

بررسی تغییرات فلور باکتریایی روده و پوست ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) تحت تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی

زهرة خورشیدی^{۱*}، محمدرضا کلباسی^۲، شهریار بهروزی^۳

تاریخ دریافت: بهمن ۹۴

تاریخ پذیرش: اسفند ۹۴

چکیده

هدف این مطالعه بررسی تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی بر تغییر فلور باکتریایی بافت‌های روده و پوست ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) است. پس از تعیین غلظت کشندگی کلوئید نانونقره برای این ماهی، نمونه‌های ماهیان به مدت ۱۴ روز در معرض غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵mg/L نانونقره قرار گرفتند (در ۳ تکرار). غلظت صفر نانونقره نیز به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. سپس جمعیت باکتری‌های کل، مزوفیل، انتروباکتریاسه و اسید لاکتیکی در بافت‌های روده و پوست ماهی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره، جمعیت میکروفلورهای اندازه‌گیری شده به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) کاهش یافت. به علاوه کاهش جمعیت باکتری‌های موجود در بافت پوست نسبت به بافت روده بیش‌تر بود. همچنین در طی دوران نگهداری ماهی، باکتری‌های انتروباکتریاسه و باکتری‌های اسیدلاکتیکی در بافت‌های روده و پوست به ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین تغییرات را داشتند. این مطالعه به وضوح نشان داد که خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره بسته به گروه‌های مختلف باکتریایی متفاوت است. بنابراین، با توجه به نقش پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیکی در روده ماهیان، حساسیت و کاهش جمعیت آن‌ها در برابر نانونقره ممکن است سیستم ایمنی ماهیان را تحت تاثیر قرار دهد.

واژگان کلیدی: نانونقره، مزوفیل‌ها، انتروباکتریاسه، باکتری‌های اسید لاکتیکی، کپور علفخوار.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۳- مربی پژوهشی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران.

* نویسنده مسئول: Zhre.khorshidi@yahoo.com

مقدمه

بر روی باکتری‌ها اثبات شده اما مکانیزم دقیق آن تاکنون مشخص نشده است. این سمیت ممکن است مرتبط با ویژگی‌های نانونقره یا ناشی از تاثیر یون نقره، همچنین بر اثر آسیب‌رسانی به دیواره سلولی، استرس اکسیداتیو و یا برهم‌کنش بین یون نقره با پروتئین‌ها و آنزیم‌ها باشد (Choi et al., 2008). تاکنون مطالعات متعددی مشخص کرده است که نانونقره سبب افزایش استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی، کاهش عملکرد میتوکندری، کاهش رشد و در غلظت‌های بالا سبب مرگ آبزیان می‌شود (Arora et al., 2008). اما در مورد تاثیر خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره بر جمعیت فلور باکتریایی آبزیان مطالعات محدودی صورت گرفته است. از این رو هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی تأثیر نانوذرات نقره کلونیدی بر میکروفلور بافت‌های پوست و روده ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) است.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی، محیط‌های کشت باکتری و نانوذرات نقره
 بچه ماهیان کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) با متوسط

رشد کنونی صنعت نانوتکنولوژی و افزایش انواع تولیدات نانوذرات مهندسی شده به دلیل خصوصیات ویژه آن‌ها سبب شده تا جایگاه ویژه‌ای را در اقتصاد جهانی به خود اختصاص دهند. افزایش تولید و استفاده از نانوذرات به ناچار منجر به افزایش رهایش نانومواد به محیط خواهد شد. محیط‌های آبی نسبت به محیط‌های خشکی آسیب‌پذیرتر هستند، به این خاطر که ممکن است به عنوان یک مخزن برای تخلیه بسیاری از مواد شیمیایی عمل کنند. تا کنون اطلاعات اندکی درباره سرنوشت نانوذرات در محیط آبی، تعامل آن‌ها با اجزای زنده و غیرزنده و پتانسیل نانوذرات برای آسیب‌رسانی به آن‌ها به دست آمده است. عدم وجود اطلاعات کافی در این زمینه، نگرانی‌های زیادی را در رابطه با خطرات آن‌ها برای سلامتی انسان و محیط زیست ایجاد کرده است (Kim et al., 2007).

نانوذرات نقره به دلیل خواص ضد میکروبی خود بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و در تولید محصولات مختلف از جمله شوینده‌ها، بانداژ زخم، بسته‌بندی و نگهداری مواد غذایی، لوازم منزل، رنگ‌ها و مکمل‌های غذایی استفاده می‌شوند (Asz et al., 2006). سمیت نانونقره

لیتر آب، به مدت یک هفته با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند. در طی این مدت ماهی‌ها با غذای تجاری ساخت کارخانه به‌دانه (بابلسر، ایران) تغذیه شدند. به منظور جلوگیری از جذب نانوذرات نقره به مواد غذایی و مدفوع ماهیان، غذادهی ۴۸h قبل از شروع قرار گرفتن در معرض نانوذرات نقره قطع شد. برای تعیین محدوده کشندگی (LC_{50})، ماهیان به مدت ۷۲h در معرض غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱mg/L نانوذرات نقره کلوئیدی قرار گرفتند. با توجه به محدوده کشندگی، غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵mg/L به عنوان غلظت‌های مؤثر در نظر گرفته شد و ماهیان به مدت ۱۴روز (در ۳ تکرار) تحت تأثیر نانوذرات نقره در غلظت‌های مذکور قرار گرفتند. از مخزن آب بدون نانوذرات نقره (غلظت صفر) به عنوان شاهد استفاده شد. بر اساس روش استاندارد سازمان همکاری اقتصادی و توسعه (OECD) آب مخازن هر ۴۸h تعویض و نانوقره در غلظت قبلی به آن اضافه شد (Kalbassi et al., 2012).

آماده‌سازی نمونه

ابتدا ۳ ماهی از هر مخزن به طور تصادفی انتخاب و با ضربه مکانیکی به سر، حیوان

وزن $32 \pm 8g$ به طول $13 \pm 2cm$ از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی شهید رجایی (ساری) خریداری و به کارگاه تکثیر و پرورش پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شدند. محیط کشت‌های باکتریایی Trypticase Soy Agar (TSA)، Plate Count Agar (PCA)، Violet Red Bile Glucose Agar deMan Rogosa and (VRBGA) و Sharpe Agar (MRS) از نمایندگی شرکت مرک آلمان در ایران تهیه شد. نانوقره نقره (Ag- NPs) با نام تجاری Nanocid با غلظت ۴۰۰۰mg/L از شرکت نانو نصب پارس خریداری شد. اندازه نانوذرات موجود در کلوئید نانوقره مصرفی $163/5nm - 3/9$ (میانگین قطر $54/8nm$) و متوسط اندازه آن در حالت خشک $25/9nm$ بود (Johari et al., 2013). مراحل تحقیقاتی این مطالعه در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر واقع در فرح‌آباد ساری انجام شد.

شرایط نگهداری ماهی

جهت تطابق شرایط آزمایشگاهی با شرایط طبیعی، آب مصرفی در انجام این پژوهش، از رودخانه تجن تامین شد. تعداد ۳۶۰ ماهی پس از توزیع در ۱۲ مخزن ۳۰۰ لیتری حاوی ۱۰۰

میکروسمپلر به پتری‌دیش خالی منتقل شد. سپس یک لایه نازک از محیط کشت به آن اضافه و به صورت سینوسی تکان داده شد تا نمونه با محیط کشت به خوبی مخلوط شود. پس از سرد شدن و انعقاد لایه اول، لایه نازک دیگری از محیط کشت به پتری‌دیش اضافه شد. سپس پلیت‌های کشت داده شده بعد از ۲۴h انکوباسیون در دمای 37°C شمارش شدند (Moretro et al., 2013).

برای شمارش باکتری‌های مزوفیل موجود در روده و پوست ماهی کپور علفخوار از محیط کشت PCA استفاده شد. بعد از آماده‌سازی محیط کشت، مقدار $100\mu\text{L}$ از نمونه‌های رقیق شده به روش Pour plate کشت داده شدند. انکوباسیون پتری‌دیش‌های مذکور ۴۸h در دمای 37°C انجام شد (Audenaert et al., 2010).

از محیط کشت MRS برای شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیکی استفاده شد. تلقیح نمونه به محیط کشت مانند روش ذکر شده برای باکتری‌های انتروباکتریاسه انجام شد. سپس پرگنه‌های رشد یافته بعد از ۷۲h انکوباسیون در جار بی‌هوای با استفاده از گازپک نوع A در دمای 37°C شمارش شدند (Yi et al., 2011). داده‌های حاصل از

بی‌حرکت شد. در شرایط کاملاً استریل، از پوست ماهی (به مساحت $1\times 1\text{cm}^2$) و بخشی از ابتدای روده میانی ماهی نمونه‌برداری شد. پس از توزین نمونه، نمونه‌ها در ظرف استریل به قطعات ریزتری تقسیم و با سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ (۹ برابر وزن نمونه) با استفاده از دستگاه همگن‌کننده (ورتکس) به مدت ۲min هموژن شد. جهت شمارش فلور باکتریایی بافت‌های پوست و روده، رقت‌های سریالی (۱:۱۰) از محلول هموژن تهیه شد (Askarian et al., 2012).

تهیه محیط‌های کشت، انکوباسیون و شمارش باکتری

به منظور شمارش باکتری‌های کل از محیط کشت TSA استفاده شد. مقدار $100\mu\text{L}$ از نمونه‌های رقیق شده توسط میکروسمپلر به محیط کشت منعقد شده اضافه و به صورت سطحی کشت داده شد. جهت شمارش باکتری‌های کل، انکوباسیون پلیت‌های کشت داده شده ۲۴-۴۸h در دمای $20-25^{\circ}\text{C}$ صورت گرفت (Da Silva et al., 2002).

شمارش انتروباکتریاسه‌ها با استفاده از محیط کشت VRBGA صورت گرفت. مقدار $100\mu\text{L}$ از نمونه‌های رقیق شده توسط

شمارش چشمی پتری‌دیش‌ها در عکس رقت مربوطه ضرب و در نهایت به صورت لگاریتم تعداد پرگنه در هر گرم نمونه ($\log \text{CFU/g}$) گزارش شدند (Schelegueda et al., 2012).

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار صورت گرفت و نتیجه به صورت میانگین با انحراف معیار گزارش شد. آنالیز آماری داده‌ها توسط جدول آنالیز واریانس دوطرفه (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS 19.0 صورت گرفت. تفاوت معنی‌داری میانگین‌ها بر اساس پس‌آزمون دانکن در سطح خطای ۵٪ ($P < 0.05$) انجام گرفت و در نهایت نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel 2010 رسم شدند (Schelegueda et al., 2012).

نتایج

آب مصرف شده دارای میانگین دمای 25°C ، شوری $3/2 \text{ppt}$ ، pH $7/8$ ، مواد جامد محلول 570mg/L ، آمونیوم $0/077 \text{mg/L}$ ، نیترات $0/607 \text{mg/L}$ ، نیتريت $0/023 \text{mg/L}$ ، فسفات $0/122 \text{mg/L}$ و اکسیژن محلول 8mg/L بود. محدوده کشندگی نانوقره برای ماهی کپور علفخوار در مدت زمان ۷۲h مورد

آزمایش قرار گرفت، که این میزان $0/7 \text{mg/L}$ تخمین زده شد. در ابتدای دوره میانگین تعداد باکتری‌های کل، انتروباکتریاسه، مزوفیل و باکتری‌های اسیدلاکتیک در بافت روده به ترتیب برابر $8/393$ ، $6/221$ ، $7/405$ و $5/172 \log \text{CFU/g}$ و در بافت پوست برابر $6/204$ ، $5/162$ ، $5/132$ و $3/521 \log \text{CFU/g}$ بود.

نتایج نشان دادند میانگین تعداد باکتری‌های کل در بافت روده با افزایش غلظت نانوقره به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$ ؛ شکل ۱). در بافت پوست نیز روند تغییرات به همین صورت بود اما این تفاوت در غلظت‌های $0/5$ و $0/25 \text{mg/L}$ معنی‌دار نبود.

همان طور که شکل ۲ نشان می‌دهد جمعیت باکتری‌های انتروباکتریاسه در بافت روده بیش‌تر از بافت پوست بود. باکتری‌های انتروباکتریاسه مشابه باکتری‌های کل با افزایش غلظت نانوقره سیر نزولی داشتند، که این میزان کاهش در بافت پوست بیش‌تر از بافت روده بود. به این ترتیب که در بافت روده از مقدار اولیه $6/221$ به $5/716 \log \text{CFU/g}$ و در بافت پوست از مقدار اولیه $5/162$ به $4/025 \log \text{CFU/g}$ کاهش یافت.

تغییرات مربوط به باکتری‌های انتروباکتریاسه بافت روده در غلظت $0/125 \text{mg/L}$ ($1/35\%$) بود. بررسی درصد تغییرات در میکروفلورهای بافت‌های پوست و روده، به وضوح این نکته را نمایان کرد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره، تعداد باکتری‌های موجود در بافت‌های مذکور کاهش یافت. همچنین نتایج حاصل نشان دادند که بافت پوست نسبت به بافت روده بیش‌تر تحت تأثیر نانوذرات نقره قرار گرفته است. در بافت پوست باکتری‌های کل $5/6\%$ ، باکتری‌های مزوفیل $9/5\%$ ، باکتری‌های انتروباکتریاسه $13/9\%$ و باکتری‌های اسیدلاکتیکی $6/5\%$ بیش‌تر از باکتری‌های موجود در بافت روده کاهش یافتند.

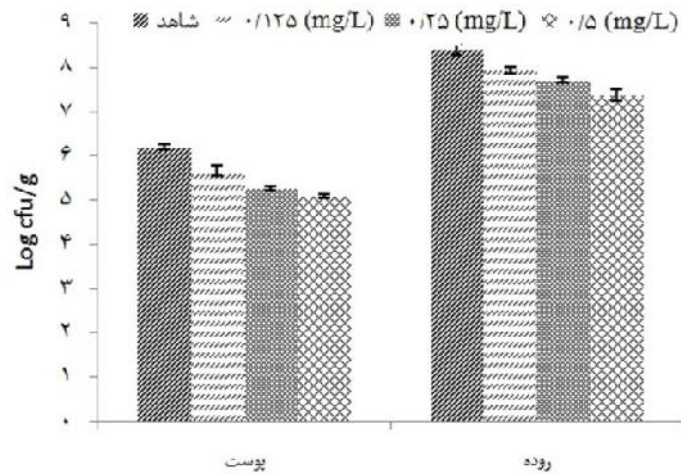
مقایسه نتایج حاصل از درصد تغییرات میکروفلور بافت روده نشان داد که باکتری‌های اسیدلاکتیکی نسبت به سایر باکتری‌ها حساس‌تر بوده، با $19/12\%$ کاهش در جمعیت آن‌ها، نسبت به سایرین بیش‌تر تحت تأثیر قرار گرفت. کم‌ترین تغییرات میکروفلور در این بافت مربوط به باکتری‌های انتروباکتریاسه با $8/12\%$ کاهش در جمعیت اولیه آن‌ها بود. در بافت پوست نیز همانند بافت روده، باکتری‌های اسیدلاکتیکی میزان آسیب‌پذیری بیش‌تری را نسبت به سایر میکروفلورها نشان دادند و

روند تغییرات در جمعیت باکتری‌های مزوفیل در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج آنالیز واریانس نشان داد در بافت روده اختلاف معنی‌داری ($P < 0/05$) بین تعداد باکتری‌های مزوفیل در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره وجود داشت. در بافت پوست نیز همانند بافت روده با افزایش غلظت نانونقره، تعداد باکتری‌های مزوفیل به طور معنی‌داری کاهش یافت اما بین غلظت‌های $0/25$ و $0/125 \text{mg/L}$ تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد.

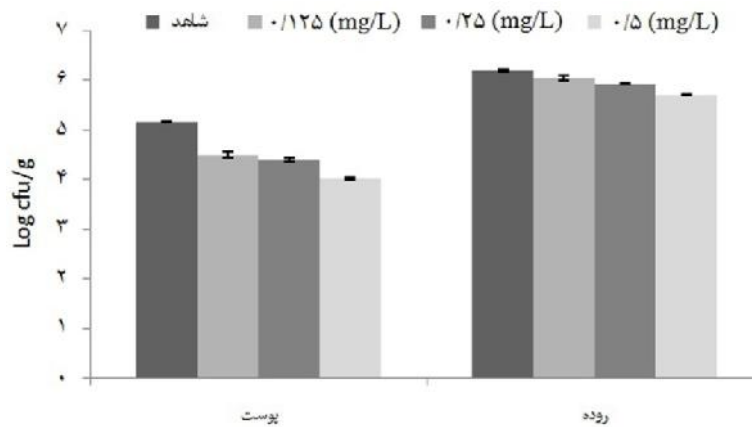
افزایش غلظت نانونقره در محیط آبی همانند سایر میکروفلورهای گزارش شده، به طور معنی‌داری سبب کاهش جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیکی موجود در بافت‌های پوست و روده ماهی کپور علفخوار شد (شکل ۴). به طور کلی تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیکی در بافت پوست از مقدار اولیه $3/521$ به $2/631 \log \text{CFU/g}$ و در بافت روده از $5/172$ به $4/183 \log \text{CFU/g}$ کاهش یافت.

درصد تغییرات میکروفلور بافت‌های پوست و روده در شکل ۵ نشان داده شده است. بیش‌ترین درصد تغییرات مربوط به باکتری‌های اسیدلاکتیکی بافت پوست در غلظت $0/5 \text{mg/L}$ ($25/267\%$) و کم‌ترین درصد

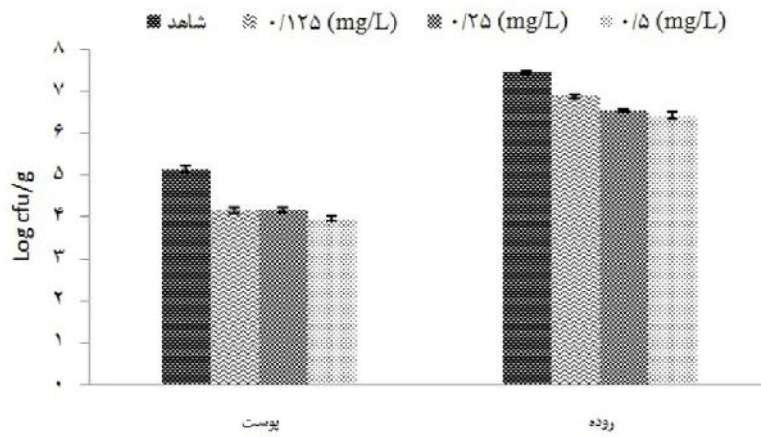
کمترین میزان آسیب‌پذیری مربوط به باکتری‌های کل بود.



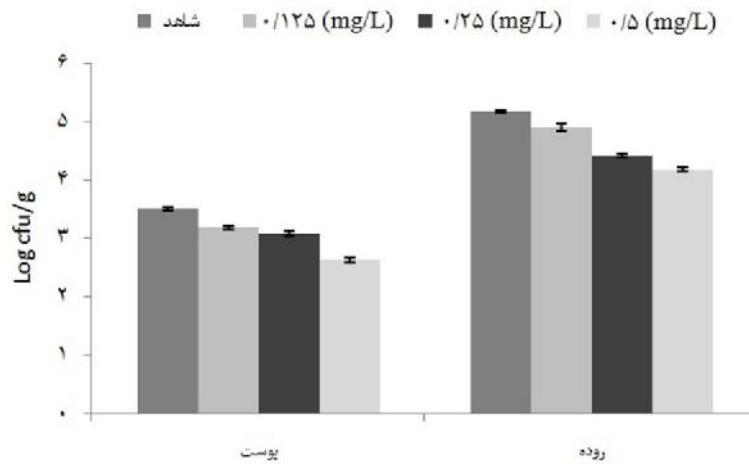
شکل ۱: تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی بر تغییرات جمعیت باکتری‌های کل در بافت‌های پوست و روده ماهی کپور علفخوار



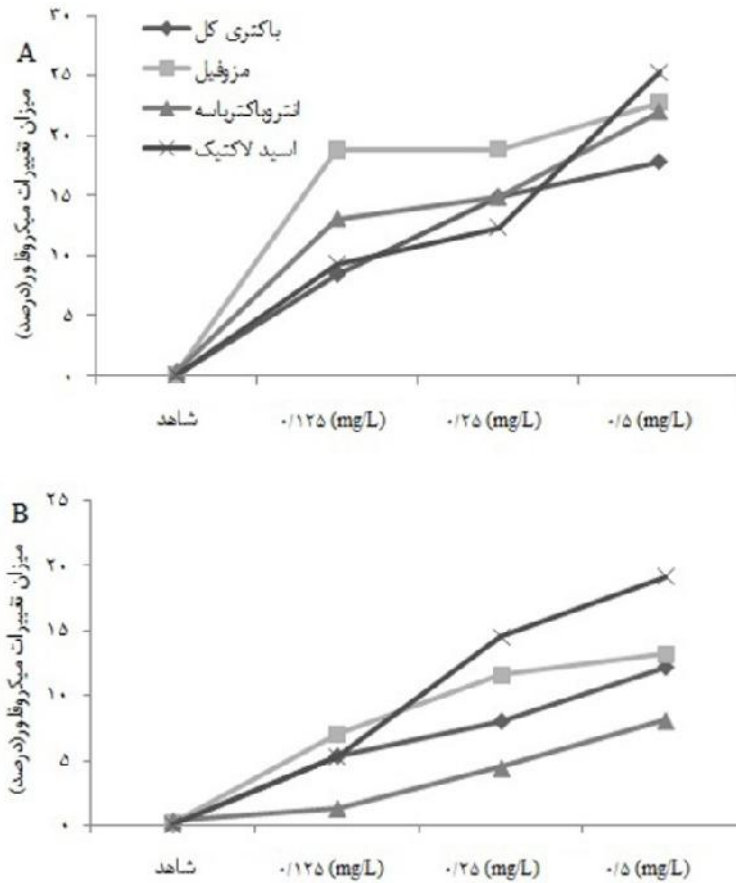
شکل ۲: تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی بر تغییرات جمعیت باکتری‌های انتروباکتریاسه بافت‌های پوست و روده ماهی کپور علفخوار



شکل ۳: تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی بر تغییرات جمعیت باکتری‌های مزوفیل بافت‌های پوست و روده ماهی کپور علفخوار



شکل ۴: تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی بر تغییرات جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک بافت پوست و روده ماهی کپور علفخوار



شکل ۵: درصد تغییرات فلور باکتریایی بافت‌های پوست (A) و روده (B) ماهی کپور علفخوار

باکتریایی موجود در بافت پوست به علت تماس بیشتر با محیط و نوشیدن کم‌تر آب توسط ماهیان آب شیرین، به مراتب بیش‌تر از بافت روده در برابر نانونقره تحت تاثیر قرار گرفتند. جمعیت کل باکتری‌های اندازه‌گیری شده در بافت‌های روده و پوست ماهی کپور علفخوار به ترتیب $8/393$ و $6/204 \log \text{CFU/g}$ محاسبه

بحث
عوامل متعددی مانند شرایط محیط پرورشی، تغذیه، نوع گونه و میزان استرس ماهی روی فلور باکتریایی ماهیان مؤثر است (Ringo and Birkbeck, 1999). با مقایسه میزان تغییرات فلور میکروبی بافت‌های پوست و روده کپور علفخوار مشاهده شد که فلور

شد که با نتایج حاصل از مطالعه Sugita و همکاران در سال ۱۹۸۵ مطابقت داشت اما با نتایج به دست آمده توسط Bairagi و همکاران در سال ۲۰۰۲ که میزان آن‌ها را $5/3 \log \text{CFU/g}$ گزارش کرده بودند، مغایرت داشت. اختلاف مشاهده شده می‌تواند ناشی از عوامل محیطی و اندازه ماهی باشد. تعداد کل باکتری‌های اندازه‌گیری شده در بافت‌های روده و پوست پس از ۱۴ روز قرار گرفتن در معرض $0/5 \text{mg/L}$ نانوذرات نقره کلئیدی به ترتیب با کاهش ۱۲/۳٪ و ۱۷/۸۶٪ از مقدار اولیه آن‌ها به ترتیب به $7/369$ و $5/096 \log \text{CFU/g}$ رسید. با مقایسه درصد کاهش در باکتری‌های کل با سایر میکروفلور مورد مطالعه در این آزمایش این نکته حائز اهمیت است که با وجود کاهش چشمگیر در باکتری‌های اسیدلاکتیکی و مزوفیل بافت‌های پوست و روده، تعداد باکتری‌های کل به میزان کم‌تری آسیب دید. این مطلب می‌تواند نمایانگر این نکته باشد که با کاهش جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک و مزوفیل، فرصت برای رشد سایر گونه‌ها فراهم شد و یا ممکن است گونه‌هایی وجود داشته باشند که نانونقره توانایی کنترل رشد آن‌ها را به طور کامل نداشته باشد (Sondi and Salopek-Sondi, 2004).

تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیکی محاسبه شده در ابتدای دوره در بافت‌های روده و پوست نمونه شاهد به ترتیب برابر با $5/172$ و $3/521 \log \text{CFU/g}$ بود که با قرار گرفتن در معرض نانونقره به مدت ۱۴ روز به $4/183$ و $2/631 \log \text{CFU/g}$ رسید. باکتری‌های اسیدلاکتیکی با کاهش ۱۹/۱۲٪ مقدار اولیه در بافت روده و ۲۵/۲۸٪ مقدار اولیه در بافت پوست، بیش‌ترین آسیب را در برابر نانونقره متحمل شدند. با توجه به این که باکتری‌های اسیدلاکتیکی می‌تواند نقش پروبیوتیک را در دستگاه گوارش ماهیان ایفا کنند، بنابراین کاهش جمعیت آن‌ها ممکن است سیستم ایمنی ماهیان را تحت تاثیر قرار دهد (Naidu et al., 1999). باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در دستگاه گوارش ماهیان عموماً قابلیت رشد در محیط‌هایی با pH پایین را دارند (محمدیان و همکاران، ۱۳۹۳). با توجه به اسیدی نبودن دستگاه گوارش کپورماهیان و افزایش غلظت نمک‌های صفاوی در برابر نانوذرات نقره و در پی آن افزایش pH دستگاه گوارش، می‌توان چنین استنباط کرد که شرایط محیطی برای تکثیر و رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک نامساعد شده، سبب افزایش آسیب‌پذیری آن در برابر نانوذرات نقره نسبت

مکانیزم اثر نانوقره را بر باکتری *E. coli* به عنوان مدلی برای باکتری‌های انتروباکتریاسه بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد نانوذرات نقره می‌توانند سبب جلوگیری از رشد و طولانی کردن فاز تاخیری رشد این باکتری شوند. همچنین با بررسی ساختار غشا سلولی باکتری *E. coli* بیان کردند که غشاء خارجی سلول‌های *E. coli* از دو لایه لیپیدی نامتقارن تشکیل شده که لایه خارجی را مولکول‌های به هم فشرده لیپیدی تشکیل می‌دهند. این لایه نقش اساسی در ایجاد یک سد نفوذپذیر انتخابی برای حفاظت این باکتری و سایر باکتری‌های گرم منفی در برابر مواد شوینده، سموم، آنزیم‌های تجزیه کننده و مواد مغذی ایجاد می‌کند (Li et al., 2010).

جمع‌بندی کلی موید آن است که با افزایش غلظت نانوذرات نقره، جمعیت‌های باکتریایی اندازه‌گیری شده به طور معنی‌داری کاهش یافتند ($P < 0.05$). به علاوه کاهش جمعیت باکتری‌های موجود در بافت پوست نسبت به بافت روده بیش‌تر بود. همچنین در طی دوران نگهداری ماهی، باکتری‌های انتروباکتریاسه و اسیدلاکتیک باکتری‌ها در بافت‌های روده و پوست به ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین تغییرات را داشتند. این مطالعه به وضوح نشان داد که

به سایر میکروفلورهای اندازه‌گیری شده در پژوهش حاضر شده است (Chateau et al., 1994). نتایج حاصل از مطالعه انجام شده توسط سالاری‌جو و همکاران در سال ۱۳۹۱ نشان داد اثر ضد میکروبی نانوقره بر روی باکتری‌های اسیدلاکتیک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) معنی‌دار نبود. علت این تفاوت را می‌توان به تفاوت شرایط محیط دستگاه گوارش دو گونه نسبت داد.

درصد تغییرات جمعیت باکتری‌های مزوفیل در بافت‌های روده و پوست پس از ۱۴ روز تحت تاثیر 0.5 mg/L نانوقره به ترتیب برابر ۱۳/۲۱٪ و ۲۲/۷۶٪ مقدار اولیه بود. اما در نتایج به دست آمده توسط کلباسی و همکاران در سال ۱۳۹۱ که جمعیت باکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی را مورد بررسی قرار دادند، کاهش باکتری‌های مزوفیل معنی‌دار نبود. علت این امر می‌تواند ناشی از تفاوت گونه و شرایط پرورشی باشد.

جمعیت باکتری‌های انتروباکتریاسه نیز با افزایش غلظت نانوذرات نقره کاهش یافت، اما روند کاهش آن‌ها نسبت به سایر جمعیت‌های باکتریایی اندازه‌گیری شده کم‌تر بود. در مطالعه‌ای، Li و همکاران در سال ۲۰۱۰

ویژگی‌های ضدباکتریایی نانوذرات نقره بسته به گروه‌های مختلف باکتری‌ها متفاوت است. بنابراین، با توجه به حساسیت بیشتر باکتری‌های اسیدلاکتیک و میزان تغییرات میکروفلور بافت‌های پوست و روده، احتمالاً سیستم ایمنی ماهی دچار ضعف شده، ماهی بیش‌تر مستعد بیماری‌های عفونی می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر رضا پورغلام (رئیس وقت پژوهشکده اکولوژی

دریای خزر) به خاطر حمایت‌هایشان در اجرای پروژه و همچنین از همکاری‌های صمیمانه جناب آقای دکتر مهدی نادری جلودار تشکر می‌نماییم. از پرسنل محترم بخش‌های تخصصی بهداشت و بیماری‌های آبزیان و آبی‌پروری پژوهشکده اکولوژی دریای خزر به دلیل مهیا نمودن شرایط انجام و همکاری در انجام کارهای فنی و آزمایشگاهی کمال تشکر را داریم.

منابع

- مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۷(۲): ۱۸۹-۱۸۱.
- محمدیان ت.، قربانپور م.، علیشاهی م.، تابنده م. و غریبی د. ۱۳۹۳. جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیل‌های با توان پروبیوتیکی از روده ماهی شیریت. مجله دامپزشکی ایران، ۱۰(۲): ۸۸-۹۷.
- Arora S., Jain J., Rajwade J.M. and Paknikar K.M. 2008.** Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 179(2): 93-100.
- Askarian F., Zhou Z., Olsen R.E., Sperstad S. and Ringo E. 2012.** Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture*, 326: 1-8.
- Asz J., Asz D., Moushey R., Seigel J., Mallory S.B. and Foglia R.P. 2006.** Treatment of toxic epidermal necrolysis in a pediatric patient with a nanocrystalline silver dressing. *Journal of Pediatric Surgery*, 41(12): 9-12.
- Audenaert K., D'Haene K., Messens K., Ruysen T., Vandamme P. and Huys G. 2010.** Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 27(1): 12-18.
- Bairagi A., Ghosh K.S., Sen S.K. and Ray A.K. 2002.** Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10(2): 109-121.
- Chateau N., Deschamps A.M. and Sassi A.H. 1994.** Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Letters in Applied Microbiology*, 18(1): 42-44.
- Choi O., Deng K.K., Kim N.J., Ross L., Surampalli R.Y. and Hu Z. 2008.** The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on
- سالاری جو ح.، کلباسی م. و عبداللهزاده ا. ۱۳۹۱. تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی بر فلور باکتریایی پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. *اقیانوس شناسی*، ۳(۱۱): ۸۳-۹۰.
- کلباسی م.، عبداللهزاده ا. و سالاری جو ح. ۱۳۹۱. تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی بر فلور باکتریایی پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.

- microbial growth. *Water Research*, 42(12): 3066–3074.
- Da Silva M.V., Pinho O., Ferreira I., Plestilová L. and Gibbs P.A. 2002.** Production of histamine and tyramine by bacteria isolated from Portuguese vacuum-packed cold-smoked fish. *Food Control*, 13(6): 457–461.
- Johari S.A., Kalbassi M.R., Soltani M. and Yu I.J. 2013.** Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(1): 76–95.
- Kalbassi M.R., Abdollahzadeh E. and Salari-Joo H. 2012.** Effect of colloidal silver nanoparticles on population of gut bacterial flora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Veterinary Research*, 67(2): 181–189.
- Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C.Y. and Kim Y.K. 2007.** Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1): 95–101.
- Li W.R., Xie X.B., Shi Q.S., Zeng H.Y., You-Sheng O.Y. and Chen Y.B. 2010.** Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4): 1115–1122.
- Moretro T., Langsrud S. and Heir E. 2013.** Bacteria on meat abattoir process surfaces after sanitation: Characterisation of survival properties of *Listeria monocytogenes* and the commensal bacterial flora. *Advances in Microbiology*, 3(3): 255–261.
- Naidu A.S., Bidlack W.R. and Clemens R.A. 1999.** Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Food Science and Nutrition*, 39(1): 13–126.
- Ringo E. and Birkbeck T.H. 1999.** Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, 30(2): 73–93.
- Schelegueda L.I., Gliemmo M.F. and Campos C.A. 2012.** Antimicrobial synergic effect of chitosan with sodium lactate, nisin or potassium sorbate against the bacterial flora of fish. *Journal of Food Research*, 1(3): 272–278.
- Sondi I. and 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.
- Sugita H., Tokuyama K. and Deguchi Y. 1985.** The intestinal microflora of carp *Cyprinus carpio*, grass carp *Ctenopharyngodon idella* and tilapia *Sarotherodon niloticus*.

Bulletin of the Japanese Society
for the Science of Fish, 51(8):
1325–1329.

**Yi S., Li J., Zhu J., Lin Y., Fu L.,
Chen W. and Li X. 2011.** Effect

of tea polyphenols on
microbiological and biochemical
quality of *Collichthys* fish ball.
Journal of the Science of Food and
Agriculture, 91(9): 1591–1597.



Evaluation of changes in the bacterial flora population of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) intestine and skin under the influence of colloidal silver nanoparticles

Zohre Khorshidi^{1*}, Mohammad Reza Kalbassi², Shahryar Behrouzi³

Received: February 2016

Accepted: March 2016

Abstract

The aim of this study was evaluated the effect of colloidal silver nanoparticles on changes of intestine and skin tissues microflora population. After determination of colloidal nanosilver lethal concentration on grass carp, the fish samples were exposed to concentrations of 0.125, 0.25 and 0.5 mg/L nanosilver for 14 days (triplicate). The zero concentration of nanosilver was used as control sample. Then total count, mesophilla, Enterobacteriaceae and lactic acid bacteria population in intestine and skin tissues of fish were determined. The results indicated that increasing concentrations of nanosilver reduces the measured microflora population significantly. So that decreasing in bacterial population of skin was higher compared to the intestinal tissue. Also, results showed the Enterobacteriaceae and lactic acid bacteria in skin and intestine tissues were lowest and showed highest damage, respectively. This study clearly demonstrated that the antibacterial properties of silver nanoparticles was varies depending on different bacterial groups. Therefore, regard to probiotics role of lactic acid bacteria in fish intestine, sensitivity and reduction of their population to nanosilver, the fish immune system may be affected.

Key words: *Nanosilver, Mesophilla, Enterobacteriaceae, Lactic Acid Bacteria, Grass Carp.*

1- M.Sc. Student in Fisheries, Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

2- Professor in Aquaculture Department, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

3- Scientific Member in Ecology Institute of Caspian Sea, Sari, Iran.

*Corresponding Author: Zhre.khorshidi@yahoo.com