اشیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵

صفحات ۱۳۱-۱۲۳

تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی بر جمعیت فلور باکتریایی روده کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*)

نیوشا نیکی[۱]، روح اله رحیمی*[۲]*، فردین شالویی[۲]، فرزانه نیکوخواه[۳]

۱. دانش‌آموخته 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 دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱/۱۸

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 رهایش 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 میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات نقره قرار گرفتند و تلفات روزانه ثبت گردید. نتایج توسط آنالیز پروبیت بررسی و ثبت گردید و غلطت کشنده میانی (LC50) محاسبه شد و در این ماهی ۰/۲۳ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. در مرحله بعد ۸۴ عدد ماهی در ۴ تیمار (۰، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۱۱ میلی‌گرم 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 کپورمعمولی از نظر تعداد تاثیرپذیری معناداری نشان ندادند ($P > ۰/۰۵$).

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

* نویسنده مسئول مکاتبه

Email: rahimi@nres.sku.ac.ir

۱. مقدمه

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 ملکولی می‌باشد. مقیاس اندازه گیری در فناوری نانو در حد ۱ الی ۱۰۰ نانومتر میباشد. در این مقیاس، ویژگیهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی مواد دارای تفاوتهای بنیادی و اغلب غیر قابل انتظار با مقیاسهای کلی مواد دارد (Haghparast 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 به‌تدریج با کاهش اندازه‌ی ذره رخ می‌دهد، باعث غلبه یافتن رفتار اتم‌های واقع در سطح ذره به رفتار اتم‌های درونی می‌شود. این پدیده بر خصوصیات ذره در حالت انزوا و بر تعاملات آن با دیگر مواد اثر می‌گذارد. افزایش سطح، واکنش‌پذیری نانومواد را به‌شدت افزایش می‌دهد زیرا تعداد مولکول‌ها یا اتم‌های موجود در سطح در مقایسه با تعداد اتم‌ها یا مولکول‌های موجود در توده‌ی نمونه بسیار زیاد است، به‌گونه‌ای که این ذرات به‌شدت تمایل به کلوخه‌ای شدن دارند (Chow and Noskova, 1998; Kohler and Fritzsche, 2004). در بین فلزات طبیعی، یون‌های نقره دارای خواص میکروبی شدیدی علیه بسیاری از گونه‌های باکتریایی است. طیف گسترده خواص ضد میکروبی نقره باعث استفاده آن در فعالیت های زیست پزشکی، تصفیه هوا و آب، تولید غذا، لوازم آرایشی، لباس و محصولات خانگی متعدد شده است. با گسترش سریع نانوتکنولوژی 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 اکوسیستمهای آبی تاثیرات نامطلوبی بر جانداران آبزی آن دارد. از جمله تغییرات بافتی آبشش ماهی گربه ماهی رنگین کمان (Razmara *et al*., 2013)، کاهش موفقیت لقاح قزل آلای رنگین کمان(Johari, 2014)، تاثیر نامطلوب بر سلول های گناد ماهی قزل آلای 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 می‌شوند. مسیرهای 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 سم‌شناسی نانومواد، تحولی درزمینه سم‌شناسی ایجاد نمودند. در تحقیقات مربوط به آلودگی‌های فلزات سنگین به دلیل تأثیر مستقیم آلاینده‌های آبی بر روی فلور باکتریایی روده ماهی، از میکروفلور روده ماهی به عنوان شاخص آلودگی در این اکوسیستم‌ها استفاده می‌شود (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 آبزی گستر زنده‌رود در شرق اصفهان واقع در روستای مهدی‌آباد 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.

ماهیها تحت دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش غذادهی به ماهیها قطع شد. میانگین وزن ماهی‌ها 2/42 ± ۲۲/۲ گرم و میانگین طول آن ۱۲/۱۷ ±0/61 سانتی‌متر بود. برخی از شرایط فیزکوشیمیایی طول دوره آزمایش عبارتند از: دما ۱۹/۹، pH ۸/۳ و اکسیژن درحد 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 قبلا گزارش شده است (Johari *et al*., 2013) بر اساس مطالعات مذکور کلوئید نانو نقره حاوی نانوذرات با غلظت واقعی ۳۹۸۰ میلی گرم در لیتر، پتانسیل زتای ۷/۸۶ ± ۵۳/۳۳ میلی ولت و pH ۲/۴۰ می‌باشد. همچنین میانگین اندازهٔ ذرات نانو نقره ۱۶/۶ نانومتر می‌باشد.

۳.۲. آزمایش

آزمایش تعیین حد کشندگی به روش ساکن (بدون تعویض آبف و بر اساس استاندارد سازمان همکاری و توسعه اقتصادی و برنامه ریزی اجرا گردید (OCED, 1992). این آزمایش شامل گروه‌های ۱۴ تایی در ۶ غلظت با دو تکراردر ۱۲ مخزن ۲۰ لیتری (در هر مخزن ۷ عدد ماهی) که عبارت بودند از: ۰/۱ میلی گرم در لیتر نانوسید، تیمار دوم: ۰/۵ میلی گرم در لیتر نانوسید، تیمار سوم: ۱ میلی گرم در لیتر نانوسید، تیمار چهارم: ۲/۵ میلی گرم در لیتر نانوسید، تیمار پنجم: ۵ میلی گرم در لیتر نانوسید و تیمار ششم: ۱۰ 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 زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در معرض قرار گیری محاسبه شد. با توجه به LC50 به‌دست‌آمده در مدت ۹۶ ساعت ۴ تیمار با ۳ تکرار انتخاب گردید. ۸۴ عدد ماهی را داخل ۱۲ مخزن ۲۰ لیتری (هر مخزن ۷ عدد ماهی) و در ۳ تکرار قرار داده شد .

تیمار۱: $\frac{1}{10}$ 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 به‌صورت تصادفی انتخاب شد و وزن و طول آن اندازه‌گیری گردید. محل انجام آزمایش (میز و وسیله‌های برش بدن ماهی) کاملاً استریل شد. سپس قسمت زیر شکم ماهی به‌وسیله 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 قرارداده شد. یک پلیت استریل روی آن گذاشته شد و روده روی آن قرارداده شد. و وزن روده همراه با محتویات آن یادداشت شد. سپس روده داخل ۱۰ سی‌سی سرم فیزیوژیک اتوکلاو شده انداخته شد. با استفاده از آنس محتویات روده خارج شد. سپس محتویات روده به‌وسیله دستگاه ورتکس درون سرم فیزیولوژیک حل شد. سپس روده خالی دوباره وزن شد. وزن به‌دست‌آمده را از وزن اولیه کم گردید تا وزن محتویات روده به دست آید.

جهت کشت باکتری‌های مزوفیل روده از محیط کشت نوترینت اگار (NA)، جهت کشت انتروباکتر ها از محیط کشت (VRBGA) Violet Red Bile Glucose Agar و جهت کشت باکتری‌های 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 محلول‌های استریل به نسبت معین رقیق نمود تا بتوان به‌راحتی 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 سی‌سی) از نمونه تحت شرایط استریل در لوله‌آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک ریخته شده و خوب تکان داده می شود. جهت مخلوط شدن بهتر نمونه و سرم از دستگاه ورتکس استفاده

شـد. برای تهیه رقت ۲-۱۰، به‌وسـیله میکروسـمپلر ۱۰۰۰ میکرو لیتری ۱ سـی‌سی از محلول فوق داخل ۹ سـی‌سـی محیط کشـت ریخته شـد. این کار برای محیط کشـت نوترینـت آگار تا رقت ۱۰-۱۰ و برای محیط کشت‌های MRSA و VRBGA تا رقت۵-۱۰ ادامه داده شد. در آخر از لوله‌آزمایش آخری ۱ سی‌سی برداشـته شـد تا همه لوله‌آزمایش‌ها ۹ سی‌سی شوند. سـپس این محیط کشت قبل از جامد شدن در داخل پلیت‌های اسـتریل ریخته و درب آن بسـته و برای پخش شـدن در سـطح پلیت به صورت 8 حرکت داده شـد. اجازه داده شـد تا در دمای محیط جامد شـود. سـپس دمای انکوباتور را روی ۲۵ درجه تنظیم شـد و به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد.

۵.۲. شمارش کلی باکتریها

شـمارش کلی باکتری ها بر اساس پرگنه‌های رشد یافته در پلیت به‌صورت زیراست :

تعداد کل باکتریها (CFU) = تعداد پرگنه‌های شمارش شده × عکس درجه رقت

$$= \frac{\text{عکس درجه رقت} \times \text{تعداد کلونی های شمارش شده}}{\text{وزن مدفوع هر نمونه}} \times 1000$$

تعداد کلونی باکتری در هر گرم از مدفوع نمونه

۶.۲. تجزیه و تحلیلهای آماری

ابتدا برای بررسـی نرمال بودن داده ها از آزمون کولموگراف-اسـمیرنوف در نرم‌افزار مینی تـب مورد بررسـی قرار گرفت. برای بررسی میزان غلظت کشنده نانوذرات نقره از آنالیز پروبیت اسـتفاده شـد. داده‌های به‌دست‌آمده از تأثیر غلظت‌های تحت کشنده نانوذرات نقره بر فلور میکروبی با اسـتفاده از آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شـدند. برای مقایسه میانگین‌ها در تمام آزمایش‌ها از آزمون توکی در سـطح احتمال ۵٪ استفاده شد.

۳. نتایج

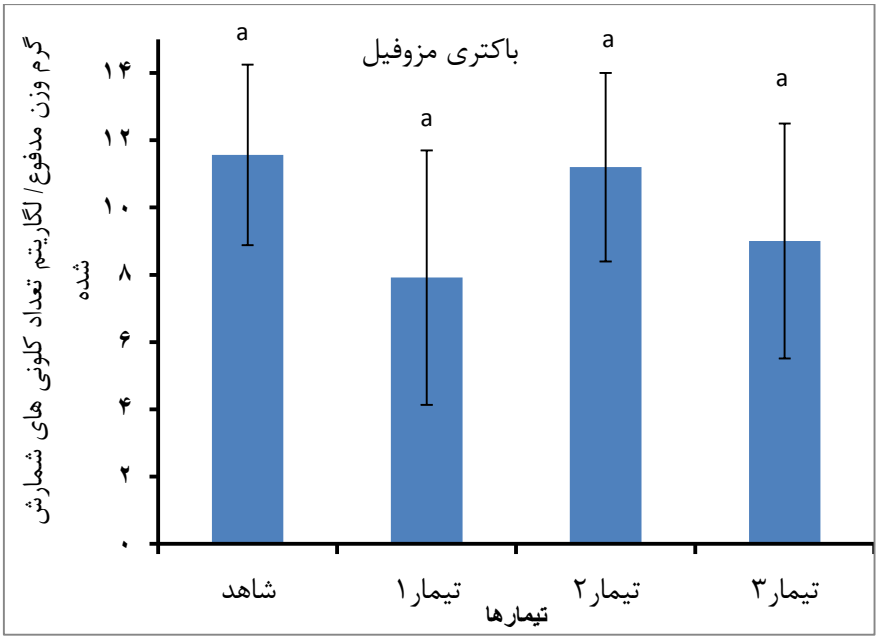
در سـاعات اولیه آزمایش تعیین حد کشـندگی حرکات تند سـرپوش آبشـش و شنای تندترو نامنظم، تجمع حول سـنگ هوا و در برخی موارد بیحالی ثبت گردید. غلظتهای میانی کشـنده نانونقره کلوئیدی در جدول ۱ آورده شـده اسـت. میزان غلظت کشـنده میانی در ۹۶ ساعت ۰/۲۳ میلی‌گرم در لیتر است.

نتـایج مرتبط بـه تغییرات تعـداد بـاکتریهـای مزوفیل در شـکل شـماره ۱ آورده شـده اسـت. نتایج نشان می‌دهد تفاوت معنی داری دربین گروهها وجود ندارد ($P > ۰/۰۵$). اما شـکل ۲ نشـان می‌دهد که تفاوت معنی دار در تعداد باکتریهای اسـید لاکتیکی بین برخی از تیمـارها وجود دارد. جمعیت باکتریهای اسـیدلاکتیکی گروه تیمـار ۲ نسـبت بـه گروه ۱ بیشـترست ($P < ۰/۰۵$) اما میان سایر گروهها تفاوتی دیده نمی شود.

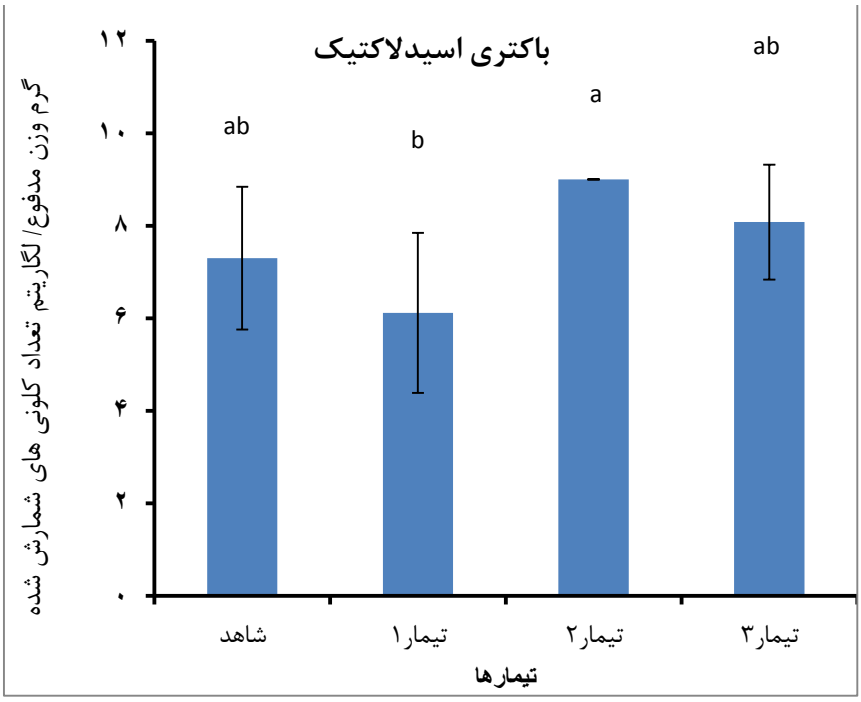
نتایج آورده شده در شکل ۳ مرتبط به تغییرات باکتری‌های انتروباکتریاسـه ها می‌باشـد. نتایج این شـکل تفاوتی را بین گروههای مختلف نشان نمی‌دهد ($P > ۰/۰۵$).

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

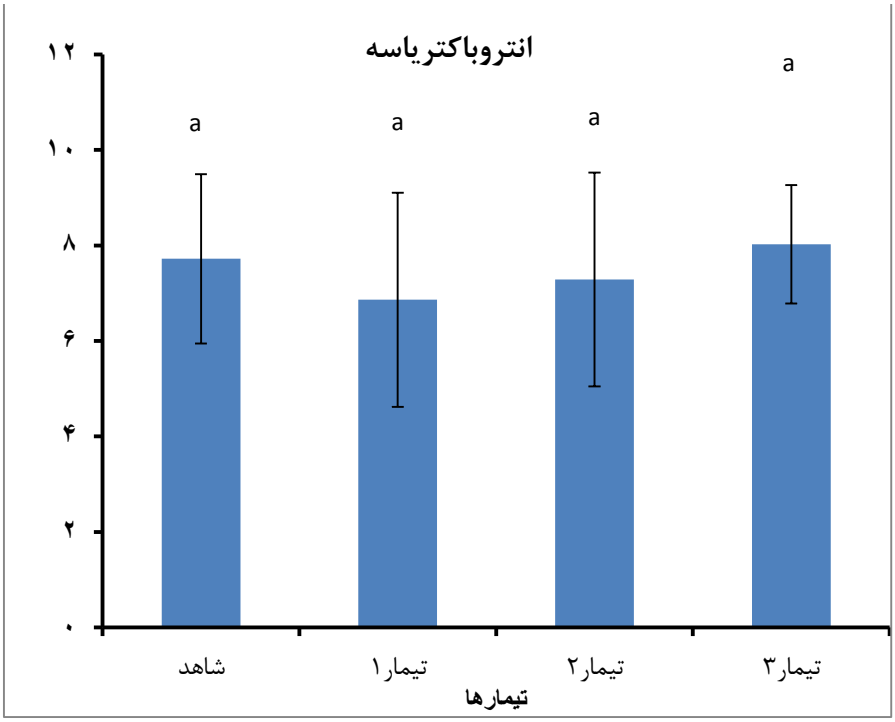
نام گونه	غلظت کشنده میانی	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
کپور معمولی	LC50	۰/۵۵	۰/۲۳	۰/۲۳	۰/۲۳



شکل ۱- میانگین جمعیت مختلف باکتری های مزوفیل در تیمار های مختلف (تیمارهایی که دارای حروف بالاچین مشابهی اند اختلاف معنی داری ندارند (P > ۰/۰۵).



شکل ۲- میانگین جمعیت باکتری های اسیدلاکتیکی در تیمارهای مختلف (تیمارهایی که دارای حروف بالاچین مشابهی اند اختلاف معنی داری ندارند (P > ۰/۰۵).



شکل۳- میانگین جمعیت انتروباکتریاسه در تیمارهای مختلف (تیمارهایی که دارای حروف بالاچین مشابهی اند اختلاف معنی داری ندارند (P > ۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از نانوذرات نقره در صنایع مختلف رو به افزایش است و اخیراً برخی تحقیقات امکان استفاده از این مواد در آبزی‌پروری را مورد بررسی قرار داده‌اند (Soltani *et al.*, 2009 و Shahabzadeh *et al.*, 2009). استفاده زیاد از مواد ضد باکتریایی مثل آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری به‌عنوان یک معضل در حال گسترش مطرح بوده و یافتن جایگزین های 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 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 حساس‌تر 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

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

در مطالعه حاضر میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل در گروه شاهد CFU/g ۱۱ ۱۰ ×۵ بود. در مطالعه Kalbasi و همکاران (۲۰۱۱) میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل در روده قزل‌آلای رنگین‌کمان CFU/g ۱۰۵ × ۵ بود. در مطالعات (Gonzales *et al*., 1991) میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل در روده قزل‌آلای رنگین‌کمان CFU/g ۱۰۳ × ۶/۹۲ بود. علت افزایش باکتری‌های مزوفیل احتمالاً می‌تواند به دلیل تفاوت گونه ای 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 ($P > ۰/۰۵$) که نشان‌دهنده عدم تأثیر این ماده بر روی باکتری های 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 ازنظر 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 آب‌شور آب کمتری می‌نوشند، بنابراین میزان نانوذرات ورودی به روده ماهیان آب شیرین کمتر بوده و درنتیجه تأثیر آن نیز کاهش می‌یابد (Kalbasi *et al*., 2011).

کاهشهای جزئی در تعداد کل باکتریهای مزوفیل در غلظت‌های مختلف مشاهده شد که این تغییرات می‌تواند ناشی از عوامل مختلفی باشد. ازجمله با توجه به این‌که یون نقره در مواجه با باکتری به‌عنوان یک انتاگونیست 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 Šyvokiene, 2001). درنتیجه ممکن است نانوذرات نقره و یون‌های رهاشده از آن به‌جای یون روی و مس عمل نموده و درنهایت 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 درنتیجه 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 انتروباکتریاسه ها 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.

به‌طورکلی 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 ازدیاد آن‌ها در محیط جلوگیری کنند (Sondi, 2004).

Feng *et al*., (2000) و Kim *et al*., 2007) در مطالعات خود اظهار داشتند که اشرشیا کلی در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت کم مقاومت بیشتری نسبت به حضور نانوذرات نقره دارد. دلیل مقاومت بیشتر اشرشیاکلی نسبت به

استافیلوکوکوس اورئوس تفاوت بین ساختار غشاء باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی و تفاوت در ضخامت پپتیدوگلیکان آنها است. باکتریهای گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس دارای پپتیدوگلیکان چندلایه و ضخیم هستند اما باکتریهای گرم منفی مانند اشرشیاکلی دارای پپتیدوگلیکان نازکتری می‌باشند و دیواره آنها بیشتر از جنس لیپید است که آسیب‌پذیری کمتری در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل ضدمیکروبی تخریب‌کننده دیواره سلولی دارد. به همین دلیل مقاومت اشرشیاکلی بیشتر از استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد (Feng *et al*., 2000; Kim *et al*., 2007). اتصال یونهای نقره به پروتئینها و تغییرات ساختاری در دیواره سلولی باکتریها و غشای هسته نهایتاً منجر به مرگ باکتری می‌شود (Kelmani *et al*., 2014). اما در مطالعه ما بعد از تیمار با نانوسیلور تفاوت معناداری بین تعداد باکتریهای انتروباکتریاسه گرم منفی و همچنین باکتریهای اسیدلاکتیک گرم مثبت گروه تحت تیمار و گروه شاهد مشاهده نشد.

میانگین جمعیت انتروباکتریاسه در گروه شاهد در مطالعات ما ۱۰۷× ۷/۴ و میانگین جمعیت انتروباکتریاسه در روده قزل‌آلای رنگین‌کمان در مطالعات Kalbasi و همکاران ۱۰۵ × ۳/۳ بود. با توجه به گرمابی بودن ماهی موردمطالعه ما و سرد آبی بودن ماهیان موردمطالعه کلباسی، این افزایش تعداد قابل توجیه می‌باشد. انتروباکتریاسه ها عموماً باکتری‌های مزوفیلی هستند که در دمای بالای ۲۰ درجه سانتی‌گراد رشد بهتری از خود نشان می‌دهند.

همچنین روند تغییرات باکتریهای اسیدلاکتیک و انتروباکتریاسه در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبودند؛ که ممکن است به دلایل مختلفی باشد ازجمله این‌که دوز نانوذرات نقره در حدی نبوده است که سبب مرگ‌ومیر باکتری‌های روده‌ای شود. درنتیجه این احتمال وجود دارد که با افزایش دوز نانوذرات نقره، جمعیت باکتریایی روده به‌طور معناداری کاهش پیدا کند.

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

براساس نتایج این تحقیق و قیاس با مطالعات دیگران می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در میان گونه‌های مختلف ماهیان موردمطالعه به دلیل LC50 پایینتر کپور معمولی، این ماهیان جزء ماهیان حساس به نانوذرات نقره هستند. همچنین باکتری‌های مزوفیل روده و باکتری‌های اسیدلاکتیکی و انتروباکتریاسه ازنظر تعداد در تیمارهای تحت نانوسیلور و تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری 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 وآقایان گودرز هاشمی، مهندس مهران عرب و و جناب آقای دکتر مهرداد فتح االهی مدیریت گروه شیلات دانشگاه شهرکرد که در انجام این تحقیق همکاری نمودند کمال قدردانی و تشکر می‌گردد.

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 (*Onchorhynchus mykiss*). Journal of Food Protection. 62: 1270-1277.

Haghparast, 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., Shaluei, F., 2012. Evaluation of silver nano particles ecotoxicity in Silver carp (*Hypophthalmicthys 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 florae 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 silvernanopaticles. *Nanomedicine; Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3, 95-101.

Kelmani 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_products/.

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., Rahmannya, 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 pathogene, 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.