

تاثیر نانوذرات نقره کلئیدی بر جمعیت فلور باکتریایی روده کیپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

نیوشا نیکی^۱، روح اله رحیمی^{۲*}، فردین شالویی^۲، فرزانه نیکخواه^۳

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات، گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد

۲. استادیار گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد

۳. مربی گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد

تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۱

چکیده

استفاده از نانوتکنولوژی در حال گسترش است. قسمت اعظم نانوذرات تولیدی (۵۶٪) را نانوذرات نقره تشکیل می‌دهند. این مواد به دلیل خاصیت ضدباکتریایی خود معروف هستند. با توجه به استفاده از این مواد در مصارف صنعتی و خانگی و نیز رهايش این مواد به اکوسیستم‌های آبی در این تحقیق به بررسی تعیین غلظت کشنده میانی LC50 و تاثیر این ذرات بر فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهی پرداخته شد. بدین منظور ۸۴ عدد ماهی به مدت ۹۶ ساعت در معرض غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر نانوذرات نقره قرار گرفتند و تلفات روزانه ثبت گردید. نتایج توسط آنالیز پروبیت بررسی و ثبت گردید و غلظت کشنده میانی (LC50) محاسبه شد و در این ماهی ۰/۲۳ میلی گرم بر لیتر بدست آمد. در مرحله بعد ۸۴ عدد ماهی در ۴ تیمار (۰، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۱۱ میلی گرم بر لیتر) در ۳ تکرار قرار داده شد. بعد از طی ۱۴ روز، ۲ عدد ماهی از هر تکرار با پودر گل میخک بیهوش شده و در شرایط استریل محتویات روده آن‌ها استخراج گردید. سپس تعداد کل باکتری‌های مزوفیل و باکتری‌های اسیدلاکتیکی و انتروباکتریاسه شمارش شد. نتایج نشان داد نانوذرات نقره در غلظت‌های بررسی شده بر باکتری‌های مزوفیل و اسیدلاکتیکی و انتروباکتر فلور روده کیپور معمولی از نظر تعداد تاثیرپذیری معناداری نشان ندادند ($P > 0/05$).

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، کیپور معمولی، باکتری‌های مزوفیل، باکتری‌های اسید لاکتیکی، انتروباکتریاسه

۱. مقدمه

سلول های گناد ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (Ghobadi *et al.*, 2013). نانوذرات از طریق تخلیه پساب های صنعتی، فرسایش مواد مهندسی شده در محصولات خانگی و یا شسته شدن یا آغشته شدن تولیدات و یا دفع محصولات حاوی نقره (Benn and Westehoff, 2008) به محیط زیست وارد می شوند. مسیره های اصلی در معرض قرارگیری جانداران، سیستم تنفسی، دستگاه گوارش و پوست می باشند که رابطهای بین سیستم های داخلی بدن جاندار و محیط خارجی هستند (Chen and Schlusener, 2008). اگرچه مکانیسم فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره بر روی باکتری ها به طور کامل شناخته نشده است اما سه مکانیسم رایج که پیشنهاد می شود شامل: (۱) جذب یون های نقره آزاد و به دنبال آن اختلال در تولید ATP و همانندسازی DNA (۲) تولید ROS توسط نانوذرات نقره و یون های نقره (۳) آسیب مستقیم به غشای سلولی توسط نانوذرات نقره. Donaldson و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با معرفی علم سم شناسی نانومواد، تحولی در زمینه سم شناسی ایجاد نمودند. در تحقیقات مربوط به آلودگی های فلزات سنگین به دلیل تأثیر مستقیم آلاینده های آبی بر روی فلور باکتریایی روده ماهی، از میکروفلور روده ماهی به عنوان شاخص آلودگی در این اکوسیستم ها استفاده می شود (Mickeniene and Šyvokiene, 2008). بنابراین در این پژوهش تاثیر سمیت نانوذره نقره بر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به عنوان یک ماهی مدل جهت ارزیابی تغییرات فلور باکتریایی روده به عنوان شاخص بررسی آلودگی نانو نقره بررسی گردید.

۲. مواد و روشها

۱.۲. ماهی

در اردیبهشت ماه ۱۳۹۴ تعداد ۳۵۰ عدد بچه ماهی کپور معمولی از شرکت تعاونی مهندسی آبی گستر زنده رود در شرق اصفهان واقع در روستای مهدی آباد خریداری شد. ماهیها به آزمایشگاه شیلات دانشگاه شهرکرد منتقل شد. جهت سازگاری با شرایط جدید، ماهیها به مدت ۷ روز در دو مخزن ۱۵۰ لیتری نگهداری شدند و روزی ۲ مرتبه غذادهی شدند.

براساس تعریف سازمان ملی علوم و تکنولوژی آمریکا، نانو تکنولوژی شامل تحقیق و توسعه به منظور فهم دیدگاهها و کار با اندازه گیری و دستکاری مواد در سطح اتمی، مولکولی و فوق مولکولی می باشد. مقیاس اندازه گیری در فناوری نانو در حد ۱ الی ۱۰۰ نانومتر میباشد. در این مقیاس، ویژگیهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی مواد دارای تفاوت های بنیادی و اغلب غیر قابل انتظار با مقیاسهای کلی مواد دارد (Haghparsast and Golriz, 2008). دو مورد مهم از آنها عبارتند از: افزایش نسبت مساحت سطحی به حجم و ورود اندازه ذره به قلمرو اثرات کوانتومی. افزایش نسبت مساحت سطحی به حجم که به تدریج با کاهش اندازه ذره رخ می دهد، باعث غلبه یافتن رفتار اتم های واقع در سطح ذره به رفتار اتم های درونی می شود. این پدیده بر خصوصیات ذره در حالت انزوا و بر تعاملات آن با دیگر مواد اثر می گذارد. افزایش سطح، واکنش پذیری نانومواد را به شدت افزایش می دهد زیرا تعداد مولکول ها یا اتم های موجود در سطح در مقایسه با تعداد اتم ها یا مولکول های موجود در توده ی نمونه بسیار زیاد است، به گونه ای که این ذرات به شدت تمایل به کلوخه ای شدن دارند (Chow and Noskova, 1998; Kohler and Fritzsche, 2004). در بین فلزات طبیعی، یون های نقره دارای خواص میکروبی شدیدی علیه بسیاری از گونه های باکتریایی است. طیف گسترده خواص ضد میکروبی نقره باعث استفاده آن در فعالیتهای زیست پزشکی، تصفیه هوا و آب، تولید غذا، لوازم آرایشی، لباس و محصولات خانگی متعدد شده است. با گسترش سریع نانو تکنولوژی کاربردها گسترش یافته است و اکنون نانوذرات نقره در اکثر محصولات مصرف کنندگان استفاده می شوند (Rajeski, 2009). با گسترش استفاده از نانوذرات نقره خطر در معرض قرارگیری انسان و محیط زیست بیشتر خواهد شد. رهایش این مواد در اکوسیستم های آبی تاثیرات نامطلوبی بر جانداران آبی دارد. از جمله تغییرات بافتی آبشش ماهی گربه ماهی رنگین کمان (Razmara *et al.*, 2013)، کاهش موفقیت لقاح قزل آلاهی رنگین کمان (Johari, 2014)، تاثیر نامطلوب بر

عدد ماهی) و در ۳ تکرار قرار داده شد.

تیمار ۱: $\frac{1}{10}$ LC50 (96-h)

تیمار ۲: $\frac{1}{5}$ LC50 (96-h)

تیمار ۳: $\frac{1}{2}$ LC50 (96-h)

تیمار کنترل

از هر تکرار دو عدد ماهی به صورت تصادفی انتخاب شد و وزن و طول آن اندازه گیری گردید. محل انجام آزمایش (میز و وسیله های برش بدن ماهی) کاملاً استریل شد. سپس قسمت زیر شکم ماهی به وسیله تیغ اسکالپل از مخرج به سمت سرپوش آبششی برش داده و با پنس استریل روده ماهی خارج شد. برای به دست آوردن وزن مدفوع، ترازوی با دقت هزارم گرم در نزدیکی شعله قرار داده شد. یک پلیت استریل روی آن گذاشته شد و روده روی آن قرار داده شد. و وزن روده همراه با محتویات آن یادداشت شد. سپس روده داخل ۱۰ سی سی سرم فیزیولوژیک اتوکلاو شده انداخته شد. با استفاده از آنس محتویات روده خارج شد. سپس محتویات روده به وسیله دستگاه ورتکس درون سرم فیزیولوژیک حل شد. سپس روده خالی دوباره وزن شد. وزن به دست آمده را از وزن اولیه کم گردید تا وزن محتویات روده به دست آید.

جهت کشت باکتری های مزوفیل روده از محیط کشت نوترینت اگار (NA)، جهت کشت انتروباکترها از محیط کشت Violet Red Bile (VRBGA) و جهت کشت باکتری های اسیدلاکتیکی از محیط کشت (MRSA) deMan Rogosa and Sharpe Agar استفاده شد.

۴.۲. کشت باکتریها

از این نظر که میزان آلودگی در نمونه مورد نظر در حد بالایی قرار دارد لازم است که قبل از کشت دادن نمونه در محیط کشت آن را توسط محلول های استریل به نسبت معین رقیق نمود تا بتوان به راحتی و با دقت بیشتر آلودگی موجود در نمونه را تعیین کرد. برای به دست آوردن رقت ۱-۱۰ از نمونه (۱ یا ۵ یا ۱۰ گرم یا سی سی) از نمونه تحت شرایط استریل در لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک ریخته شده و خوب تکان داده می شود. جهت مخلوط شدن بهتر نمونه و سرم از دستگاه ورتکس استفاده

ماهیهها تحت دوره ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش غذاهای به ماهیهها قطع شد. میانگین وزن ماهی ها $22/2 \pm 2/42$ گرم و میانگین طول آن $12/17 \pm 0/61$ سانتی متر بود. برخی از شرایط فیزیوشیمیایی طول دوره آزمایش عبارتند از: دما $19/9$ ، pH $8/3$ و اکسیژن در حد اشباعیت بود.

۲.۲. نانوذرات نقره

در این پژوهش از کلوئید نانوذرات نقره (Ag-NPs) با نام تجاری نانوسید و غلظت اسمی ۴۰۰۰ میلی گرم بر لیتر که از شرکت نانونصب پارس (تهران- ایران) خریداری شده بود استفاده گردید. مشخصات این نانونقره قبلاً گزارش شده است (Johari *et al.*, 2013) بر اساس مطالعات مذکور کلوئید نانو نقره حاوی نانوذرات با غلظت واقعی 3980 میلی گرم در لیتر، پتانسیل زتای $53/33 \pm 7/86$ میلی ولت و $2/40$ pH می باشد. همچنین میانگین اندازه ذرات نانو نقره $16/6$ نانومتر می باشد.

۳.۲. آزمایش

آزمایش تعیین حد کشندگی به روش ساکن (بدون تعویض آب و بر اساس استاندارد سازمان همکاری و توسعه اقتصادی و برنامه ریزی اجرا گردید (OCED, 1992). این آزمایش شامل گروه های ۱۴ تایی در ۶ غلظت با دو تکرار در ۱۲ مخزن ۲۰ لیتری (در هر مخزن ۷ عدد ماهی) که عبارت بودند از: $0/1$ میلی گرم در لیتر نانوسید، تیمار دوم: $0/5$ میلی گرم در لیتر نانوسید، تیمار چهارم: $2/5$ میلی گرم در لیتر نانوسید، تیمار پنجم: 5 میلی گرم در لیتر نانوسید و تیمار ششم: 10 میلی گرم در لیتر نانوسید. به صورت زیر قرار گرفتند

آزمایش سمیت حاد به منظور محاسبه LC50 ۹۶ ساعته نانوذرات نقره انجام شد. درصد تلفات کلی برای هر غلظت نانوذرات نقره پس از زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در معرض قرار گیری محاسبه شد. با توجه به LC50 به دست آمده در مدت ۹۶ ساعت ۴ تیمار با ۳ تکرار انتخاب گردید. ۸۴ عدد ماهی را داخل ۱۲ مخزن ۲۰ لیتری (هر مخزن ۷

بررسی قرار گرفت. برای بررسی میزان غلظت کشنده نانوذرات نقره از آنالیز پروبیت استفاده شد. داده‌های به دست آمده از تأثیر غلظت‌های تحت کشنده نانوذرات نقره بر فلور میکروبی با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه میانگین‌ها در تمام آزمایش‌ها از آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵ استفاده شد.

۳. نتایج

در ساعات اولیه آزمایش تعیین حد کشندگی حرکات تند سرپوش آبشش و شنای تندتر و نامنظم، تجمع حول سنگ هوا و در برخی موارد بیحالی ثبت گردید. غلظت‌های میانی کشنده نانونقره کلوئیدی در جدول ۱ آورده شده است. میزان غلظت کشنده میانی در ۹۶ ساعت ۰/۲۳ میلی‌گرم در لیتر است. نتایج مرتبط به تغییرات تعداد باکتریهای مزوفیل در شکل شماره ۱ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد تفاوت معنی داری در بین گروهها وجود ندارد ($P > 0/05$). اما شکل ۲ نشان می‌دهد که تفاوت معنی دار در تعداد باکتریهای اسید لاکتیکی بین برخی از تیمارها وجود دارد. جمعیت باکتریهای اسید لاکتیکی گروه تیمار ۲ نسبت به گروه ۱ بیشتر است ($P < 0/05$) اما میان سایر گروهها تفاوتی دیده نمی‌شود.

نتایج آورده شده در شکل ۳ مرتبط به تغییرات باکتری‌های انتروباکتریاسه‌ها می‌باشد. نتایج این شکل تفاوتی را بین گروههای مختلف نشان نمی‌دهد ($P > 0/05$).

شد. برای تهیه رقت ۲-۱۰، به وسیله میکروسمپلر ۱۰۰۰ میکرو لیتری ۱ سی‌سی از محلول فوق داخل ۹ سی‌سی محیط کشت ریخته شد. این کار برای محیط کشت نوترینت آگار تا رقت ۱۰-۱۰ و برای محیط کشت‌های MRSA و VRBGA تا رقت ۵-۱۰ ادامه داده شد. در آخر از لوله آزمایش آخری ۱ سی‌سی برداشته شد تا همه لوله‌های آزمایش‌ها ۹ سی‌سی شوند. سپس این محیط کشت قبل از جامد شدن در داخل پلیت‌های استریل ریخته و درب آن بسته و برای پخش شدن در سطح پلیت به صورت ۸ حرکت داده شد. اجازه داده شد تا در دمای محیط جامد شود. سپس دمای انکوباتور را روی ۲۵ درجه تنظیم شد و به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد.

۵.۲. شمارش کلی باکتریها

شمارش کلی باکتری‌ها بر اساس پرگنه‌های رشد یافته در پلیت به صورت زیر است:

$$\text{تعداد کل باکتریها (CFU)} = \text{تعداد پرگنه‌های شمارش شده} \times \text{عکس درجه رقت}$$

$$= \frac{\text{عکس درجه رقت} \times \text{تعداد کلونی های شمارش شده}}{\text{وزن مدفوع هر نمونه}}$$

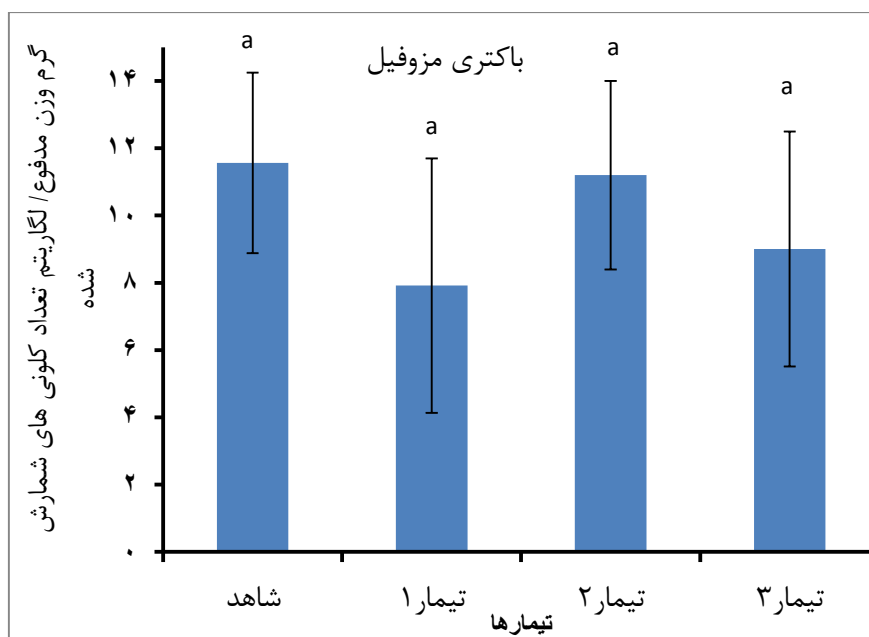
تعداد کلونی باکتری در هر گرم از مدفوع نمونه

۶.۲. تجزیه و تحلیل‌های آماری

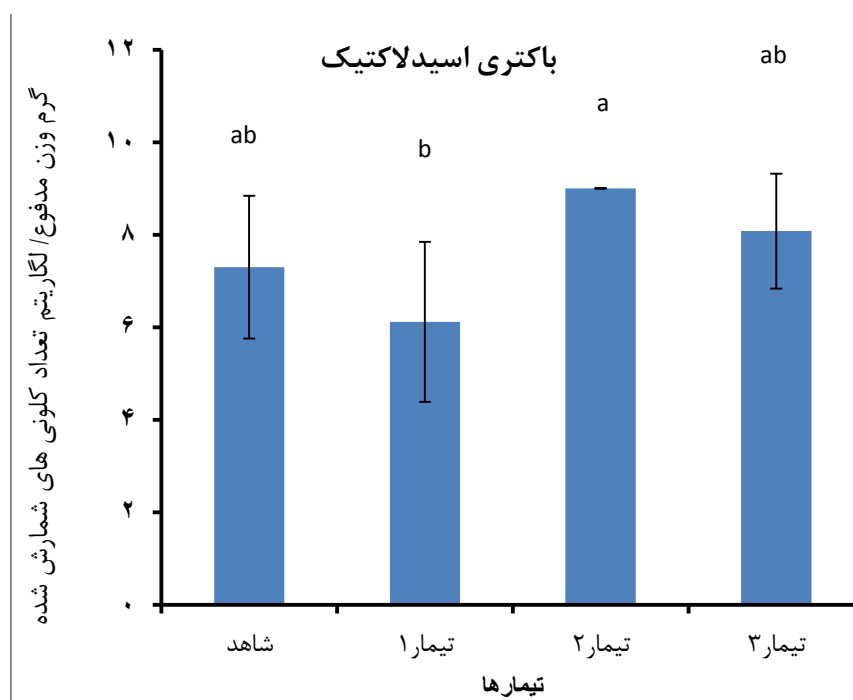
ابتدا برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف در نرم افزار مینی تب مورد

جدول ۱- غلظت‌های کشنده میانی نانوسید در زمان‌های ۲۴-۴۸ و ۷۲ و ۹۶ ساعت (غلظتها برحسب میلی گرم در لیتر است)

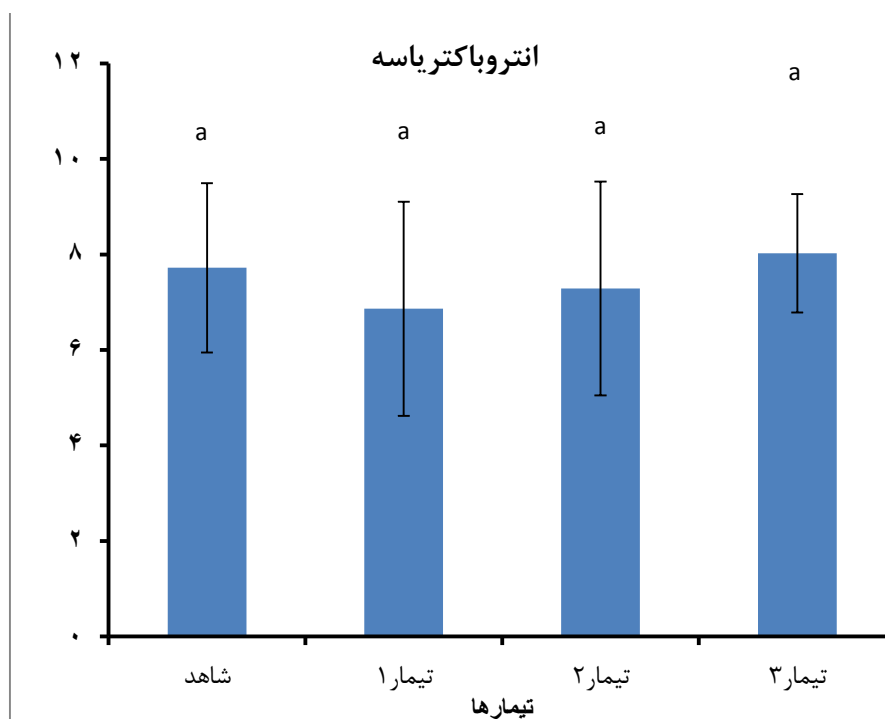
نام گونه	غلظت کشنده میانی	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
کپور معمولی	LC50	۰/۵۵	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۲۳



شکل ۱- میانگین جمعیت باکتری های مزوفیل در تیمار های مختلف (تیمارهایی که دارای حروف بالاچین مشابهی اند اختلاف معنی داری ندارند ($P > 0.05$)).



شکل ۲- میانگین جمعیت باکتری های اسیدلاکتیکی در تیمار های مختلف (تیمارهایی که دارای حروف بالاچین مشابهی اند اختلاف معنی داری ندارند ($P > 0.05$)).



شکل ۳- میانگین جمعیت انتروباکتریاسه در تیمارهای مختلف (تیمارهایی که دارای حروف بالچین مشابهی اند اختلاف معنی داری ندارند ($P > 0.05$)).

۴. بحث و نتیجه گیری

است (Wijnhoven, 2009). اما نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که این ماده در ماهی کپور بوده دارای سمیت و غلظت کشنده میانی در ۹۶ ساعت این ماده ۰/۲۳ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. مقایسه نتایج این تحقیق با تحقیقات مشابه روی ماهی‌های دیگر بیانگر حساسیت بیشتر این ماهی نسبت به سایر ماهی‌هاست. Hedayati و همکاران (۲۰۱۲) غلظت میانی کشنده نانوسید در ماهی کپور نقره‌ای را ۰/۳۴ میلی‌گرم بر لیتر و در ماهی گلدفیش ۰/۵۳ میلی‌گرم بر لیتر به دست آوردند که مقایسه نتایج نشان‌دهنده حساس تر بودن کپور معمولی نسبت به کپور نقره‌ای و گلدفیش می‌باشد. همچنین (Shahbazzadeh *et al.*, 2009) و نیز (Soltani *et al.*, 2009) غلظت کشنده میانی ۹۶ ساعته نانوسید را برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۵ میلی‌گرم بر لیتر به دست آوردند. علاوه بر این (Bar-Ilan *et al.*, 2009) سمیت نانوذرات نقره را برای جنین گورخر ماهی را بیش از

استفاده از نانوذرات نقره در صنایع مختلف رو به افزایش است و اخیراً برخی تحقیقات امکان استفاده از این مواد در آبی‌پروری را مورد بررسی قرار داده‌اند (Shahabzadeh *et al.*, و Soltani *et al.*, 2009). استفاده زیاد از مواد ضد باکتریایی مثل آنتی‌بیوتیک‌ها در آبی‌پروری به‌عنوان یک معضل در حال گسترش مطرح بوده و یافتن جایگزین‌های مناسب دغدغه متولیان این صنعت می‌باشد. نانوذرات نقره بیشتر به دلیل اثرات ضد باکتریایی خود معروف می‌باشند و اثرات ضد باکتریایی ثابت‌شده‌ای دارند (Wijnhoven, 2009). با توجه به این اثرات امکان استفاده آن‌ها در بهداشت آبزیان وجود دارد، لذا یافتن میزان و اثرات مسمومیت حاد و مزمن این مواد بر فلور طبیعی روده ماهیان بسیار ارزشمند است. هرچند در برخی از تحقیقات از سمیت نسبتاً کم نانوذرات نقره در مقایسه با سایر مواد ضد باکتریایی تأکید شده

کاهش‌های جزئی در تعداد کل باکتریهای مزوفیل در غلظت‌های مختلف مشاهده شد که این تغییرات می‌تواند ناشی از عوامل مختلفی باشد. از جمله با توجه به این که یون نقره در مواجهه با باکتری به‌عنوان یک آنتاگونیست علیه یون روی و مس عمل می‌کند (Height, 2009) و از سوی دیگر روی و مس به‌عنوان کو فاکتور نقش بسیار مهمی در عملکرد برخی از آنزیم‌ها ایفا می‌کنند (Mickeniene and Syvokiene, 2001). در نتیجه ممکن است نانوذرات نقره و یون‌های رها شده از آن به‌جای یون روی و مس عمل نموده و در نهایت به‌عنوان یک کو فاکتور آنزیمی و مهارکننده رشد اثر کرده باشند (Kalbasi et al., 2011).

از طرفی مطالعات (Ringu et al., 2000) نشان داد که استرس می‌تواند باعث حذف برخی گونه‌های اسیدلاکتیک در ماهی تیلاپیا شود. در مطالعات ما وجود نانوسیلور در آب، و در نتیجه افزایش استرس در ماهی تغییرات خاصی در تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک در روده ماهیان به وجود نیاورد. کلباسی معتقد است که فعالیت آنتاگونیسمی باکتری‌های اسیدلاکتیکی و انتروباکتریاسه می‌تواند در افزایش و کاهش تعداد آن‌ها در رابطه با یکدیگر مؤثر باشد. به‌طوری‌که افزایش نسبی باکتری‌های اسیدلاکتیک باعث کاهش تعداد انتروباکتریاسه‌ها شود. در مطالعه ما این مسئله مورد تأیید قرار نگرفت و ارتباطی بین افزایش یا کاهش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک با باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه مشاهده نگردید.

به‌طور کلی گفته می‌شود نانوذرات نقره دارای پتانسیل ضد میکروبی برای کنترل طیف وسیعی از باکتری‌ها هستند ولی ممکن است گونه‌های باکتریایی وجود داشته باشند که نانوذرات نقره توانایی کنترل رشد آن‌ها را به‌طور کامل نداشته باشند و یا تنها با به تعویق انداختن رشد و تکثیر آن‌ها به مدت طولانی از زیاده آن‌ها در محیط جلوگیری کنند (Sondi, 2004).

(Feng et al., 2000) و (Kim et al., 2007)

در مطالعات خود اظهار داشتند که اشرف‌شیا کلی در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت کم مقاومت بیشتری نسبت به حضور نانوذرات نقره دارد. دلیل مقاومت بیشتر اشرف‌شیا کلی نسبت به

۱۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش نمودند. سمیت این ماده برای ماهی کپور با افزایش غلظت و نیز افزایش زمان مجاورت افزایش یافته است که سمی بودن این ماده در ماهی را اثبات می‌کند.

در مطالعه حاضر میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل در گروه شاهد 11×10^5 CFU/g بود. در مطالعه Kalbasi و همکاران (۲۰۱۱) میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل در روده قزل‌آلای رنگین‌کمان 105×5 CFU/g بود. در مطالعات (Gonzales et al., 1991) میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل در روده قزل‌آلای رنگین‌کمان $103 \times 6/92$ CFU/g بود. علت افزایش باکتری‌های مزوفیل احتمالاً می‌تواند به دلیل تفاوت گونه‌ای است. تغییر شرایط تغذیه‌ای و محیطی می‌تواند میکرو اکوسیستم لوله گوارش ماهی را تغییر دهد. همچنین در هنگام شرایط استرس‌زا ممکن است فلور میکروبی روده تغییر کند (LeaMaster et al., 1997).

بررسی تعداد باکتری‌های مزوفیل ماهی در این تحقیق نشان داد که علی‌رغم سمیت بالای این ماده برای ماهی، در تعداد باکتری‌های مورد بررسی تغییر معناداری وجود نداشت ($P > 0/05$) که نشان‌دهنده عدم تأثیر این ماده بر روی باکتری‌های فلور روده ماهی است. همچنین یافته‌های ما با یافته‌های کلباسی و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت. آنها نشان دادند که نانوذرات نقره در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر در مدت ۱۴ روز تأثیر معناداری بر جمعیت باکتری‌های مزوفیل روده قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشت.

در مطالعات ما کل باکتری‌های مزوفیل و از میان باکتری‌های مزوفیل اختصاصاً باکتری‌های اسیدلاکتیک و انتروباکتریاسه مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که هیچ‌یک از این دو گروه باکتری نیز در برابر حضور نانوذرات نقره در محیط از نظر جمعیت تغییر معناداری نداشتند که این یافته‌ها مشابه یافته‌های کلباسی و همکاران (۲۰۱۱) در مورد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. ماهیان آب شیرین در مقایسه با ماهیان آب شور آب کمتری می‌نوشند، بنابراین میزان نانوذرات ورودی به روده ماهیان آب شیرین کمتر بوده و در نتیجه تأثیر آن نیز کاهش می‌یابد (Kalbasi et al., 2011).

این احتمال وجود دارد که با افزایش دوز نانوذرات نقره، جمعیت باکتریایی روده به طور معناداری کاهش پیدا کند.

برخی از مطالعات بیان می کنند که غلظت های کم فلزات سنگین بر روی سیستم ایمنی ماهی ها تأثیر مثبت داشته و توانایی حفاظتی آن ها را افزایش می دهد؛ بنابراین ممکن است سطح ۱ ppm نانوذرات نقره باعث افزایش ایمنی ماهی و در نتیجه کاهش جزئی باکتری های آنتروباکتریاسه شده باشد (Macfarlane *et al.*, 1986). که در مطالعات ما این مسئله تأیید نشد.

بر اساس نتایج این تحقیق و قیاس با مطالعات دیگران می توان نتیجه گیری کرد که در میان گونه های مختلف ماهیان مورد مطالعه به دلیل LC50 پایینتر کپور معمولی، این ماهیان جزء ماهیان حساس به نانوذرات نقره هستند. همچنین باکتری های مزوفیل روده و باکتری های اسیدلاکتیکی و آنتروباکتریاسه از نظر تعداد در تیمارهای تحت نانوسیلور و تیمار شاهد تفاوت معنی داری را نشان ندادند. با توجه به نتایج بدست آمده پیشنهاد می شود که اثر نانوذرات در غلظت های دیگر مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین مطالعه ای مشابه بر روی نانوذرات با اندازه های دیگر انجام گیرد.

۵. تقدیر و تشکر

از خانم ها مهندس آرزو صمصامی، مهندس سحر امینیان و مهندس مرجان اسدی و آقایان گودرز هاشمی، مهندس مهران عرب و و جناب آقای دکتر مهرداد فتح الهی مدیریت گروه شیلات دانشگاه شهرکرد که در انجام این تحقیق همکاری نمودند کمال قدردانی و تشکر می گردد.

استافیلوکوکوس اورئوس تفاوت بین ساختار غشاء باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و تفاوت در ضخامت پپتیدوگلیکان آنها است. باکتری های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس دارای پپتیدوگلیکان چندلایه و ضخیم هستند اما باکتری های گرم منفی مانند اشرشیاکلی دارای پپتیدوگلیکان نازکتری می باشند و دیواره آنها بیشتر از جنس لیپید است که آسیب پذیری کمتری در مقابل آنتی بیوتیک ها و عوامل ضد میکروبی تخریب کننده دیواره سلولی دارد. به همین دلیل مقاومت اشرشیاکلی بیشتر از استافیلوکوکوس اورئوس می باشد (Feng *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2000). اتصال یونهای نقره به پروتئینها و تغییرات ساختاری در دیواره سلولی باکتریها و غشای هسته نهایتاً منجر به مرگ باکتری می شود (Kelmani *et al.*, 2014). اما در مطالعه ما بعد از تیمار با نانوسیلور تفاوت معناداری بین تعداد باکتری های آنتروباکتریاسه گرم منفی و همچنین باکتری های اسیدلاکتیک گرم مثبت گروه تحت تیمار و گروه شاهد مشاهده نشد.

میانگین جمعیت آنتروباکتریاسه در گروه شاهد در مطالعات ما $7/4 \times 10^7$ و میانگین جمعیت آنتروباکتریاسه در روده قزل آلی رنگین کمان در مطالعات Kalbasi و همکاران $10^5 \times 3/3$ بود. با توجه به گرمایی بودن ماهی مورد مطالعه ما و سرد آبی بودن ماهیان مورد مطالعه کلباسی، این افزایش تعداد قابل توجیه می باشد. آنتروباکتریاسه ها عموماً باکتری های مزوفیلی هستند که در دمای بالای ۲۰ درجه سانتی گراد رشد بهتری از خود نشان می دهند. همچنین روند تغییرات باکتری های اسیدلاکتیک و آنتروباکتریاسه در مقایسه با گروه شاهد معنی دار نبودند؛ که ممکن است به دلایل مختلفی باشد از جمله این که دوز نانوذرات نقره در حدی نبوده است که سبب مرگ و میر باکتری های روده ای شود. در نتیجه

References

Bar-Ilan, O., Albrecht, R.M., Fako, V.E., Furgeson, D.Y., 2009. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small*, 5(16), 1897-1910.

Benn, T.M., Westerhoff, P., 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science and Technology*, 42(11): 4133-4139.

Chen, X, Schluesener, H.J. (2008) Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicology Letters*, 176, 1- 12.

- Chow, G., Noskova, N. I., 1998. Nanostructured Materials Science & Technology. Kluwar Academic Publishers, 457p.
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C.L., Kreyling, W. and Borm, P.J.A., 2004. Nanotoxicology. Occupational and Environmental Medicine, 61: 727-728.
- Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N., Kim, J.O., 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52:662-66.
- Ghobadi, M., Farahmand. H., Mirjalili, M., 2013. Study of damage induced by silver nanoparticles on rainbow trout gonadal cell lines in vitro conditions. *Journal Genetic Novin*, 8(3), 251-260.
- Gonzalez, C., Lopez-Diaz, T., Prieto, M., Otero, A., 1999. Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lusius*), and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Food Protection*. 62: 1270-1277.
- Haghparsat, A., Golriz, Y., 2008. Nanoscience in veterinary medicine: designing smart diagnosis, treatment and prevention system. The Second International Congress on Nanoscience and Nanotechnology, 1-5.
- Height, M.J., 2009. Evaluation of hazard and exposure associated with nanosilver and other nanometal oxide pesticide products. Fifra Scientific Advisory Panel (Sap) Arlington, USA.
- Hedayati, A., Kolangi, H., Jahanbakhsh, A., Shalvei, F., 2012. Evaluation of silver nanoparticles ecotoxicity in Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and Goldfish (*Carassius auratus*). *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 15(3), 172-177.
- Johari, S.A. 2013. Toxicity Effect of Colloidal Silver Nanoparticles on Fertilization Capacity and Reproduction Success of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Nanomedicine Research*, 1, 1 – 2014.
- Johari, S.A., 2011. Effect of colloidal nanosilver on fertilization efficiency in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The Second National Conference on Environmental Research, Iran.
- Kalbasi, M.R., Abdollahzadeh, A., Salarijoo, H., 2011. Effects of silver nanoparticle on bacterial flora of the intestine in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Veterinary Research*, 67(2), 181-189 (in Persian).
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J. and *et al.* 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine; Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3, 95-101.
- Kelman Chandrakanth, R., Ashajyothi, C., Kumar Oli, A., Prabhurajeshwar, C., 2014. Potential bactericidal effect of silver nanoparticles synthesised from *Enterococcus* species, *Oriental Journal of Chemistry*, 30(3), 1253-1262.
- Kohler, M., Fritzsche, W., 2004. Nanotechnology (An Introduction to Nanostructuring techniques), Wiley-VHC.
- LeaMaster, B.R., Walsh, W.A., Brock, J.A., Fujiok, R.S. 1997 Cold stress-induced changes in the aerobic heterotrophic gastrointestinal tract bacterial flora of red hybrid tilapia. *Journal of Fish Biology*, 50, 770-780.
- Macfarlane, D.R., Bullock, L.G., Mclaughlin, J.J.A., 1986. Effects of five metals on susceptibility of striped bass to *Flexibacter columnaris*. *Transactions of the American Fisheries Society*. 115:227-231.
- Mickėnienė, L., Šyvokienė, J., 2008. The impact of zinc on the bacterial abundance in the intestinal tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Ekologija*, 54(1), 5-9.
- OECD, 1992. Organization for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Fish Acute Toxicity Test, OECD 203.
- Rajeski, D., 2009. Nanotechnology and consumer products. Accessed 22 February 2010. http://www.nanotechproject.org/publications/archive/nanotechnology_consumer_product_s/.
- Ringu, E., Bendiksen, H.R., Wesmajervi, M.S., Olsen, R.E., Jansen, P.A., Mikkelsen, H., 2000. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Journal of Applied Microbiology*. 89: 317-322.
- Shahbazzadeh, D., Ahari, H., Mohammad Rahimi, N., Dastmalchi, F., Soltani, M., Fotovvat, M., Rahmanny, J and Khorasani, N. 2009. The Effects of Nanosilver (Nanocid) on Survival Percentage of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pakistan Journal of Nutrition*, 8 (8), 1178-1179.
- Soltani, M., Ghodratnema, M., Ahari, H., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Atee, M., Dastmalchi, F., 2009. The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas hydrophila*, *International Journal Of Veterinary Research*, 3: 137-142.
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275 (1), 177-182.
- Wijnhoven. S.W.P., Peijnenburg. W.J.G.M., Herberts, C.A., Hagens. W.I, Oomen. A.G., 2009. Nanosilver- A review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, *Nanotoxicology*, 3(2), 109-138.

