuli KK, Massarsky A, Hadadi A, Pourmehran Z. Silver nanoparticles inhibit the gill Na+/K+-ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (Danio rerio). Ecotoxicol Environ Saf. 2014;106:173-80.
18- Khosravi-Katuli K, Lofrano G, Nezhad HP, Giorgio A, Guida M, Aliberti F, et al. Effects of ZnO nanoparticles in the Caspian roach (Rutilus rutilus caspicus). Sci Total Environ. 2018;626:30-41.
19- Alishahi M, Mesbah M, Ghorbanpoor M. Assessment of toxicity of nano silver on four fish species. Iran J Vet Med. 2011;7(1):36-41. [Persian]
20- Al-Megren HA, Xiao T, Gonzalez-Cortes SL, Al-Khowaiter SH, Green ML. Comparison of bulk CoMo bimetallic carbide, oxide, nitride and sulfide catalysts for pyridine hydrodenitrogenation. J Mol Catal A Chem. 2005;225(2):143-8.
21- Akhlaghi M, Mahjor AA. Some histopathological aspects of streptococcusis cultured rainbow trout. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 2004;24(3):132-6.
22- Akhlaghi M, Sharifiyazdi H. Detection and identification of virulent Yersinia ruckeri: the causative agnt of enteric redmouth disease in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) cultured in Fars Province, Iran. Iran J Vet Res. 2008;9(4):347-52.
23- Sharifiyazdi H, Akhlaghi M, Tabatabaei M, Mostafavi Zadeh SM. Isolation and characterization of Lactococcus garvieae from diseased rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) cultured in Iran. Iran J Vet Res. 2010;11(4):342-50.
24- Modarres Mousavi Behbahani SM, Akhlaghi M, Sharifiyazdi H. Phenotypic and genetic diversity of motile aeromonads isolated from diseased fish and fish farms. Iran J Vet Res. 2014;15(3):238-43.
25- Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomater. 2008;4(3):707-16.
26- Azam A, Ahmed A, Oves M, Khan MS, Memic M. Size dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. Int J Nanomed. 2012;7(1):3527-35.
27- Tsai TH, Tsai TH, Chien YC, Lee CW, Tsai PJ. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. Food Chem. 2008;110(4):859-64.
28- American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. Eaton AD, Clesceri LC, Franson MA, Rice EW, Greenberg AE, editors. Washington, D.C.: American Public Health Association; 2005.
29- Gholami Seyedkolaee SJ, Shiri N, Mirvaghefi AR, Rafiee GR, Makhdomi C. Toxicity evaluation of Malathion, Carbaryle and Glyphosate in common carp fingerlings (Cyprinus carpio, Linnaeus, 1758). J Vet Res. 2013;68(3):257-67. [Persian]
30- Scown TM, Santos EM, Johnston BD, Gaiser B, Baalousha M, Mitov S, et al. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. Toxicol Sci. 2010;115(2):521-34.
31- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for the testing of chemicals fish, acute toxicity test No. 203 section 2. Paris: OECD Publishing; 1992.
32- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Epidemiol. 1938;27(3):493-7.
33- Shiry N, Mirvaghefi A. Toxicity degree of malathion and assessment its impacts on some blood indices in caspian common carp (Cyprinus carpio, Linnaeus, 1758). Fish Sci Technol. 2014;3(2):1-11. [Persian]
34- Rezaie M, Sahebdelfar S, Yaripour F. Nanocatalysts. 1st Edition. Tehra: Academic Book Press; 2011. [Persian]
35- Shiry N, Shomali T, Soltanian S, Akhlaghi M. Comparative single-dose pharmacokinetics of orally administered florfenicol in rainbow trout (Oncorhynchus

www.SID.ir

Archive of SID

38- Mohammadbeigi P, Sodagar M, Mazandarani M, Hoseini SS. An investigation of antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Streptococcus iniae and Escheria coli. J Qum Univ Med Sci. 2016;10(5):55-63. [Persian]

39- Griffitt RJ, Hyndman K, Denslow ND, Barber DS. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. Toxicol Sci. 2009;107(2):404-15.

40- Bilberg K, Malte H, Wang T, Baatrup E. Silver nanoparticles and silver nitrate cause respiratory stress in Eurasian perch (Perca fluviatilis). Aquat Toxicol. 2010;96(2):159-65.

c

mykiss, Walbaum, 1792) at health and experimental infection with Streptococcus iniae or Lactococcus garvieae. J Vet Pharmacol Ther. 2019;42(2):214-21.

36- Veisi Malekshahi Z, Afshar D, Ranjbar R, Shirazi MH, Rezaee F, Mahjoobi R, et al. Antimicrobial effect of ZnO Nanoparticle. J Infect Trop Dis. 2012;17(59):1-4. [Persian]

37- Mollaabbas Zadeh H, Modir Roosta Sh, Reza Soltani S, Najafian M. Toxicity of ZnO, CuO and TiO2 nanoparticles on Vibrio Fiscari bacteria. 1st National Conference of Nano Sciences and Technologies, 2011 February 16-18, Yazd, Iran. Yazd: Payame Noor University Publishers; 2011. [Persian]

www.SID.ir