

Investigating the effect of silver nanoparticles synthesized using *Sargassum angustifolium* on the bacterial flora of common carp skin, *Cyprinus carpio*

بررسی تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره جلبک دریایی *Sargassum angustifolium* بر فلور باکتریایی پوست ماهی کپور معمولی

Seraj Bita^{1*}, Mehrzad Mesbah², Ali Shahryari³,
Masood Ghorbaanpoor Najafabadi⁴

1. Assistant Professor, Faculty of Marine Science, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran
2. Associate Professor, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz, Iran
3. Associate Professor, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz, Iran
4. Professor, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahwaz, Ahwaz, Iran

(Received: Jan. 25, 2016 - Accepted: Jul. 02, 2019)

سراج بیتا^{۱*}، مهرزاد مصباح^۲، علی شهرباری^۳،
مسعود قربانپور نجف‌آبادی^۴

۱. استادیار، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران
 ۲. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
 ۳. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
 ۴. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۱)

Abstract

In this study, in order to investigate the antibacterial properties of silver nanoparticles that were synthesized using *Sargassum* seaweed extract by biological extracellular method, Mesophile Enterobacteriaceae, lactic acid bacteria and psychrophilic bacteria skin of common carp exposed to three concentration (0.11, 1.13, 5.67 mg/L AgNP) of this silver nanoparticles were studied for 14 days. The results showed that with increasing concentration of silver nanoparticles, the load of Enterobacteriaceae and Mesophile significantly reduced compared with control ($p < 0.05$), but it did not reduce the number of psychrophilic bacteria, so that according to Tukey test, the average bacterial count of psychrophilic bacteria in treatments exposed to silver nanoparticles was not significantly different from control group ($p > 0.05$). The lowest bacterial count was related to enterobacteria ($\log \text{cfu/cm}^2$ 1.00 ± 0.01), when exposed to concentration 1.13 mg/L AgNP. Lactic acid bacteria in all treatments and in control, did not grow until the last day of exposure.

Keywords: Bacterial flora, common carp, sargassum seaweed extract, silver nanoparticles.

چکیده

در این تحقیق به منظور بررسی خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره جلبک دریایی سارگاسوم که به روش بیولوژیکی خارج سلولی تولید شد، بار باکتریایی مزوفیل، انتروباکتریاسه، باکتری‌های لاکتیک اسید و سرمادوست پوست ماهی کپور معمولی در مواجهه با سه غلظت از نانوذره مذکور شامل mg/L AgNP 0/11، 1/13 و 5/67 mg/L AgNP به مدت ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره بار باکتریایی مزوفیل و انتروباکتریاسه به طوری معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت ($p < 0/05$)، اما از تعداد جمعیت باکتری‌های سرمادوست کاسته نشد، به طوری که طبق آزمون توکی بین میانگین شمارش باکتریایی سرمادوست در تیمارهای مواجهه با نانوذرات نقره سنتز شده با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0/05$). کمترین شمارش باکتریایی نیز مربوط به انتروباکترها ($\log \text{cfu/cm}^2$ $1/00 \pm 0/01$) و در مواجهه با غلظت 1/13 mg/L AgNP بوده است. باکتری‌های لاکتیک اسید در تمام تیمارها و نیز در تیمار شاهد تا آخرین روز مواجهه هیچ‌گونه رشدی نداشتند.

واژه‌های کلیدی: عصاره جلبک سارگاسوم، فلور باکتریایی، کپور معمولی، نانوذرات نقره.

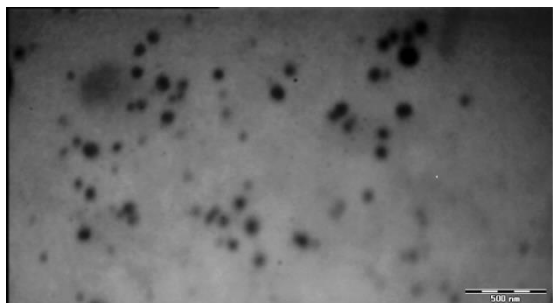
مقدمه

امروزه نانو مواد و محصولات متفاوتی در زمینه نانو به صورت تجاری در دسترس می‌باشند، که یکی از مهمترین آن‌ها نانوذرات نقره است، که در صنایع مختلف کاربرد بسیار زیادی دارد (Ahmed *et al.*, 2008). کاربردهای فناوری نانو در شیلات شامل کاربرد نانو مواد در بسته‌بندی محصولات و فرآورده‌های آبزیان، تجهیزات، ادوات و دستگاه‌ها، ساخت‌وساز حوضچه‌ها و قفس‌های پرورش، ضدعفونی و ایجاد سطوح آنتی باکتریال با استفاده از نانوذرات نقره می‌باشد (Rather *et al.*, 2011). نانوذرات نقره تاکنون بیش از ۶۵۰ نوع باکتری شناخته شده را از بین برده است، به طوری که بر طیف وسیعی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت و همچنین باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها اثر می‌گذارد (Percival *et al.*, 2007). جلبک‌های دریایی دارای ترکیبات گوناگونی با خواص ضدباکتریایی می‌باشند (Nair *et al.*, 2007)، که این امر اهمیت استفاده از جلبک‌های دریایی در سنتز نانوذرات نقره و استفاده از آن به‌عنوان عامل ضدباکتریایی را دو چندان می‌کند، بنابراین اخیراً سنتز نانوذرات نقره با استفاده از جلبک‌های دریایی با روش بیولوژیکی، به‌خاطر سازگاری این روش با محیط زیست و خواص بهتر ضدباکتریایی، خیلی متداول شده است (Li *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009). در سال‌های اخیر مطالعات متعددی در رابطه با خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده از گونه‌های مختلف جلبک‌های دریایی در شرایط *in vitro* انجام شده است (Govindaraju *et al.*, 2009; Suriya *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012). مطالعه حاضر اولین مطالعه با هدف بررسی تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره جلبک سارگاسوم بر فلور باکتریایی پوست ماهی کپور معمولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مشخصات نانوذرات نقره

در این مطالعه از نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره جلبک دریایی *Sargassum angustifolium* با غلظت اسمی $10.5/7 \text{ mg/L}$ و اندازه ذرات $32/54$ نانومتر (شکل ۱)، که به روش بیولوژیکی خارج سلولی تولید شده بود، برای بررسی خواص ضدباکتریایی آن بر فلور باکتریایی پوست ماهی کپور معمولی استفاده شد.



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره جلبک سارگاسوم

تهیه و شرایط نگهداری ماهیان

تعداد ۴۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی $78/99 \pm 16/45$ گرم (انحراف معیار \pm وزن)، از مزارع پرورش ماهی شوشتر تهیه و برای تطابق با شرایط آزمایشگاه، به مدت دو هفته در آکواریوم‌های با حجم ۱۵۰ لیتر در آزمایشگاه تحقیقاتی بهداشت آبزیان دانشگاه شهید چمران اهواز نگهداری شدند، و در طول این مدت به میزان ۲٪ وزن بدن، در دو نوبت (صبح و عصر)، غذادهی شدند. پس از اتمام دوره سازگاری و ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایشات، غذادهی به ماهیان قطع گردید. از آنجا که تاکنون مقادیر دقیق ۵۰٪ غلظت کشندگی (LC_{50}) نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره جلبک دریایی *Sargassum angustifolium* در ماهی کپور معمولی تعیین نشده است، در ابتدا با انجام آزمایش‌های مقدماتی، برای این منظور جهت تعیین محدوده کشندگی آزمایش تعیین LC_{50}

در طی دوره آزمایش تعویض آب به میزان ۲۰٪ حجم آب هر ۴۸ ساعت یکبار انجام می‌شد. بعد از هر بار تعویض آب، دز نانوذرات نقره مدنظر در هر آکواریوم مجدداً تنظیم گردید (Kalbasi *et al.*, 2012).

آزمایشات میکروبی در ماهیان کپور معمولی مجاور شده با نانوذرات نقره سنتز شده

برای این منظور ۳ ماهی از هر تیمار در فواصل زمانی ۱، ۳، ۷ و ۱۴ روز به صورت تصادفی انتخاب گردید. به منظور نمونه برداری و کشت باکتریایی، سطح سینی نگهداری ماهی با الکل ضد عفونی شده و با کمک پنس و قیچی استریل، پوست ماهیان جداسازی می‌شد. از نمونه‌های پوست به میزان ۱ گرم برداشته و همراه با ۹ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل ۰/۸۵٪ هموزن گردید.

تهیه محیط‌های کشت، انکوباسیون و شمارش باکتری‌ها

جهت شمارش کل باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست از محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) و انتروباکتریاسه از محیط کشت مکانکی (مرک، آلمان) استفاده شد. بعد از ساخت محیط کشت، ۰/۱ سی‌سی از نمونه‌های هموزن شده به روش PCA کشت داده می‌شد. شمارش پلیت‌های کشت داده شده پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (باکتری‌های مزوفیل و انتروباکتریاسه) و پس از ۱۰ روز انکوباسیون در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد (باکتری‌های سرمادوست) انجام می‌شد. جهت کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک از محیط کشت MRSA و به روش pour plate استفاده شد. پلیت‌ها پس از ۲-۳ روز انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شمارش می‌شدند و داده‌های به دست آمده به صورت لگاریتم تعداد کلنی‌های شمارش شده به ازای هر سانتی‌متر مربع در واحد سطح پوست ماهی (Log cfu/cm² ±SE) ارائه شدند.

براساس روش استاندارد O.E.C.D در سال ۱۹۹۸ به صورت ساکن (static renewal) تعویض آب هر ۲۴ ساعت یکبار و جایگزینی مجدد غلظت‌های مورد نظر) و به مدت ۹۶ ساعت در ۶ تیمار با غلظت‌های ۸۰ mg/L، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵ و ۲/۵ نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک دریایی همراه با یک تیمار شاهد و هر کدام در ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پس از ذخیره سازی ماهیان به تعداد ۵ قطعه ماهی در هر آکواریوم با حجم ۵۰ لیتر، تلفات در طی ۴ روز (۹۶ ساعت)، هر ۲۴ ساعت یکبار بررسی و ثبت می‌گردد. بعد از ثبت تلفات، اقدام به تعیین LC₅₀ در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با حدود اطمینان ۹۵٪ با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون استاندارد پروبیت آنالیز شد و مقدار واقعی ۵۰٪ غلظت کشندگی به میزان ۱۱/۳۴ mg/L AgNP در طی ۹۶ ساعت مواجهه به دست آمد. بنابراین، خواص ضدباکتریایی این نانوذره بر باکتری‌های پوست ماهی کپور معمولی در غلظت‌هایی شامل LC₅₀ ۱٪ (mg/L) و AgNP (۰/۱۱)، LC₅₀ ۱۰٪ (mg/L AgNP) و LC₅₀ ۵۰٪ (mg/L AgNP) در سه تیمار غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره به مدت ۱۴ روز، همراه با تیمار شاهد (هر کدام با سه تکرار) مورد بررسی قرار گرفت.

شرایط مجاور سازی ماهیان کپور معمولی با نانوذرات نقره سنتز شده

پس از انجام آزمایشات مقدماتی و تعیین LC₅₀، ماهیان در تیمارهای مختلف با غلظت‌هایی معادل ۱٪، ۱۰٪ و ۵۰٪ میزان LC₅₀ نودوشش ساعته به منظور بررسی تأثیر نانوذرات نقره بر فلور باکتریایی پوست در آکواریوم‌های ۱۰۰ لیتری به تعداد ۲۵ قطعه ماهی در هر آکواریوم مجاور شدند. شرایط فیزیوشیمیایی آب مورد استفاده در تحقیق به قرار زیر بود: شامل دما: ۲۵±۱ c؛ اکسیژن محلول: ۷/۹±۰/۳ ppm و ۸-۹؛ pH: ۰/۱ ppm NO₂؛ ۰/۱ ppm NH₃؛ سختی ۸۷۰ میکروزیمنس در سانتی‌متر مربع.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های مربوط به شمارش باکتریایی به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (Mean \pm SE) بیان شده‌اند. اختلاف بین داده‌ها و مقایسه میانگین نمونه‌ها در تیمارهای مختلف با سنجش واریانس دو طرفه (Two-Way ANOVA) در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها، آزمون Tukey برای گروه‌بندی میانگین‌های دارای اختلاف معنی‌دار استفاده شد و اختلاف در سطح اطمینان بالای ۹۵٪ ($P < 0.05$) پذیرفته شد.

نتایج

طبق نتایج، باکتری‌های لاکتیک اسید در تمام تیمارها و نیز در تیمار شاهد هیچ‌گونه رشدی نداشتند. در تیمار شاهد با گذشت زمان بار باکتریایی مزوفیل افزایش پیدا کرد، اما این افزایش معنی‌دار نبود (جدول ۱). طبق آزمون آماری واریانس دوطرفه، بین میانگین شمارش باکتریایی مزوفیل ($1/86 \pm 0/19$ log cfu/cm²) در تیمار ۵٪ AgNP (۵/۶۷ mg/L) نانوذرات نقره با تمام تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$)، ولی میانگین شمارش باکتریایی مزوفیل ($3/82 \pm 0/31$ log cfu/cm²) در تیمار ۱۰٪ AgNP (۱/۱۱ mg/L) نانوذرات نقره با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0.05$). طبق آزمون توکی، میانگین شمارش

باکتریایی مزوفیل بین روزهای مختلف در تمام تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0.05$). بار باکتریایی انتروباکترهای پوست در تیمار شاهد با گذشت زمان افزایش پیدا کرد (جدول ۲). طبق آزمون توکی، بین میانگین شمارش باکتریایی انتروباکترهای پوست ($1/98 \pm 0/29$ log cfu/cm²) در تیمار ۵٪ LC₅₀ نانوذرات نقره (۵/۶۷ mg/L AgNP) با تمام تیمارها به جز تیمار ۱۰٪ LC₅₀ (۱/۱۳ mg/L AgNP)، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$). میانگین شمارش باکتریایی انتروباکترهای پوست در تیمارهای ۵٪ LC₅₀ (۱/۱۳ mg/L AgNP) و ۱۰٪ LC₅₀ (۵/۶۷ mg/L AgNP) با گذشت زمان روند کاهشی نشان داد که این کاهش در تیمار ۱۰٪ LC₅₀ (۱/۱۳ mg/L AgNP) در بین تمام روزها به جز بین روز ۷ و ۱۴ اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$).

شمارش باکتریایی سرمادوست در تمام تیمارهای مواجهه با نانوذرات نقره و نیز تیمار شاهد دارای نوسانات کاهشی و افزایشی بود (جدول ۳)، به طوری که طبق آزمون توکی بین میانگین شمارش باکتریایی سرمادوست ($2/18 \pm 0/18$ log cfu/cm²) در تیمارهای مواجهه با نانوذرات نقره سنتز شده با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). طبق آزمون آماری واریانس دو طرفه شمارش باکتریایی سرمادوست بین تمام تیمارها و در روزهای مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p > 0.05$).

جدول ۱. نتایج حاصل از بارباکتریایی مزوفیل پوست ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف درصد LC₅₀ نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره جلبک سارگاسوم

AgNP ۵٪	AgNP ۱۰٪	AgNP ۱٪	شاهد	روزهای نمونه برداری	باکتری
C,c	B,b	A,a	A,a	۱	
$1/85 \pm 0/13$	$3/41 \pm 0/4$	$3/63 \pm 0/48$	$3/73 \pm 0/15$		
C,c	B,b	A,a	A,a	۳	
$2/06 \pm 0/15$	$3/30 \pm 0/11$	$3/62 \pm 0/23$	$3/73 \pm 0/34$		
C,c	B,b	A,a	A,a	۷	مزوفیل
$1/90 \pm 0/36$	$3/00 \pm 0/13$	$4/02 \pm 0/17$	$4/00 \pm 0/36$		
C,c	B,b	A,a	A,a	۱۴	
$1/63 \pm 0/15$	$2/98 \pm 0/12$	$4/02 \pm 0/36$	$4/03 \pm 0/17$		

AgNP: نانوذرات نقره

حروف غیرهمنام کوچک در سطرها، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در تعداد بار باکتریایی بین تیمارها ($P < 0.05$) و حروف غیرهمنام بزرگ در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در تعداد بار باکتریایی در بین روزهای مختلف نمونه‌گیری ($P < 0.05$) برای هر تیمار می‌باشند.

جدول ۲. نتایج حاصل از باربakterیایی انتروباکتریاسه پوست ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف درصد LC₅₀ نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره جلبک سارگاسوم

AgNP ۵۰٪	AgNP ۱۰٪	AgNP ۱٪	شاهد	روزهای نمونه برداری	باکتری
A,b	B,b	A,a	A,a	۱	انتروباکتریاسه
۲/۱۶ ± ۰/۳۱	۳/۲۰ ± ۰/۳۶	۳/۶۱ ± ۰/۲۷	۳/۶۶ ± ۰/۳۷		
A,b	C,b	A,a	A,a	۳	
۲/۰۹ ± ۰/۲۵	۲/۳۶ ± ۰/۲۶	۳/۸۵ ± ۰/۳۱	۳/۷۲ ± ۰/۳۲		
A,b	D,b	A,a	A,a	۷	
۱/۹۰ ± ۰/۲۶	۱/۵۰ ± ۰/۳	۳/۸۵ ± ۰/۱۲	۳/۷۸ ± ۰/۴۲		
A,b	D,b	A,a	A,a	۱۴	
۱/۷۷ ± ۰/۳۶	۱/۰۰ ± ۰/۰۱	۳/۸۳ ± ۰/۲۷	۳/۹۸ ± ۰/۱۹		

AgNP: نانوذرات نقره

حروف غیرهمنام کوچک در سطرها، نشان دهنده تفاوت معنی دار در تعداد بار باکتریایی بین تیمارها ($P < 0.05$) و حروف غیرهمنام بزرگ در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار در تعداد بار باکتریایی در بین روزهای مختلف نمونه گیری ($P < 0.05$) برای هر تیمار می باشد.

جدول ۳. نتایج حاصل از باربakterیایی سرمادوست پوست ماهی کپور معمولی در تیمارهای مختلف درصد LC₅₀ نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره جلبک سارگاسوم

AgNP ۵۰٪	AgNP ۱۰٪	AgNP ۱٪	شاهد	روزهای نمونه برداری	باکتری
A,a	A,a	A,a	A,a	۱	سرمادوست
۲/۰۴ ± ۰/۱۴	۲/۲۴ ± ۰/۳۳	۲/۳۴ ± ۰/۲۷	۲/۲۷ ± ۰/۲۳		
A,a	A,a	A,a	A,a	۳	
۲/۰۴ ± ۰/۰۸	۲/۱۵ ± ۰/۰۷	۲/۱۳ ± ۰/۰۹	۱/۹۹ ± ۰/۱۴		
A,a	A,a	A,a	A,a	۷	
۲/۱۴ ± ۰/۰۶	۲/۱۷ ± ۰/۱۸	۲/۲۴ ± ۰/۰۸	۲/۰۴ ± ۰/۱		
A,a	A,a	A,a	A,a	۱۴	
۲/۱۴ ± ۰/۱۷	۲/۰۵ ± ۰/۱۰	۲/۱۴ ± ۰/۱۴	۲/۰۷ ± ۰/۰۶		

AgNP: نانوذرات نقره

حروف غیرهمنام کوچک در سطرها، نشان دهنده تفاوت معنی دار در تعداد بار باکتریایی بین تیمارها ($P < 0.05$) و حروف غیرهمنام بزرگ در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار در تعداد بار باکتریایی در بین روزهای مختلف نمونه گیری ($P < 0.05$) برای هر تیمار می باشد.

بحث و نتیجه گیری

تیمارها و نیز در تیمار شاهد هیچ گونه رشدی نداشتند، در مطالعه Ringù *et al.* (2000)، نشان داده شد که استرس می تواند برخی از گونه های باکتریایی لاکتیک اسید را در ماهی تیلاپیا حذف نماید، بنابراین در مطالعه حاضر عدم رشد این باکتری ها در تیمارهای مختلف به خصوص در تیمار شاهد، احتمالاً می تواند ناشی از استرس وارد شده به محیط پرورشی در زمان آبیگری آکواریوم ها و ذخیره سازی ماهیان باشد که سبب شد شرایط رشد برای این باکتری ها فراهم نشود. از طرف دیگر، با وجود برطرف شدن استرس بعد از این زمان نیز باکتری های لاکتیک اسید رشد نداشتند که احتمالاً دلیل این امر، رشد بیشتر بقیه گروه های

خواص ضدباکتریایی یون نقره و ترکیبات مربوط به آن از قدیم به خوبی شناخته شده است، اما در مقیاس نانو، نانوذرات نقره به دلیل خواص منحصر به فرد بیولوژیکی، شکل و اندازه مناسب و نیز سطح تماس بیشتر دارای فعالیت باکتری کشی بهتری بر علیه انواع باکتری های گرم منفی و گرم مثبت می باشند (Ahamed *et al.*, 2010; Sawosz *et al.*, 2011). فلور باکتریایی در ماهی و آب بسته به مناطق مختلف جغرافیایی و نیز شرایط نگهداری می تواند متفاوت باشد (Uddin & Al Harbi, 2012). در مطالعه حاضر، باکتری های لاکتیک اسید در تمام

خواص ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده از جلبک دریایی *Sargassum ilicifolium* بیان کردند که با افزایش غلظت نانوذرات نقره اثرات بازدارندگی باکتریایی آن نیز افزایش یافت. همچنین *Suriya et al.* (2012) اثرات باکتری‌کشی نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک دریایی *Urospora sp.* را بر علیه باکتری‌ها اثبات کردند و بیان داشتند که اثرات باکتری‌کشی نانوذرات نقره بسته به غلظت آن دارد که نتایج حاصل از این محققین در رابطه با وابسته به غلظت بودن خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره، با نتایج مطالعه ما مطابقت دارند. در مطالعه‌ای توسط *Pineda et al.* (2012)، جمعیت باکتریایی روده جوجه به وسیله مکمل نانوذرات نقره تحت تأثیر قرار نگرفت که با نتایج ما همخوانی ندارد، دلایل این امر احتمالاً تفاوت در غلظت نانوذرات نقره، گونه، نحوه تجویز نانوذرات، شرایط محیطی، اندازه نانوذرات و حتی اندام نمونه‌برداری شده و روش‌های کشت و شمارش باکتریایی می‌باشند. بیشترین میزان خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده در مطالعه حاضر در مواجهه با غلظت $5/67 \text{ mg/L AgNP}$ مشاهده شد، در اولین روز نمونه‌برداری، شمارش باکتریایی انتروباکترها در غلظت $5/67 \text{ mg/L AgNP}$ نسبت به تیمار شاهد و بقیه تیمارها کمتر بود اما با گذشت زمان، غلظت $1/13 \text{ AgNP}$ تأثیرگذاری بیشتری بر انتروباکترها داشت، به طوری که در آخرین روز نمونه‌برداری کمترین میزان شمارش انتروباکترها مربوط به همین تیمار بود ($1/01 \pm 0/01 \log \text{ cfu/cm}^2$). باتوجه به این که باکتری‌های انتروباکتریاسه شامل طیف وسیعی از باکتری‌ها می‌باشند، این احتمال وجود دارد که در تیمار $5/67 \text{ mg/L AgNP}$ گونه‌هایی از این باکتری‌ها رشد کرده باشند که نسبت به نانوذرات نقره مقاوم بوده‌اند، زیرا علی‌رغم خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره، باکتری‌هایی نیز وجود دارند که نسبت به نقره مقاوم می‌باشند (*Klaus et al.*, 1999). محققین مختلف اظهار داشته‌اند که نانوذرات نقره دارای خواص

باکتریایی در روزهای مختلف در تیمار شاهد و نیز حضور نانوذرات نقره در بقیه تیمارها می‌باشد که سبب شد تا این باکتری‌ها فرصت تکثیر و رشد پیدا نکنند. در مطالعه‌ای توسط *Kalbasi et al.* (2012) در مواجهه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با نانوذرات نقره، تعداد کم بار باکتری لاکتیک اسید روده ماهی در مقایسه با بقیه گروه‌های باکتریایی را استرس ناشی از نانوذرات نقره بر ماهی ذکر نمودند. طبق نتایج، بار باکتری‌های مزوفیل در تیمار شاهد روند افزایشی نشان داد، به طوری که بیشترین میزان شمارش باکتریایی مربوط به باکتری‌های مزوفیل بود. در مطالعه *Kalbasi et al.* (2012)، دلیل افزایش باکتریایی مزوفیل پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در تیمار شاهد را ناشی از شرایط محیطی و اختلاف سطح استرس ذکر کردند که در مطالعه ما نیز افزایش بار باکتریایی مزوفیل احتمالاً به دلیل بالا بودن دما باشد که سبب شده از تعداد جمعیت باکتری‌های سرمادوست کاسته شود. میانگین شمارش باکتریایی مزوفیل، انتروباکتریاسه و باکتری‌های سرمادوست پوست در آخرین روز نمونه‌برداری در مواجهه با بالاترین غلظت نانوذرات نقره به ترتیب $1/15 \pm 0/63 \log \text{ cfu/cm}^2$ ، $1/36 \pm 0/77 \log \text{ cfu/cm}^2$ و $2/14 \pm 0/17 \log \text{ cfu/cm}^2$ بود که نشان‌دهنده خواص ضدباکتریایی قوی نانوذرات نقره سنتز شده بر علیه باکتری‌های مزوفیل و انتروباکترها می‌باشد، به طوری که با افزایش غلظت نانوذرات نقره در آب آکواریوم‌های پرورشی ماهی تعداد باکتری‌های مزوفیل کاهش پیدا کرد که این نتایج با یافته‌های سایر محققین که بیانگر خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره می‌باشد مطابقت دارد (*Morones et al.*, 2005; *Panacek et al.*, 2006; *Shahverdi et al.*, 2007; *Soltani et al.*, 2009). همچنین *Shrivastava et al.* (2007)، فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره را وابسته به دز دانستند. *Kumar et al.* (2012) با بررسی

می‌باشد. در مورد باکتری‌های مزوفیل مشخص گردید خواص ضدباکتریایی نانوذره نقره مذکور وابسته به دز می‌باشد به طوری که با افزایش غلظت نانوذرات نقره، تعداد باکتری‌های مزوفیل هم در پوست و هم در آبشش به طور معنی‌داری کاهش یافت. در مورد انتروباکترها، در تیمار $LC_{50} 10\%$ ، بیشترین تأثیر بر روی این باکتری‌ها در مقایسه با بقیه تیمارها مشاهده شد. بنابراین غلظت مؤثر نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سارگاسوم بر باکتری‌های مزوفیل و انتروباکترها، به ترتیب مربوط به تیمار $LC_{50} 5\%$ و $LC_{50} 10\%$ می‌باشد. پس در مجموع می‌توان گفت که اثرات نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره جلبک سارگاسوم بر بار باکتریایی پوست ماهی کپور معمولی در مواجهه با غلظت $1/13$ میلی‌گرم بر لیتر (تیمار $LC_{50} 10\%$) نسبت به بقیه غلظت‌ها، بیشتر می‌باشد.

ضدباکتریایی بر علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها می‌باشند (Sawosz *et al.*, 2011)، اما نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که شمارش باکتریایی انتروباکترها و باکتری‌های مزوفیل در مواجهه با غلظت‌های بالای نانوذرات نقره سنتز شده به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد، اما بر روی باکتری‌های سرمادوست تأثیری نداشتند که می‌تواند به دلیل مقاوم بودن برخی سوبه‌های باکتری‌های سرمادوست نسبت به نانوذرات نقره (Kalbasi *et al.*, 2012) یا حذف باکتری‌های رقیب باشد که سبب شد با وجود غلظت زیاد نانوذرات نقره، جمعیت باکتری‌های سرمادوست به صورت باکتری‌های فرصت‌طلب اندکی افزایش پیدا کند و از تعداد آنها کاسته نشود.

نتایج حاصل از بار باکتریایی نشان‌دهنده خواص خوب ضدباکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سارگاسوم بر علیه باکتری‌های مزوفیل و انتروباکترها

REFERENCES

- Ahamed, M.; Posgai, R.; Geory, T.J.; Nielsen, M.; Hussain, S.M. and Rowe, J.J.; (2010). Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242: 263–269.
- Ahmed, M.; Karns, M.; Goodson, M.; Rowe, J.; Hussain, S.M.; Schlager, J.J.; *et al.*; (2008). DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 233: 404–410.
- Govindaraju, K.; Kiruthiga, V.; Ganesh Kumar, V. and Singaravelu, G. (2009). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a marine alga, *Sargassum wightii*, *Grevilli* and their antibacterial effects. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9: 5497-5501.
- Kalbasi, M. R.; Abdullah Zadeh, A.; Salariya Joo, H.; (2012). Effects of colloidal silver nanoparticles on the bacterial flora of the rainbow trout colony (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Veterinary Research*, 67(2): 181-189.
- Klaus, T.; Joerger, R.; Olsson, E.; Granqvist, C.G.; (1999). Silver- Based Crystalline Nanoparticles, Microbially Fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences journal*, 96: 13611-13614.
- Kumar, P.; Senthamil Selvi, S.; Lakshmi Prabha, A.; Prem Kumar, K.; Ganeshkumar, R.S.; Govindaraju, M.; (2012). Synthesis of silver nanoparticles from *Sargassum tenerrimum* and screening phytochemicals for its antibacterial activity. *Nano Biomedicine Engineering*, 4 (1): 2-16.
- Li, S.; Shen, Y.; Xie, A.; Yu, X.; Qiu, L.; Zhang, L.; Zhang, Q.; (2007). Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* leaf extract. *Green Chemistry*, 9: 852-858.
- Morones, J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Ramírez, J.T.; *et al.*; (2005). The bactericidal effect of

- silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16: 23-46.
- Nair, R.; Chabhadiya, R.; Chanda, S.; (2007). Marine algae: Screening for a potent antibacterial agent. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 7: 73-86.
- Panacek, A.; Kvittek, L.; Pucek, R.; Kolar, M.; Veerova, R.; Pizurova, N.; *et al.*; (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry*, 110: 16248-16253.
- Percival, S.L.; Bowler, P.G.; Dolman, J.; (2007). Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. *International Wound Journal*, 4: 186-191.
- Pineda, L.; Chwalibog, A.; Sawosz, E.; Lauridsen, C.; Engberg, R.; Elnif, J.; Hotowy, A.; Sawosz, F.; Gao, Y.; Ali, A.; Sepehri Moghaddam, H.; (2012). Effect of silver nanoparticles on growth performance, metabolism and microbial profile of broiler chickens, *Archives of Animal Nutrition*, 66(5): 416-429.
- Rather, MA.; Sharma, R.; Aklakur, M.; Ahmad, S.; Kumar, N.; Khan, M.; *et al.*; (2011). A Novel Tool for Aquaculture and Fisheries Development. A Prospective Mini-Review. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 16: 1-5.
- 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). *Journal of Applied Microbiology*, 89: 317-322.
- Sawosz, E.; Chwalibog, A.; Mitura, K.; Mitura, S.; Awzeliga J.; Niemiec, T.; *et al.*; (2011). Visualisation of morphological interaction of diamond and silver nanoparticles with *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11:7635-7641.
- Shahverdi, A.R.; Fakhimi, A.; Shahverdi, H.R.; Minaian, S.; (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine*, 3:168-171.
- Shrivastava, S.; Bera, T.; Roy, A.; Singh, G.; Ramachandrarao, P.; Dash, D.; (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18: 225103-225111.
- 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*. *International Journal of Veterinary Research*, 3: 137-142.
- Song, K.C.; Lee, S.M.; Park, T.S.; Lee, B.S.; (2009). Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. *Korean Journal of Chemistry Engineering*, 26: 153-155.
- Suriya, J.; Bharathi R.S.; Sekar, V. and Rajasekaran, R.; (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity using seaweed *Urospora* sp. *African Journal of Biotechnology*, 11(58): 12192-12198.
- Uddin, N.; Al-Harbi, A.H.; (2012). Bacterial flora of polycultured common carp (*Cyprinus carpio*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). *International Aquatic Research*, 4:1-10.