

تأثیر نانو ذرات نقره کلئیدی بر جمعیت فلور باکتریایی روده ماهی قزل آلالی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

محمد رضا کلباسی^{۱*} اسماعیل عبدالله زاده^۲ حمید سالاری جو^۲

(۱) گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور - ایران.

(۲) دانش آموخته گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور - ایران.

(دریافت مقاله: ۹ آبان ماه ۱۳۹۰، پذیرش نهایی: ۱۰ بهمن ماه ۱۳۹۰)

چکیده

زمینه مطالعه: با توسعه روزافزون نانو تکنولوژی نگرانی‌های زیادی در خصوص خطرات احتمالی رهایش مواد محتوی ذرات نانو به محیط زیست بوجود آمده است. بطوریکه رهایش این مواد به اکوسیستم‌های آبی می‌تواند تأثیرات نامطلوبی روی زیست‌مندان آنها به همراه داشته باشد. نانو ذرات نقره به دلیل خصوصیات ویژه ضد میکروبی خود، ۵۶٪ از نانو مواد تولید شده را در سطح جهان به خود اختصاص می‌دهند. هدف: بررسی اثر نانو ذرات نقره کلئیدی، بر فلور باکتریایی روده ماهی قزل آلالی رنگین کمان است. روش کار: ابتدا با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی پلاسمای جفت شده القایی (Zetasizer, ICP) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) کیفیت نانو ذرات نقره مورد استفاده ارزیابی گردید و سپس این آزمایش بر روی ماهیان ۲۵ گرمی که به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت‌های ۱ mg/L و صفر نانو ذرات نقره قرار گرفتند، انجام پذیرفت. سپس تعداد باکتری‌های مزوفیل، سرمادوست، انتروباکتریاسه و باکتری‌های اسید لاکتیک روده ماهیان و همچنین باکتری‌های سرمادوست و مزوفیل آب آکواریوم‌ها به روش کشت آمیخته مورد شمارش قرار گرفت. نتایج: باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)، مزوفیل و انتروباکتریاسه روده ماهیان و همچنین باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست آب آکواریوم‌ها از لحاظ آماری تأثیر پذیری معنی داری در برابر نانو ذرات نقره از خود نشان ندادند. با این وجود تفاوت آشکاری در اندازه و رنگ کلنی‌های سرمادوست آب وجود داشت که نشان دهنده تغییر فلور باکتریایی آب است. روده ماهیان در تیمار ۱ ppm نانو ذرات نقره جمعیت سرمادوست بیشتری ($6/49 \pm 0/2 \log \text{ cfu/g}$) نسبت به گروه شاهد ($5/72 \pm 0/17 \log \text{ cfu/g}$) داشتند ($p < 0/05$). نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به اینکه باکتری‌های سرمادوست نسبت به تیمار نانو ذرات نقره حساسیت پذیری معنی داری داشته‌اند ($p < 0/05$)، احتمالاً می‌توان از آنها به عنوان شاخصی در پایش رهایش و حضور نانو ذرات نقره در اکوسیستم‌های آبی بهره برد.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات نقره، رهایش، فلور باکتریایی روده، قزل آلالی رنگین کمان، اکوسیستم آبی.

نمایند. همچنین در برخی از بررسی‌ها به قطعه قطعه شدن کروموزوم‌ها، شکسته و اکسید شدن مولکول‌های DNA، موتاسیون نقطه‌ای در موجودات آبی اشاره شده است (۱۶،۲۱،۲۷،۳۴). در این راستا اکوتوکسیکولوژی نانو مواد در اکوسیستم‌های آبی زمینه تحقیقاتی نسبتاً جدیدی می‌باشد که توجه محققین را به خود جلب کرده است (۴). به خاطر خواص ویژه ضد میکروبی نانو نقره اخیراً توجه زیادی به تولید این محصول شده است. به طوری که ۵۶٪ نانو مواد تولید شده در سطح جهان را نانو ذرات نقره به خود اختصاص می‌دهد (۱۵،۱۸،۳۲).

در مطالعات مختلف مکانیسم‌های متفاوتی برای عملکرد ضد باکتریایی نانو ذرات نقره بیان شده است. این نانو ذرات با تولید رادیکال‌های اکسیژن (ROS) در داخل و بیرون از سلول باکتریایی، اختلال در تنظیم اسمزی، ممانعت از تکثیر و تزیاید DNA، اکسیداسیون اسیدهای چرب، تخریب لیپوپولی ساکاریدها، آسیب به کلاسترهای سولفور آهن - کوفاکتور فعالیت‌های آنزیمی - نهایتاً منجر به مرگ سلول باکتریایی می‌شود (۱۴،۳۱).

مطالعات انجام شده توسط Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۲۸،۲۹) نشان می‌دهد که نانو ذرات نقره می‌تواند باکتری‌های بیماری‌زای ماهی از

مقدمه

فن آوری نانو، شناخت و کنترل مواد در ابعاد بین ۱ nm تا ۱۰۰ nm است. در این ابعاد خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی ماده غیر طبیعی است و این موضوع باعث می‌شود تا نانو مواد در زمینه‌های مختلف کاربردهای جدید و منحصر به فردی پیدا کنند (۱۱، ۱۰، ۷).

طی سال‌های اخیر فناوری نانو در ایران و کشورهای مختلف جهان وارد عرصه‌های مختلف علمی و صنعتی شده است. جدا از مسائل زیست محیطی این فناوری به سرعت رو به گسترش است. بطوریکه پیش بینی می‌شود تا سال ۲۰۱۴ بیش از ۱۵٪ محصولات موجود در بازارهای جهانی به نوعی از این تکنولوژی استفاده خواهند نمود (۵).

با توسعه روزافزون این فن آوری نگرانی‌ها در رابطه با خطرات احتمالی رهایش مواد محتوی ذرات نانو به محیط زیست رو به افزایش است. رهایش این مواد به اکوسیستم‌های آبی ممکن است روی زیست‌مندان آنها تأثیرات نامطلوبی را به همراه داشته باشد (۱،۳). در برخی از مطالعات نشان داده شده که نانو مواد مهندسی ساز می‌توانند در محیط‌های آبی با از بین بردن باکتری‌های نیتریفیکانت، چرخه طبیعی این اکوسیستم‌ها را مختل



از آب کلرزدایی شده توسط تیوسولفات سدیم و هوادهی شدید استفاده شد. در طی دوره آزمایش شاخص های فیزیکی و شیمیایی آب آکواریوم مورد سنجش قرار گرفت. به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، ماهیان به مدت یک هفته در مخازن ۳۰۰L آب شیرین نگهداری و در این مدت با غذای تجاری ساخت کارخانه چینه تغذیه شدند. ۴۸ ساعت قبل از شروع آزمایشات، غذادهی به ماهیان قطع گردید تا از جذب نانوذرات به مواد غذایی و مدفوع ماهیان جلوگیری به عمل آید (۲۰، ۳۳). در آزمایش مقدماتی محدوده کشندگی نانوذرات نقره برای ماهی قزل آلائی رنگین کمان غلظت ۱ ppm تعیین گردید و با انتخاب گروه شاهد ماهیان در مجموع به مدت ۴ روز در آکواریوم هایی که حاوی ۳۰L آب بودند (در سه تکرار) در معرض غلظت مذکور قرار گرفتند. این آزمایش مطابق روش های استاندارد سازمان OECD و تحت شرایط ساکن - تجدید (renewal-Static) انجام پذیرفت. به طوریکه آب آکواریوم ها هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض و دوز نانونقره مد نظر مجدداً در مخازن تنظیم می شد (۲۰).

آزمایشات میکروبی روده و آب: برای این منظور ۵ ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی انتخاب گردید. به منظور شمارش باکتری های روده، سطح پوست ماهیان با الکل ضد عفونی کرده و مقدار اضافی الکل باقیمانده سوزانده شد و با کمک پنس و قیچی استریل روده ماهیان بدون تماس با سطح بیرونی ماهی جداسازی گردید. از نمونه های روده میزان ۱g برداشته شد و همراه با ۹mL سرم فیزیولوژی استریل ۰/۸۵٪ به مدت ۲ دقیقه هموزن گردید. جهت شمارش باکتری های روده از مخلوط مذکور رقت های سریالی اعشاری (۱:۱۰) تهیه گردید. همچنین جهت بررسی باکتری های آب، پس از نمونه برداری از آب موجود در آکواریوم های شاهد و تیمار ۱ppm، رقت های اعشاری تهیه شد (۸).

تهیه محیط های کشت، انکوباسیون و شمارش باکتری: جهت شمارش کل باکتری های مزوفیل و باکتری های سرمادوست در روده و آب، از محیط کشت Plate count agar (Merk) استفاده شد. بعد از ساخت محیط کشت، ۰/۱mL از نمونه های هموزن شده به روش pour plate کشت داده شد. شمارش پلیت های کشت داده شده برای باکتری های مزوفیل روده و آب پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C و شمارش باکتری های سرمادوست روده و آب پس از ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۷°C انجام پذیرفت (۲، ۸). جهت شمارش انتروباکتریاسه از محیط کشت Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (Merk) استفاده شد. ۰/۱mL نمونه های تهیه شده بر روی این محیط به روش pour plate کشت داده شد. پس از افزودن محیط کشت و هم زدن، پلیت ها را در دمای آزمایشگاه نگه داشته تا خنک شوند. آنگاه دوباره ۱۰mL محیط کشت بر روی لایه اول ریخته شد. پلیت های کشت داده شده بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C شمارش شدند. کلنی های با هاله صورتی به عنوان انتروباکتریاسه در نظر گرفته شد (۲، ۸). جهت شمارش باکتری های اسید لاکتیک از محیط کشت (Schartau, Chemie, Spain)

جمله سویه های *Lactococcus garvieae*، *Streptococcus iniae* و *Yersinia ruckeri* و همچنین *Aeromonas hydrophila* و *Saprolegnia* که در دوره انکوباسیون تخم ماهی موجب تلفات می شود، رابه میزان زیادی کنترل کند.

در تحقیقات مربوط به آلودگی های فلزات سنگین به دلیل تاثیر مستقیم آلاینده های آبی بر روی فلور باکتریایی روده ماهی، از میکرو فلور روده ماهی به عنوان شاخص آلودگی در این اکوسیستم ها استفاده می شود (۶، ۱۷، ۲۴). اما با مطالعاتی که انجام پذیرفت مشخص گردید که تاکنون در مورد اثرات نانوذرات نقره بر فلور جمعیت باکتریایی روده ماهی مطالعه ای صورت نپذیرفته است. در سال های اخیر عرضه فرآورده های حاصل از فناوری نانو بویژه نانوذرات نقره (بصورت انواع فیلترها، البسه، ظروف پلاستیکی، انواع رنگ ها و غیره) در ایران رو به افزایش بوده است. با توجه به رهایش احتمالی نانوذرات و ورود آنها به طبیعت و بالطبع حضور و ترکیب آنها با مواد آلی موجود در اکوسیستم های آب شیرین، (که بیشترین اثرات مضر نانوذرات در اینگونه محیط ها ایجاد خواهد گردید)، امکان تغذیه ماهیان از نانوذرات رهایش یافته متصور می باشد. لذا با عنایت به فقدان اطلاعات در خصوص عملکرد نانوذرات نقره بر تغییرات میکرو فلور باکتریایی دستگاه گوارش آبزیان، این تحقیق با هدف امکان سنجی بررسی تغییرات فلور باکتریها به عنوان شاخص حضور آلودگی ناشی از نانوذرات در اکوسیستم های آبی بر روی ماهی قزل آلائی رنگین کمان - به عنوان یک مدل در مطالعات اکوتوکسیکولوژیک - انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

نانو ذرات نقره: در این آزمایش از کلونید نانوذرات نقره (Ag-NPs) با نام تجاری Nanocid و غلظت اسمی ۴۰۰mg/L که از شرکت نانو نصب پارس (تهران - ایران) خریداری شده بود، استفاده گردید. کلونید مذکور توسط سازمان ثبت اختراعات ایالات متحده آمریکا با شماره ۲۰۰۹۰۱۳۸۲۵ به ثبت رسیده است (۲۳). برای اطمینان از کیفیت نانوذرات نقره خریداری شده، پیش از شروع این آزمایش، برخی خواص آن مورد سنجش قرار گرفت. میزان بار سطحی یا پتانسیل زتا و اندازه ذرات موجود در کلونید نانوذرات نقره توسط دستگاه Zetasizer (Instruments Inc, UK, Model: 3000HSa Malvern) اندازه گیری شد. همچنین غلظت واقعی نقره موجود در کلونید نانوذرات نقره، توسط روش طیف سنجی اتمی نشری پلاسمای جفت شده القایی (ICP-AES, Model: 3410 ARL, Switzerland) تعیین گردید. شکل و اندازه نانوذرات نقره در حالت خشک نیز با بررسی تصویر میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM) تعیین شد.

شرایط نگهداری ماهی: تعداد ۹۰ عدد ماهی قزل آلائی رنگین کمان با میانگین وزنی ۲۵g از مزارع پرورشی خریداری و به آزمایشگاه تحقیقات آبزیان دانشکده علوم دریایی تربیت مدرس منتقل گشت. در این تحقیق



کلونیدی باغلظت ۱ ppm در نمودار نشان داده شده است. میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل در روده گروه شاهد $6/31 \pm 0/75 \log \text{cfu/g} \pm \text{SD}$ بود. نتایج حاصل از آنالیزهای آماری حاکی از عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین جمعیت باکتریایی مزوفیل روده ماهیان در تیمارهای نانو ذرات نقره و گروه شاهد بود ($p < 0/05$). میانگین جمعیت باکتری‌های سرمادوست در روده گروه شاهد در حد $5/72 \pm 0/17 \log \text{cfu/g} \pm \text{SD}$ بود. روده ماهیان در تیمار ۱ ppm نانو ذرات نقره به طور معنی‌داری جمعیت سرمادوست بیشتری $6/49 \pm 0/02 \log \text{cfu/g} \pm \text{SD}$ نسبت به گروه شاهد داشتند ($p < 0/05$).

میانگین تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسه و باکتری‌های لاکتیک اسید در روده ماهیان مورد آزمایش در نمودار ۲ نشان داده شده است. اگرچه میانگین تعداد باکتری‌های انتروباکتریاسه ($5/43 \pm 0/01 \log \text{cfu/g}$) در تیمار ۱ ppm نسبت به گروه شاهد ($5/57 \pm 0/75 \log \text{cfu/g}$) کمتر شد، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p < 0/05$). میانگین جمعیت باکتری‌های لاکتیک اسید در روده گروه شاهد در حد $2/15 \pm 0/21 \log \text{cfu/g}$ تشخیص داده شد. میانگین باکتری‌های LAB در گروه‌های شاهد ($2/15 \pm 0/21 \log \text{cfu/g} \pm \text{SD}$) و تیمار ($1/72 \pm 0/36 \log \text{cfu/g} \pm \text{SD}$) از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند که این نتایج مشابه باکتری‌های انتروباکتریاسه بود ($p < 0/05$).

همچنین میانگین جمعیت باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست موجود در آب گروه شاهد به ترتیب در حد $3/67 \pm 0/05 \log \text{cfu/mL}$ و $4/17 \pm 0/05$ تعیین شد (نمودار ۳).

میانگین تعداد باکتری‌های سرمادوست و مزوفیل آب در گروه‌های شاهد و تیمار ۱ ppm از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p < 0/05$). کلنی‌های باکتریایی سرمادوست تشکیل شده بر روی پلیت در تصویر ۳ نشان داده شده است.

بحث

روده ماهیان تا قبل از هج شدن تقریباً استریل است اما به مجرد هج شدن تخم ماهی و تماس لارو با محیط اطراف میکروب‌های مختلفی در روده ماهی کلنی تشکیل می‌دهند. میکورفلور روده تابع فلور باکتریایی آب اطراف است (Olsen و Ringo در سال ۱۹۹۹). بطوریکه در مورد ماهیان پرورشی گفته می‌شود که تعداد باکتری‌های محتویات روده در حد cfu/g 10^4 تا 10^7 است. در ماهیان آب شیرین میکروفلور غالب شامل آئروموناس‌ها و انتروباکتریاسه است. در مطالعه حاضر میانگین تعداد باکتری‌های مزوفیل در روده گروه شاهد $6 \times 10^5 \text{ cfu/g}$ بود که این تعداد با نتایج Gonzalez و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۸) که تعداد باکتری‌های مزوفیل را در قزل‌آلای رنگین کمان به میزان $6/92 \times 10^3 \text{ Cfu/g}$ گزارش کرده بودند، مغایرت داشت. علت افزایش باکتری‌های مزوفیل در گروه شاهد مطالعه حاضر احتمالاً می‌توان به شرایط متفاوت پرورشی و سطح

(MRSA) deMan Rogosa and Sharpe Agar استفاده گردید. $0/1 \text{ mL}$ نمونه را با میکروسپیلر به پتری دیش خالی منتقل نموده و سپس یک لایه محیط کشت آماده شده به نمونه اضافه شد و جهت مخلوط شدن نمونه با محیط کشت پتری دیش به صورت سینوسی تکان داده شد. پس از سرد شدن لایه اول، لایه نازک دیگری به لایه اولیه اضافه گردید. پلیت‌ها پس از ۲-۳ روز دوره انکوباسیون در دمای 37°C شمارش شدند. همچنین برای تایید نتایج آزمون، پلیت‌های تلقیح نشده همراه با سایر پلیت‌ها در انکوباتور قرار داده شدند. داده‌های حاصل از شمارش چشمی پلیت‌های مربوط به روده در عکس رقت ضرب شدند و در نهایت داده‌ها به صورت لگاریتم تعداد کلنی در هر گرم روده ($\log \text{cfu/g}$) گزارش گردید. همچنین داده‌های مربوط به باکتری‌های سرمادوست و مزوفیل آب نیز در عکس رقت ضرب و نتیجه به صورت $\log \text{cfu/mL}$ بیان گردید (۲).

پردازش آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای Excel 2007 و SPSS انجام پذیرفت. جهت کنترل نرمال بودن داده‌ها از آزمون One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test و همچنین برای تعیین تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌ها از آزمون t مستقل در سطح $0/05$ استفاده شد.

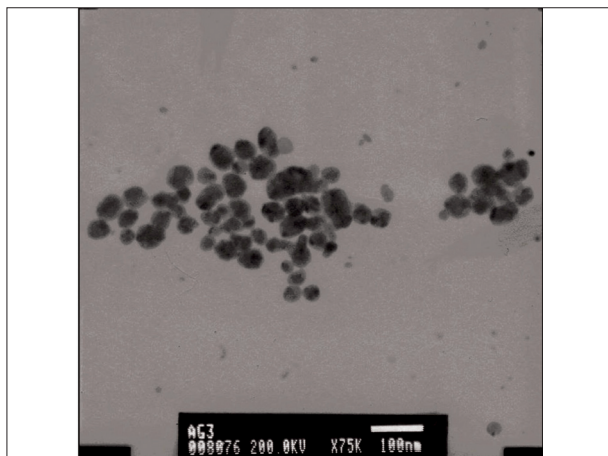
نتایج

میانگین برخی از شاخص‌های فیزیکی و شیمیایی آب مورد استفاده که در طول دوره‌ی آزمایش اندازه‌گیری شدند شامل؛ شوری ($4/4 \text{ ppt}$)، pH ($7/9 - 8/2$)، بی‌کربنات (220 mg/l)، کربنات سدیم (120 mg/l)، سدیم ($13/8 \text{ mg/l}$)، کلراید ($24/9 \text{ mg/l}$)، آمونیم کل ($0/1 \text{ mg/l}$)، فلیاتیت کل (326 mg/l)، منیزیم (41 mg/l) بود.

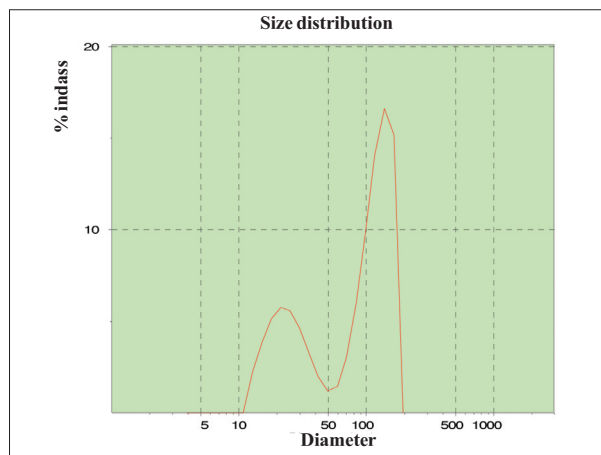
طبق نتایج حاصل از آزمایشات دستگاه زتاسایزر، اندازه ذرات نقره موجود در کلونید نانو ذرات نقره مورد استفاده در این تحقیق، بین $3/9 \text{ nm}$ تا $163/5$ و میانگین قطر آنها $54/8 \text{ nm}$ برآورد گردید (تصویر ۱). $54/1$ این ذرات کمتر از 100 nm و $45/9$ آن‌ها بین 100 nm تا 165 قطر داشتند. نتایج حاصل از آنالیزهای انجام شده توسط میکروسکوپ الکترون عبوری (تصویر ۲) نشان داد که متوسط اندازه نانو ذرات نقره در حالت خشک $25/90 \pm 8/44 \text{ nm}$ است. تفاوت بدست آمده بین اندازه نانو ذرات نقره در حالت خشک و کلونید، ناشی از اختلاف در روش مورد استفاده در اندازه‌گیری و نیز تشکیل توده و افزایش اندازه ذرات در حالت کلونیدی می‌باشد. طبق نتایج حاصل از دستگاه زتاسایزر، بار سطحی نانو ذرات نقره موجود در کلونید مذکور به طور میانگین $1/03 \pm 0/13 \text{ mV}$ می‌باشد. همچنین بر اساس نتایج روش طیفسنجی اتمی نشری پلاسما جفت شده القایی (ICP)، غلظت واقعی نقره در کلونید نانو ذرات نقره 3980 میلیگرم بر لیتر بدست آمد که با غلظت اعلام شده از طرف کارخانه تولید کننده (4000 mg/L) اختلاف بسیار ناچیزی داشت.

میانگین شمارش باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست روده پس از ۱۴ روز نگهداری ماهیان در آب معمولی و آب‌های حاوی نانو ذرات نقره

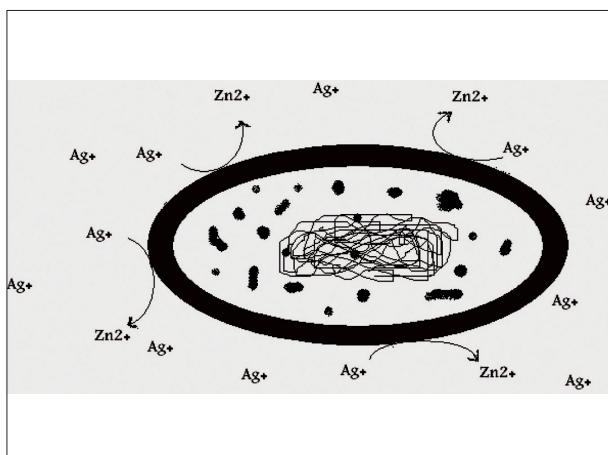




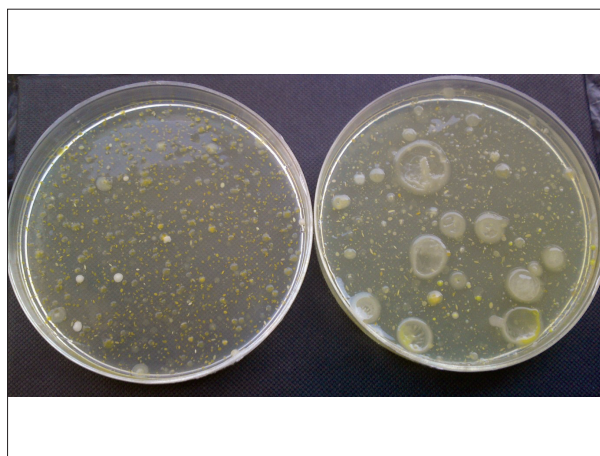
تصویر ۲- تصویر میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM) نانو ذرات نقره.



تصویر ۱- توزیع اندازه ذرات در کلونید نانو ذرات نقره بر اساس نتایج دستگاه Sizer-Zeta.



تصویر ۴- فعالیت آنتاگونیستی یون نقره علیه یون روی در سلول باکتریایی.



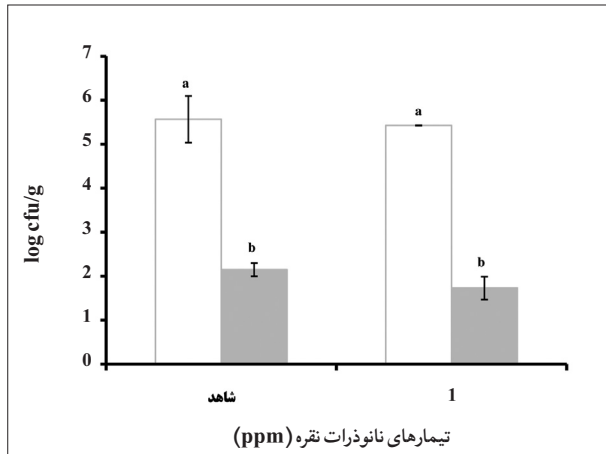
تصویر ۳- کلنی های باکتریایی سرمادوست تشکیل شده مربوط به آب شاهد و آب حاوی نانو ذرات نقره (به ترتیب پلیت سمت راست و چپ).

آنزیم‌ها ایفا می‌کنند (۱۶)، بنابراین احتمال دارد که در این تحقیق نانو ذرات نقره و یون‌های رها شده از آن به جای یون روی یا مس عمل نموده و در نهایت به عنوان یک کوفاکتور آنزیمی و تحریک کننده رشد اثر کرده باشند.

همچنین با توجه به اینکه که ماهیان آب شیرین در مقایسه با ماهیان آب شور آب کمتری می‌نوشند. بنابراین این احتمال وجود دارد که دوز نانو ذرات ورودی به روده کم بوده و تنها تحریک کننده رشد برخی از باکتری‌های سرمادوست بوده است. (۲) کاربرد دز ۱mg/L نانو نقره باعث افزایش استرس در ماهی و در پی آن کاهش جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در روده شده است. در نتیجه جمعیت باکتری‌های سرمادوست به صورت باکتری‌های فرصت طلب رو به ازدیاد نموده‌اند. باکتری‌های اسید لاکتیک از طریق مکانیسم تخمیری اسید لاکتیک تولید می‌کنند و همچنین این باکتری‌ها می‌توانند انواع گوناگونی از باکتریوسین‌ها با طیف عملکردی مختلفی تولید کنند که تمامی این عوامل باعث ایجاد شرایط نامساعد برای سایر باکتری‌های رقیب می‌شود. بنابراین کاهش یا

استرس نسبت داد. تغییر شرایط تغذیه‌ای و محیطی می‌تواند میکرواکوسیستم لوله گوارشی ماهی را تغییر دهد همچنین در زمان شرایط استرس زامکن است فلور میکروبی روده تغییر کند (۱۲، ۲۵). تعداد باکتری‌های سرمادوست در روده گروه شاهد در حد $5/5 \times 10^5$ cfu/g بود. تعداد باکتری‌های سرمادوست نیز همانند باکتری‌های مزوفیل بیشتر از مطالعه Gonzalez و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۸) گزارش گردید. که احتمالاً همان دلایلی که برای باکتری‌های مزوفیل ذکر گردید برای باکتری‌های سرمادوست نیز صادق است. با در معرض قرارگیری ماهیان با غلظت ۱ ppm نانو ذرات نقره به مدت ۱۴ روز تعداد باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافتند اگرچه افزایش باکتری‌های مزوفیل از لحاظ آماری معنی دار نبود. افزایش باکتری‌های سرمادوست احتمالاً به سه دلیل رخ داده است: (۱) با توجه به اینکه یون نقره (Ag^+) در هنگام مواجهه با باکتری به عنوان یک آنتاگونیست علیه یون روی (Zn^{2+}) و مس (Cu^{2+}) عمل می‌کند (تصویر ۴) (۹)، و از سوی دیگر روی و مس به عنوان کوفاکتور نقش بسیار مهمی در عملکرد برخی از

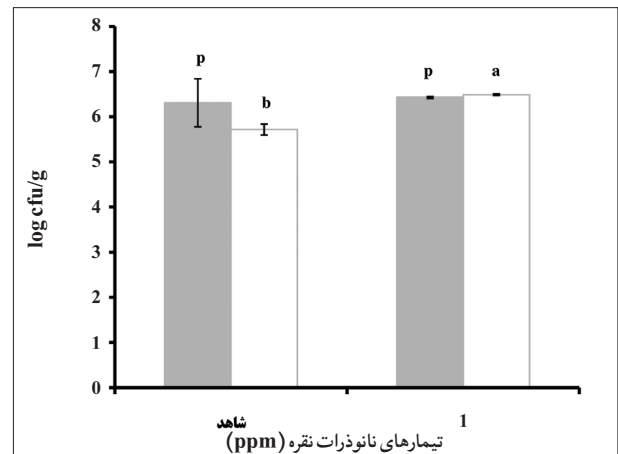




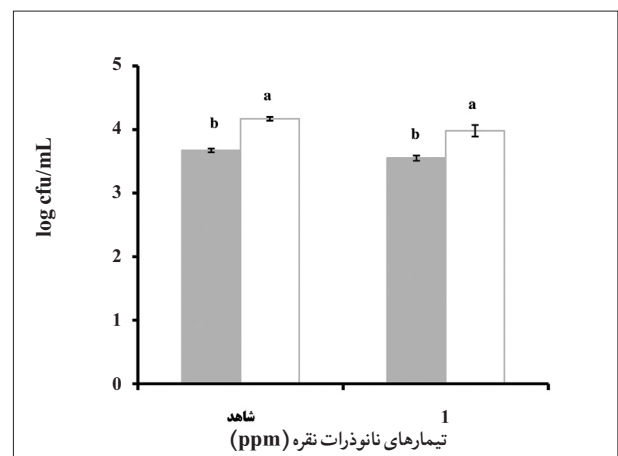
نمودار ۲ - میانگین جمعیت باکتری‌های انتروباکتریاسه و باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) در روده ماهی (mean±SD).
 باکتری‌های لاکتیک اسید ■ انتروباکتریاسه □

بودن باکتری‌های لاکتیک اسید و داشتن لایه پپتیدوگلیکان ضخیم نمی‌تواند تاثیر چندانی روی باکتری‌های مذکور داشته باشد (۲۶). بنابراین کاهش کم جمعیت باکتری‌های لاکتیک اسید در روده این ماهیان در تیمار ۱ ppm احتمالاً به خاطر استرس ناشی از نانو ذرات نقره بر ماهی بوده است. جمعیت انتروباکتریاسه در تیمار شاهد مطالعه حاضر بیشتر از مطالعه Gonzalez و همکاران در سال ۱۹۹۹ (۸) بود. علت این پدیده ممکن است به خاطر شرایط متفاوت پرورشی (آکواریوم نسبت به محیط طبیعی) و وابسته بودن فلور باکتریایی به محیط باشد. همچنین روند کاهش باکتری‌های انتروباکتریاسه در تیمار نانو ذرات نقره در مقایسه با گروه شاهد از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. احتمالاً مکانیسم‌های مختلفی در این پدیده دخیل است (۱) در این مطالعه دز نانو ذرات نقره در حدی نبوده است که باعث مرگ و میر باکتری‌های انتروباکتریاسه شود. به طوری که در مطالعه‌ای که توسط Mickeniene در سال ۲۰۱۰ (۱۶) بر روی اثر فلزات مس، نیکل، روی و آهن بر باکتری‌های انتروباکتریاسه دستگاه گوارش ماهی انجام شد، مشخص شد که در اثر این فلزات باکتری‌های انتروباکتریاسه به میزان زیادی کاهش پیدا کرده‌اند. در نتیجه هنوز این احتمال وجود دارد که با افزایش دز نانو ذرات نقره نیز جمعیت باکتری‌های انتروباکتریاسه به طور معنی‌داری کاهش یابد. (۲) با توجه به اینکه باکتری‌های انتروباکتریاسه شامل طیف وسیعی از گونه‌های مختلف باکتریایی می‌شود، این احتمال وجود دارد که اثر نانو ذرات نقره علیه برخی گونه‌ها بیشتر از برخی دیگر گونه‌های باکتریایی بوده باشد.

(۳) برخی مطالعات بیان می‌کنند که غلظت‌های کم فلزات سنگین بر روی سیستم ایمنی ماهی‌ها تاثیر مثبت داشته و توانایی‌های حفاظتی آنها را افزایش می‌دهد. بنابراین ممکن است سطح ۱ ppm نانو ذرات نقره باعث افزایش ایمنی ماهی و در نتیجه کاهش جزئی باکتری‌های انتروباکتریاسه شده باشد (۱۳).



نمودار ۱ - اثر نانو ذرات نقره بر جمعیت باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست روده ماهی (mean±SD). سرمادوست □ مزوفیل ■



نمودار ۳ - میانگین جمعیت باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست موجود در آب آکواریوم‌ها (mean±SD). سرمادوست □ مزوفیل ■

تضعیف باکتری‌های LAB در نهایت به افزایش گونه‌های رقیب می‌انجامد (۳). به طور کلی گفته می‌شود نانو ذرات نقره دارای پتانسیل ضد میکروبی جهت کنترل طیف وسیعی از باکتری‌ها هستند ولی ممکن است گونه‌های باکتریایی نیز وجود داشته باشند که نانو ذرات نقره توانایی کنترل رشد آنها را بطور کامل نداشته باشد و یا تنها با به تعویق انداختن رشد و تکثیر آنها، تامت زمان طولانی از ازدیاد آنها در محیط جلوگیری کند (۳۰). از سوی دیگر با توجه به اینکه باکتری‌های سرمادوست روده طیف وسیعی از باکتری‌ها را شامل می‌شوند، این احتمال وجود دارد که نانو ذرات نقره برخی از گونه‌های باکتریایی سرمادوست را کاهش داده است و در نتیجه زمینه را برای افزایش دیگر گونه‌های باکتری‌های سرمادوست مقاوم به نانو نقره فراهم شده باشد.

در مطالعه Ringi و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۲۵) نشان داده شد که استرس می‌تواند برخی از گونه‌های باکتری‌های لاکتیک اسید را در ماهی تیلاپیا حذف نماید. با توجه به اینکه نانو ذرات نقره به خاطر گرم مثبت



References

1. Asharani I, P.V., Lian, W.Y., Zhiyuan, G., Valiyaveettill, S. (2008) Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotech*. 19: 255102-255110.
2. Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista de Sousa, J.M., Villa, T.G., Barros-belazuey, J. (1998) Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *J. Food Prot.* 61: 608-615
3. Blaise, C., Gagné, F., Féraud, J.F., Eullaffroy, P. (2008) Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environ. Toxicol.* 23: 591-598.
4. Colvin, V.L. (2003) The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat. biotechnol.* 21: 1166-1170.
5. Dawson, N.G. (2008) Sweating the small stuff: environmental risk and nanotechnology. *Bioscience.* 58: 690-690.
6. Edwin, E.G., Clarke, N.A. (1966) Bacterial Pollution Indicators in the Intestinal Tract of Freshwater Fish. *American Society for Microbiology.* 14: 429-437
7. Farkas, J., Christian, P., Urrea, J., Roos, N., Hassellöv, M., Tollefsen, K., et al. (2010) Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 96: 44-52.
8. Gonzalez, C., Lopez-Diaz, T., Prieto, M., Otero, A. (1999) Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*), and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Food Prot.* 62: 1270-1277.
9. 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.*
10. Julia, F., Christian, P., Urread, J.A.G., Roos, N., Hassellöv, M., Erik Tollefsen, K., et al. (2010) Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 96: 44-52.
11. Kreyling, WG. (2010) A complementary definition of nanomaterial. *Nano. Today.* 5:165-168.
12. LeaMaster, B.R., Walsh, W.A., Brock, J.A., Fujioki,

میانگین باکتری‌های سرمادوست و مزوفیل موجود در آب گروه‌های شاهد به طور جزئی بیشتر از تیمار ۱ppm بود. که احتمالاً به دلیل خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره بوده است. اما نکته‌ای که نظر محققین را به خود جلب نمود تغییر فاحش در سایز و رنگ کلنی‌های تشکیل شده بر روی پلیت‌های مزوفیل و سرمادوست بود. سایز کلنی‌های تیمار شاهد نسبت به تیمار ۱ppm بزرگتر بود و همچنین بیش از ۹۰٪ کلنی‌های تشکیل شده بر روی پلیت مربوط به گروه شاهد به رنگ سفید بود در حالیکه اکثر کلنی‌های تشکیل شده بر روی پلیت‌های گروه تیمار نانوذرات نقره به رنگ زرد و نارنجی دیده می‌شدند. با توجه به اینکه فلور باکتریایی آب از باکتری‌های گوناگونی تشکیل شده است دلایل متعددی را می‌توان برای توجیه تغییر سایز و رنگ کلنی‌ها ذکر نمود. از آنجاییکه غلظت نانوذرات نقره به حدی نبوده است که بتواند تمامی باکتری‌های موجود در محیط را از بین ببرد، تغییر رنگ مشاهده شده احتمالاً به دلیل تفاوت در نوع باکتری‌های رشد کرده بر روی پلیت‌ها بوده است. علت کوچک شدن کلنی‌ها را در تیمار ۱ppm نانوذرات نقره نسبت به گروه شاهد را احتمالاً می‌توان به خاصیت باکتریواستاتیکی نانوذرات نقره نسبت داد. بنابراین آزمایشات تکمیلی میکروبی تشخیصی برای اثبات تغییرات ایجاد شده در فلور باکتریایی آب ضروریست.

به عنوان یک نتیجه گیری کلی می‌توان اینگونه استنباط نمود که در بین گروه‌های باکتریایی مورد مطالعه تنها باکتری‌های سرمادوست نسبت به تیمار نانوذرات نقره حساسیت پذیری معنی داری داشته‌اند، از این رو می‌توان این گروه از باکتری‌ها را به عنوان باکتری‌های مناسب برای مطالعات بیشتر در زمینه پایش آلودگی نانوذرات نقره در اکوسیستم‌های آبی معرفی کرد. با توجه به نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌شود که اثر نانوذرات در غلظت‌های دیگری نیز مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین لازم است در کنار شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک و انترو باکتری‌ها، نوع باکتری‌های سرمادوستی که افزایش یافته‌اند نیز تشخیص داده شود تا در نهایت بتوان نتایج را با قطعیت بیشتری تفسیر نمود. در مجموع با توجه به کوتاه بودن چرخه زندگی و آسیب پذیری باکتری‌ها در مواجهه با نانوذرات نقره، می‌توان از تغییرات باکتری‌های میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش موجودات آبی به منظور شاخصی برای پایش رهایش نانوذرات نقره در اکوسیستم آبی و محیط زیست بهره برد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان نهایت تشکر و امتنان خود را از سرکار خانم مهندس حسینی دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، بواسطه کمک‌های فنی و آزمایشگاهی که در طی انجام این تحقیق داشتند ابراز می‌دارند.



- R.S. (1997) Cold stress-induced changes in the aerobic heterotrophic gastrointestinal tract bacterial flora of red hybrid tilapia. *J. Fish Biol.* 50:770-780.
13. Macfarlane, D.R., Bullock, L.G., McLaughlin, J. J. A. (1986) Effects of five metals on susceptibility of striped bass to *Flexibacter columnaris*. *T. Am. Fish. Soc.* 115:227-231.
14. Mahendra, R., Yadav, A., Gade, A. (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotech. Adv.* 27: 76-83.
15. Mantovani, E., Porcari, A., Meili, C., Widmer, M. (2009) Framing nano project: A multi stakeholder dialogue platform framing the responsible development of nanosciences and nanotechnologies. Mapping Study on Regulation and Governance of Nanotechnologies. AIRI/Nanotech IT. Italy.
16. Mickeniene, L., Šyvokiene, J. (2001) Changes of the diversity of the bacteriocenosis in the digestive tract of fish under the impact of heavy metals. *Ecology.* 4:11-15.
17. Mickeniene, L., Šyvokiene, J. (2008) The impact of zinc on the bacterial abundance in the intestinal tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. *Ekologija.* 54: 5-9.
18. Mühlring, M., Bradford, A., Readman, J.W., Somerfield, P.J., Richard, D.H. (2009) An investigation into the effects of silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment. *Mar. Environ. Res.* 68: 278-283.
19. Neenu, S., Manshian, B., Gareth, J.S., Sioned, M., Griffiths, P.M., Williams, T.G.G., et al. (2009) NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterial.* 30: 3891-3914.
20. OECD. (1992) Organization for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Fish Acute Toxicity Test. OECD 203.
21. Choi, O., Clevenger, T.E., Deng, B., Surampalli, R.Y., Ross Jr, L., Hu, Z. (2009) Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water. Res.* 43:1879-86.
22. Okkyoung, C., Zhiqiang, H. (2008) Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 42: 4583-4588.
23. Rahmánya, J. (2009) Preparation of colloidal nano-silver. US Patent application docket 20090013825.
24. Ringo, E., Olsen, R.E. (1999) The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*). *J. Appl. Microbiol.* 86: 22-28
25. Ringù, 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.*). *J. Appl. Microbiol.* 89:317-322.
26. Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., Dash, D. (2007) Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotech.* 18: 225103-225112.
27. Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G, Griffiths, S., Williams, P., Maffeis, T., et al. (2009) NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterial.* 30: 3891-3914.
28. Soltani, M., Esfandiary, M., Sajadi, M.M., Khazraenia, S., Bahonar, A.R., Ahari, H. (2011) Effect of nanosilver particles on hatchability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg and survival of the produced larvae. *I. J. F. S.* 10: 167-176.
29. Soltani, M., Ghodratnema, M., Ahari, H., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Atee, M., Dastmalchi, F., et al. (2009) The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas hydrophila*. *Int. J. Vet. Res.* 3:137-142.
30. Sondi, B. (2004) Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid. Interface. Sci.* 275:177-182.
31. Stephen, J., Klaine, P.J.J., Alvarez Graeme, E., Batley Teresa, F., Fernandes Richard, D., Handy Delina, Y., et al. (2008) Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 27:1825-1851.



32. Thabet, M.T., Amro, M.E.B., Genaidy, A., Kirk, G.S. (2010) An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci. Total. Environ.* 408: 999-1006.
33. Welsh, P.G., Lipton, J., Mebane, C.A., Marr, J.C.A. (2008) Influence of flow-through and renewal exposures on the toxicity of copper to rainbow trout. *Exotoxicol. Environ. Saf.* 69:199-208.
34. Yun, J.C., Pham, C.H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., Man, B.G. (2009) Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 94:320-327.



Effect of colloidal silver nanoparticles on population of gut bacterial flora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Kalbassi, M.R.^{1*}, Abdollahzadeh, E.², Salari-Joo, H.²

¹Department of Aquaculture, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

²Graduated from Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

(Received 31 October 2011 , Accepted 30 January 2012)

Abstract:

BACKGROUND: Increasing developments in nanotechnology in recent years have raised the possible risk of release of nanoparticles into the aquatic environment, which could adversely affect organisms. Silver nanoparticles possess antibacterial activities and constitute almost 56% of total manufactured nanoparticles which are currently in use. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to evaluate the effects of colloidal silver nanoparticles on bacterial flora of rainbow trout gut. **METHODS:** The Induced Coupled Plasma (ICP), Zetasizer and Transmission Electron Microscope (TEM) methods were used in order to ensure the quality of silver nanoparticles. 90 Fish (25±0.5 g) in Faculty of Marine Sciences were exposed to zero and 1 mg/L of silver nanoparticles over 14 days. Total viable bacterial counts and psychrotrophic bacteria, enterobacteriaceae and lactic acid bacteria counts of fish's gut and total viable bacterial counts and psychrotrophic bacteria counts of water were determined. **RESULTS:** There was not any effect of nanoparticles on the bacterial counts (lactic acid bacteria, psychrotrophic and enterobacteriaceae) of the fish's gut and bacterial counts (psychrotrophic and total viable) of the water. However, there were significant differences between control and 1 ppm treatments based on the size and color of psychrotrophic colonies. Furthermore, the psychrotrophic bacterial counts of fish's gut in the 1 ppm treatment showed significant increase (6.49±0.02 log cfu/g) compared to the control group (5.72 ± 0.17 log cfu/g) (p<0.05). **CONCLUSIONS:** The psychrotrophic bacteria represented the most sensitivity to nanoparticles among all studied bacterial groups (p<0.05); so, changes in the number of these bacteria may be considered as an indicator in monitoring the release and presence of silver nanoparticles in aquatic ecosystems.

Key words: silver nanoparticles, releasing, gut bacterial flora, rainbow trout, aquatic ecosystem.

Figure Legends and Tabel Captions

Figure 1. Particle size distribution in colloidal silver nanoparticle based on Zetasizer data.

Figure 2. Transmission electron microscope (TEM) image of silver nanoparticles.

Figure 3. Colonies of psychrotrophic bacteria in the control water and water containing silver nanoparticles left and right plates respectively.

Figure 4. Antagonistic activity of silver ion (Ag⁺) against Zinc ion (Zn²⁺) on bacterial cells.

Graph 1. Effects of silver nanoparticles on total viable and psychrotrophic bacteria in fish's gut (mean ±SD).

psychrotrophic □ viable ■

Graph 2. The average of Lactic acid bacteria and Enterobacteriaceae bacteria in fish's gut (mean ±SD).

Lactic acid bacteria ■ Enterobacteriaceae bacteria □

Graph 3. The average population of total viable and psychrotrophic bacteria in the aquariums water (mean ±SD).

psychrotrophic □ viable ■

