

"مقاله پژوهشی"

بررسی اثر ضد میکروبی کلونید نانوذرات نقره علیه باکتری‌های *Vibrio harveyi* و *Bacillus spp.* و سینتیک رشد آنها

محمود نفیسی بهابادی^۱، فاطمه حسین پوردلاور^{۲*}، مریم میربخش^۳، خدابخش نیکنام^۴، سیدعلی جوهری^۵

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

۲- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

۳- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، پژوهشکده میگو کشور، بوشهر، ایران

۴- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

۵- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۶/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۱

چکیده

شیوع عفونت‌های میکروبی در آبزیان از چالش‌های مهم بهداشتی محسوب می‌شود و آبرزی پروران در این زمینه با مشکلات عدیده‌ای بویژه مقاومت باکتری‌ها نسبت به پادزیست‌ها مواجه هستند. هدف این پژوهش، ارزیابی مقایسه‌ای فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره علیه دو نمونه باکتری گرم مثبت (*Bacillus spp.*) و گرم منفی (*Vibrio harveyi*) بود. در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی کلونید نانوذرات نقره از روش انتشار چاهک با استفاده از اندازه‌گیری قطر هاله مهار، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی توسط روش رقیق‌سازی در لوله و سنجش سینتیک رشد بر روی این دو گونه باکتریایی استفاده شد. بر اساس تست انتشار چاهک در آگار، بیشترین میزان هاله عدم رشد مربوط به باکتری باسیلوس با قطر 0.15 ± 0.44 میلی‌متر مشاهده شد. حداقل غلظت مهار کنندگی در دو باکتری *Bacillus spp.* و *V. harveyi* به ترتیب ۱/۹۵ و ۳/۹۱ و حداقل غلظت کشندگی نیز ۳/۹۱ میلی گرم در میلی‌لیتر بود. بررسی سینتیک رشد نیز نتایج به دست آمده بود، به طوری که رشد باکتری‌های *Bacillus spp.* ۵ ساعت و *V. harveyi* ۶ ساعت بعد از مواجهه با نانوذرات نقره متوقف شد. این مطالعه نشان داد که کلونید نانوذرات نقره اثرات ضدباکتریایی بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی دارد. و البته می‌تواند به عنوان گزینه مناسبی برای حذف هر دو نوع باکتری گرم مثبت و منفی، بویژه حذف باکتری‌های عفونت‌زای آبزیان استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: آبرزی پروری، حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت کشندگی، ضدباکتریایی، هاله عدم رشد.

مقدمه

آبرزی پروری به عنوان یکی از اصلی ترین منابع تولیدات مواد غذایی پروتئینی در جهان به شمار می رود. اخیراً به علت فعالیت های پرورش متراکم، شیوع بیماری های عفونی، بویژه انواع بیماری های باکتریایی، یکی از مشکلات اساسی در صنعت آبرزی پروری به شمار می آید که باعث بروز خسارات فراوان به تولید کننده ها شده است (حسینی و حاجی رضایی، ۱۳۹۳؛ قائدینا و همکاران، ۱۳۹۹). در طی ۲۰ سال گذشته راه های مختلفی از قبیل استفاده از کنترل کننده های شیمیایی و پادزیست ها توسط پرورش دهندگان در کاهش و پیشگیری از این بیماری ها ارائه شده است (Mesalhy Aly et al., 2008). با توجه به توسعه گونه های جدید باکتری های مقاوم به پادزیست ها، مسئله باقیمانده دارو در بافت های آبریان و مشکلات زیست محیطی، هم چنین محدودیت استفاده از پادزیست ها، توسعه قابلیت های جدید برای محافظت در برابر باکتری ها نیازی ضروری است. استفاده از ترکیبات ضد میکرو ارگانیسم پایدار که باعث ایجاد مقاومت در میکرو ارگانیسم ها نشوند اجتناب ناپذیر است (Sharma et al., 2009).

باکتری گرم منفی ویبریو هاروی عامل بیماری ویبریوزیس درخشان یکی از جدی ترین و مهم ترین عفونت های باکتریایی در مزارع تکثیر و پرورش میگو بوده که سبب بی اشتهایی، تغییرات رفتاری، عفونت های دهانی و روده ای و نیز سپتی سمی و تلفات بالا در مراحل پست لاروی و جوانی میگوها می گردد (Nash et al., 1990; De la Peña et al., 1995). این باکتری که جزو میکرو فلور آب دریا می باشد (Karunasagar et al., 1994)، یک باکتری میله ای، غیر اسپورزا و گرم

منفی، اکسیداز مثبت، نمک دوست، متحرک و بی هوازی اختیاری می باشد (Lightner, 1992; Austin, 2010). معمولاً در محیط های آبی بویژه در میان سخت پوستان بالاترین میزان شیوع را دارا است (Gabriel and Felip, 2000).

باسیلوس ها نیز جزئی از فلور دستگاه گوارش آبریان بویژه میگوها محسوب می شوند و هم چنین در صنعت پرورش میگو به عنوان پروبیوتیک استفاده می شوند (Purivirojkul & Areechon, 2007). از طرفی این گروه پس از مرگ آبریان جزء اولین گروه باکتری هایی هستند که به بافت های مختلف لاشه هجوم می برند و موجب گندیدگی آن می شوند. از شایع ترین عوامل مسمومیت غذایی در انسان به شمار می روند (Jay et al., 2008). باسیلوس ها، باکتری های گرم مثبت، میله ای، اسپورزا و دارای پراکنش بالا می باشند. باسیلوس ها به علت اسپورزا بودن تا حدودی دارای مقاومت در برابر تیمارهای ضد میکروبی می باشند. در صورت تکثیر در محصولات غذایی، توکسین های خطرناکی را تولید می کنند (Tumah, 2009). مسمومیت ناشی از این باکتری ها، درمان دارویی خاصی نداشته و بیشترین اقدامات به منظور پیشگیری از بروز این نوع مسمومیت صورت می گیرد. بنابراین استفاده از ترکیبات جدید به عنوان مواد ممانعت کننده از رشد این باکتری در مواد غذایی می تواند به میزان زیادی از بروز این نوع از مسمومیت ها پیشگیری کند.

پیشرفت های اخیر در زمینه فناوری نانو به ویژه ساخت نانوذرات در شکل ها و اندازه های مختلف منجر به ایجاد گروه وسیعی از عوامل ضد میکروبی شده است (Morones et al., 2005). نانوذرات نقره نیز یکی از پرکاربردترین محصولات نانو فناوری است که در

مقالات گوناگون، از آن به عنوان قوی‌ترین عامل ضد- میکروبی یاد شده است (Liu et al., 2010). نقره فلزی است غیرسمی و خواص ضد میکروبی آن سال‌های طولانی است که شناخته شده است (Liesje et al., 2011). اما اخیراً به علت تولید این ماده به صورت نانو- ذرات با قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر، سطح تماس و خاصیت ضد میکروبی آن تا بیش از ۹۹ درصد افزایش یافته است (Morones et al., 2005; Kim et al., 2007). از نظر مکانیسم عمل، احتمال می‌رود که این ذرات کوچک با اتصال به گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها (SH-) در سطح غشاء باکتری به داخل آن نفوذ کرده و با تغییر در مرفولوژی و نفوذپذیری غشاء و تاثیر در زنجیره تنفسی و تقسیم سلولی در نهایت منجر به مرگ باکتری می‌گردند (Vigneshwaran et al., 2008; Woo et al., 2007). ویژگی‌های ضد میکروبی نانوذرات نقره بر علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها در مطالعات متعددی بررسی و اثبات شده است. به عنوان نمونه، Morones و همکاران در سال ۲۰۰۵، فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره را علیه چهار باکتری گرم منفی *اشریشیا کلای*، *ویبریو کلرا*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تیفی* اثبات کردند. Vaseeharan و همکاران نیز در سال‌های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۲، به ترتیب فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره را در مقابل باکتری *ویبریو آلجینولیتیکوس* و باکتری *ویبریو هاروی* اثبات نمودند. در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۱۳ فعالیت ضد- باکتریایی نانوذرات اکسید روی علیه باکتری *ویبریو هاروی* مورد مطالعه قرار گرفت (Ramamoorthy et al., 2013). هم‌چنین در مطالعه انجام شده توسط Yoon و همکاران در سال ۲۰۰۷ حساسیت باکتری‌های *اشریشیا کلای* و *باسیلوس سوبتیلیس* در مقابل دو نوع

نانوذره شامل نقره و مس نشان داده شد. اگرچه تاکنون مطالعات گسترده‌ای در مورد ویژگی‌های ضد باکتریایی نانوذرات نقره انجام شده است، اما پژوهش‌های اندکی بر روی باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان دریایی صورت گرفته است. بنابراین پژوهش حاضر با هدف تعیین اثر ضد باکتریایی کلونید نانوذرات نقره بر باکتری گرم منفی *ویبریو هاروی* (Vibrio ISO1 PTTC 1755) و باکتری گرم مثبت *باسیلوس (harveyi Bacillus spp.)* به روش انتشار چاهک (برای تعیین هاله عدم رشد) و رقت لوله‌ای (برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)) و سنجش سینتیک رشد انجام شد. نتایج این پژوهش می‌تواند نویدبخش امیدهای تازه‌ای در ارتباط با روش‌های درمان نوین بیماری‌های آبزیان پرورشی باشد.

مواد و روش‌ها

سویه میکروبی: در این مطالعه تجربی، از ۲ سویه استاندارد میکروبی *Bacillus spp.* و ISO1 PTTC *Vibrio harveyi* 1755 تهیه شده از بخش میکروب شناسی پژوهشکده میگوی کشور، استفاده شد. محیط کشت‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل مولر هینتون آگار (MHA)، مولر هینتون برات (MHB)، تریپتیک سوی برات (TSB) و تریپتیک سوی آگار (TSA) ساخت شرکت مرک آلمان بود.

تهیه نانوذرات نقره: در این پژوهش از کلونید نانوذرات نقره ساخت شرکت نانونصب پارس با نام تجاری نانوسید L2000 استفاده گردید. بر اساس نتایج مطالعه Nafisi Bahabadi و همکاران (۲۰۱۷) این کلونید حاوی نانوذرات نقره با غلظت ۴۰۰ میلی گرم

در لیتر و میانگین قطر ۲۲/۲۲ نانومتر بود. علاوه بر این اطلاعات، برخی دیگر از ویژگی‌های نانوذرات مورد استفاده با استفاده از تکنیک‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. برای اطمینان از وجود نانوذرات نقره در کلوئید از طیف سنج فرابنفش-مرئی (UV-Vis) مدل UV-1601 pc ساخت شرکت Shimadzu کشور ژاپن استفاده شد. جهت تأیید کریستالی بودن نانوذرات نقره از روش طیف سنجی پراش اشعه X (XRD) مدل Bruker D8 Advance مجهز به منبع فتون $\text{CuK}\alpha$ و با طول موج ۱/۵۴۰۵۶ آنکستروم ساخت کشور آلمان استفاده شد. جهت تعیین اندازه، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی (PDI) نانوذرات نقره از دستگاه ZetaSizer Nano ZS (Red badge) مدل ZEN3600 ساخت شرکت Malvern انگلستان استفاده شد. همچنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مدل EM-3200 ساخت کشور چین شکل نانوذرات نقره بررسی گردید.

آزمون‌های سنجش فعالیت ضد میکروبی

الف) تعیین MIC و MBC

به منظور سنجش حداقل غلظت بازدارندگی نانوذرات نقره (MIC)، از روش رقت‌سازی سریالی در لوله‌های استریل حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) نمکی استفاده شد. بدین منظور رقت‌های سریالی ۱/۱۰۲۴ - ۱/۲ از کلوئید نانوذرات نقره در لوله‌های محتوی محیط کشت MHB تهیه شد. متعاقب آن ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تازه باکتری با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (تعداد باکتری $\times 10^8$ ۱/۵) به هر لوله اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار قرار گرفتند. پس از زمان انکوباسیون، کمترین

غلظتی از نانوذرات نقره که باعث مهار رشد باکتری گردید و با مشاهده عدم کدورت در لوله‌ها مشخص بود، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) از تمامی لوله‌های بدون کدورت بر روی محیط تریپتیک سوی آگار (TSA) نمکی کشت انجام شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. پلیت مربوط به لوله‌ای که حاوی کمترین غلظت از نانوذرات نقره بود و رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد. برای اطمینان از نتایج آزمایش‌ها تمامی این آزمون‌ها سه بار تکرار شد و نتایج با هم مقایسه گردید (Finegold, 1982).

ب) روش انتشار چاهکی در آگار (Well Diffusion Agar)

در این روش ابتدا از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت ۰/۵ مک فارلند با سوآپ استریل روی محیط کشت مولر هینتون آگار نمکی کشت انجام شد. سپس به کمک پیت پاستور استریل چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر روی محیط ایجاد کرده و از کلوئید نانوذرات نقره به میزان ۵۰ میکرولیتر به درون چاهک‌های تعبیه شده اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا نانوذرات موجود در چاهک‌ها جذب آگار شود. در نهایت پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط کلوئید نانوذرات نقره علیه هر یک از باکتری‌های مذکور توسط کولیس دیجیتالی و از طریق کم کردن قطر چاهک از قطر هاله عدم رشد محاسبه گردید. تمامی مراحل فوق به منظور کاهش

نتایج

مشخصات کلویید نانوذرات نقره

طیف جذبی UV-Vis کلویید نانوذرات نقره در شکل ۱ (د) قابل مشاهده است. در این طیف بیشینه پیک جذبی در طول موج ۴۲۰ نانومتر مشاهده گردید که مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره می‌باشد و اثبات کننده حضور نانوذرات در کلویید می‌باشند. بر اساس منابع معتبر بیشینه پیک جذبی نانوذرات نقره بین طول موج‌های ۴۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر قرار دارد.

بر اساس نتایج به دست آمده از تحلیل داده‌های طیف سنجی پراش اشعه ایکس (شکل ۲)، فلز نقره در این کلویید دارای ساختار FCC می‌باشد که با نمونه استاندارد نانو کریستال‌های نقره کاملاً هم‌خوانی دارد. بر اساس داده‌های دستگاه زتاسایزر، میانگین قطر هیدرودینامیک نانوذرات نقره در این کلویید ۲۲/۲۲ نانومتر ثبت گردید. همان‌طور که در شکل ۱ (ب) مشخص است منحنی توزیع ذرات به شکل زنگوله‌ای است که نشان‌دهنده پراکندگی یکنواخت نانوذرات نقره در کلویید می‌باشد. هم‌چنین شاخص پراکندگی نانوذرات (PDI)، ۰/۲۴ ثبت گردید که نشان‌دهنده یکنواختی بالای توزیع اندازه ذرات در این کلویید می‌باشد (برای یک نمونه کلویید یکنواخت نانوذرات نقره، PDI بین ۰/۰۱ تا ۰/۰۷ است. هم‌چنین پتانسیل زتای ثبت شده به میزان ۵۲/۸۳- میلی‌ولت (شکل ۱، الف)، نشان‌گر پایداری مناسب این کلویید است (پتانسیل زتای بالاتر از ۳۰+ میلی‌ولت و کمتر از ۳۰- میلی‌ولت، نشان‌دهنده پایداری بالای نانوذرات است. بر اساس تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (شکل ۱،

خطا با سه تکرار انجام شد (Ramamoorthy et al., 2013).

ج) سنجش سینتیک رشد

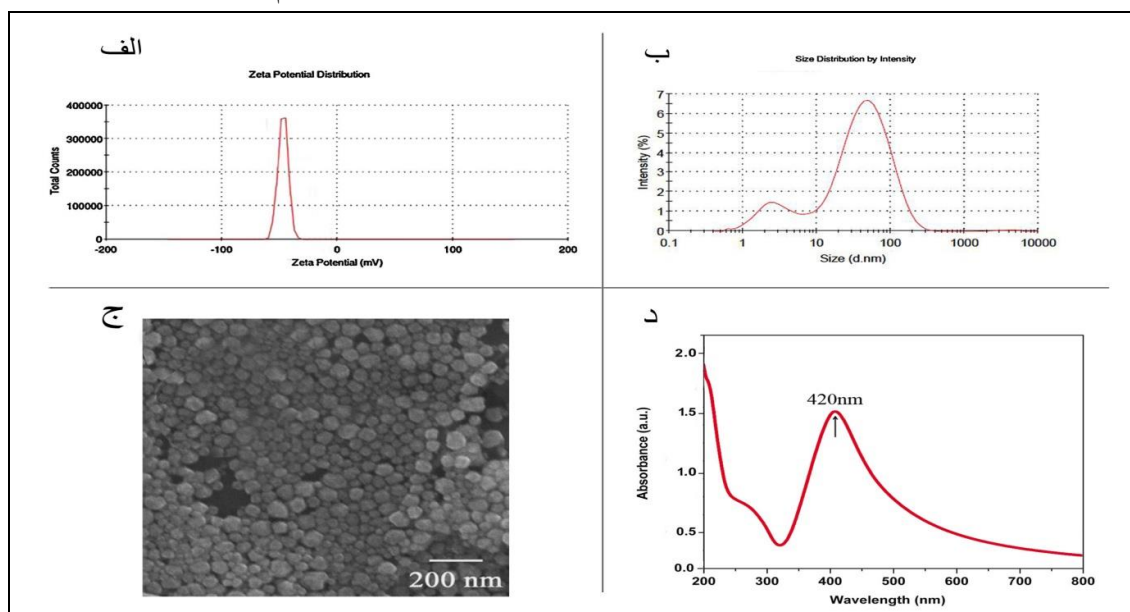
به منظور تعیین منحنی رشد باکتری‌های مذکور در حضور نانوذرات نقره از روش سنجش OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده گردید. برای این منظور ۵ درصد از استوک شبانه هر باکتری به صورت جداگانه (۵۰ میلی‌لیتر با ۰/۲ ODA600) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت TSB حاوی نانوذرات نقره با غلظت معادل MIC (تقریباً معادل ۴ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب برای ویبریو هاروی و باسیلوس) اضافه گشت و سپس در انکوباتور شیکردار ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شد. میزان دانسیته نوری هر کدام از باکتری‌ها در غلظت‌های ذکر شده به مدت ۷ ساعت در فاصله زمانی ۳۰ دقیقه و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و سپس منحنی رشد باکتری‌ها ترسیم گردید (Chatterjee et al., 2011).

تجزیه و تحلیل آماری

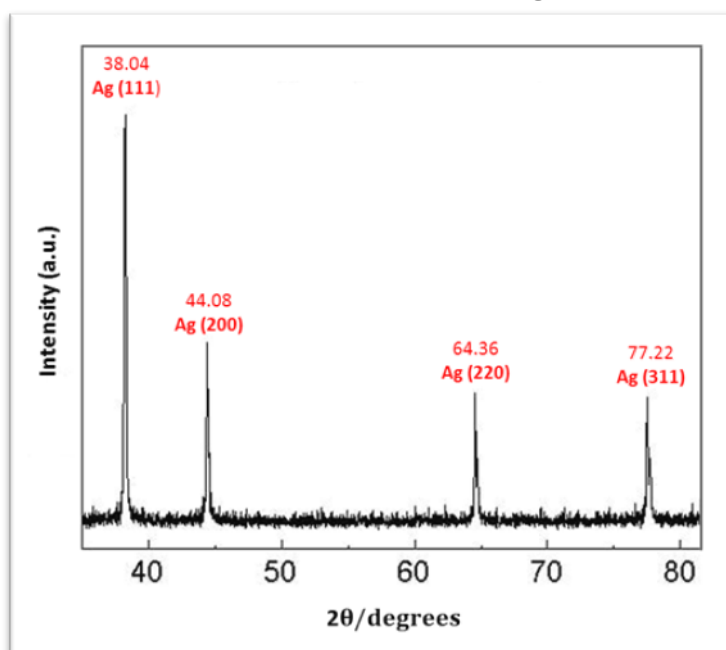
یافته‌های این مطالعه با استفاده از نرم افزارهای SAS 9.1.3 Portable و X'Pert High Score Version 2003 و 1.0d Excel 2010 مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. برای تعیین تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و آزمون دانکن استفاده شد.

شکل نسبتاً کروی و منظم هستند.

(ج) نانوذرات نقره مورد استفاده در این پژوهش دارای



شکل ۱: نمودار پتانسیل زتای کلئوئید نانوذرات نقره (الف)، میانگین اندازه نانوذرات نقره (ب)، تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره نانوذرات نقره (ج) و طیف جذب UV-Vis کلئوئید نانوذرات نقره (د).



شکل ۲: الگوی طیف سنجی پراش اشعه X کلئوئید نانوذرات نقره.

نتایج مطالعات میکروبیولوژی

در این پژوهش تاثیر ضدباکتری کلئوئید نانوذرات نقره بر باکتری‌های باسیلوس و ویبریو هاروی مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده از

آزمایشات بررسی فعالیت ضد میکروبی کلئوئید نانوذرات نقره به روش رقت‌سازی سریالی، مقدار MIC برای باکتری‌های ویبریو هاروی و باسیلوس به ترتیب ۳/۹۱ و ۱/۹۵ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. هم-

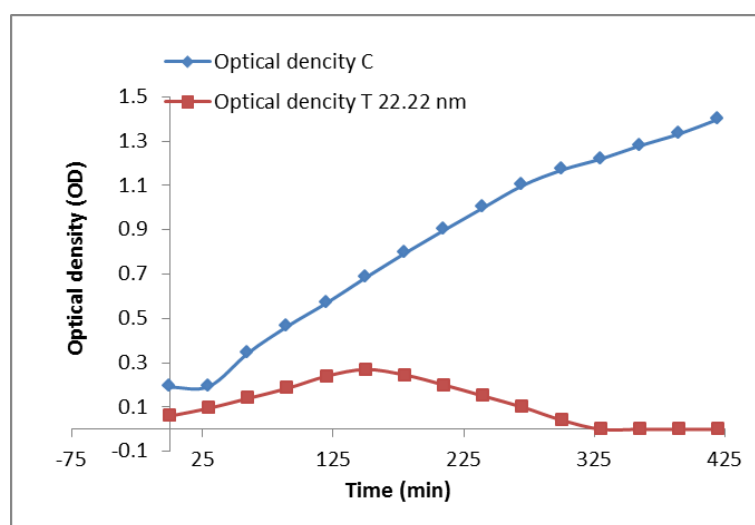
چنین مقدار MBC کلونید نانوذرات نقره در رابطه با باکتری‌های ویبریو هاروی و باسیلوس برابر با ۳/۹۱ میلی گرم در میلی لیتر بود (جدول ۱). نسبت حداقل غلظت مهارکنندگی رشد به حداقل غلظت کشندگی از رشد باکتری (MIC/MBC) برای هر دو سویه از باکتری بررسی شد که نتایج (جدول ۱) نشان داد که کلونید نانوذرات نقره برای باکتری ویبریو هاروی دارای خاصیت باکتری‌کشی است ولی فاقد اثر مهارکنندگی هستند. هم‌چنین این ویژگی در مقابل باکتری باسیلوس به صورت باکتریواستاتیکی (مهارکننده رشد) است. نتایج ارزیابی روش انتشار در چاهک در محیط آگار نشان داد که میانگین قطر هاله عدم رشد کلونید نانوذرات نقره در مورد باکتری‌های ویبریو هاروی و باسیلوس به ترتیب $0/2 \pm 42/1$ و $0/15 \pm 44/6$ میلی متر

(میانگین $\pm SD$) می‌باشد. مقایسه بین این دو باکتری گرم منفی و گرم مثبت از نظر قطر هاله عدم رشد نشان داد که بین آن‌ها اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد ($p < 0/001$). با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که باکتری گرم مثبت باسیلوس در مقایسه با باکتری گرم منفی ویبریو هاروی در مقابل نانوذرات نقره حساسیت بیشتری را نشان می‌دهد.

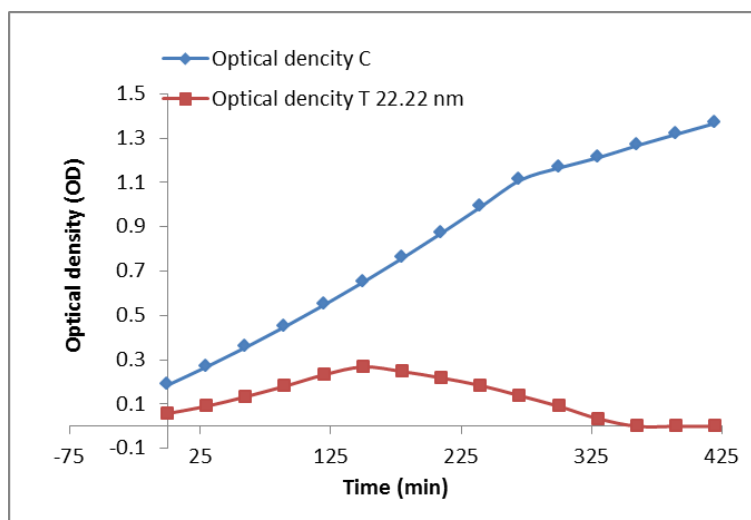
نتایج جذب نوری (سینتیک رشد) در ۶۰۰ نانومتر نیز نشان می‌دهد که رشد باکتری‌های باسیلوس و ویبریو هاروی به ترتیب ۵ و ۶ ساعت بعد از شروع کشت متوقف شده است (شکل ۳ و ۴). لذا با توجه به این نتایج می‌توان چنین عنوان کرد کلونید نانوذرات نقره اثرات ضدباکتریایی بیشتری بر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی دارد.

جدول ۱: نتایج MIC و MBC روی سویه‌های مورد مطالعه.

نوع میکروب	غلظت MIC (ppm)	غلظت MBC (ppm)	نسبت MIC/MBC
ویبریو هاروی	۳/۹۱	۳/۹۱	۱
باسیلوس	۱/۹۵	۳/۹۱	۰/۵



شکل ۳: منحنی رشد باکتری *Bacillus spp.* در حضور و عدم حضور نانوذرات نقره.



شکل ۴: منحنی رشد باکتری *Vibrio harveyi* ISO1 PTTC 1755 در حضور و عدم حضور نانوذرات نقره.

بحث

در سال‌های اخیر استفاده از نانوذرات نقره در درمان بیماری‌های آبزیان به منظور جبران مقاومت باکتری‌ها به پادزیست‌های رایج رونق یافته‌است. تاکنون گزارش‌های معدودی درباره اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره در برابر انواع میکروب‌ها در آبزیان دریایی منتشر شده‌است. در مطالعه‌ای Vaseeharan و همکاران (۲۰۰۹)، پتانسیل ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره برگ چای را در برابر باکتری ویبریو هاروی مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند که این ترکیب اثرگذاری مطلوب و مناسبی را بر روی باکتری مورد آزمایش دارد. طبق یافته‌های به دست آمده در پژوهش حاضر، مقایسه نتایج در دو باکتری باسیلوس و ویبریو هاروی نشان می‌دهد که اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره به نوع باکتری بستگی دارد. نتایج تعیین مقدار MIC و MBC نشان داد که باکتری باسیلوس نسبت به ویبریو هاروی از حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشد. به عبارت دیگر، باکتری ویبریو هاروی نسبت به نانوذرات نقره مقاوم‌تر بود. هم‌چنین نتایج آزمون چاهک‌گذاری نشان داد که

قطر هاله عدم رشد در باکتری گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود به طوری که نتایج تجزیه و تحلیل آماری ارتباط معنی‌داری بین میزان قطر هاله عدم رشد بین دو باکتری نشان داده است. هم‌چنین در پژوهش حاضر بررسی سینتیک رشد تایید کننده نتایج فوق بود. یکی از دلایل حساسیت پایین تر باکتری ویبریو هاروی می‌تواند به این دلیل باشد که غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی مانند ویبریو هاروی به طور غالب از لیپو پلی ساکارید (LPS) مستحکم تشکیل شده است که سد مقاومی در برابر ورود نانوذرات محسوب می‌شود. هم‌چنین این نتایج نشان‌دهنده آن است که نانوذرات نقره دارای اثر باکتریواستاتیکی بر باکتری باسیلوس و اثر باکتری‌کشی قوی بر باکتری ویبریو هاروی است، چرا که این نانوذرات در غلظت کم سبب مرگ ویبریو هاروی شدند. نتایج این پژوهش با نتایج Yoon و همکاران (۲۰۰۷) که اثر نانوذرات مس و نقره را بر باکتری‌های *اشریشیا کلای* و *باسیلوس سوبتلیس* سنجیدند مشابیهت دارد، به طوری که در آن مطالعه باکتری‌های گرم مثبت در برابر نانوذرات حساس‌تر

بودند. Nanda و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که نانوذرات نقره در مقابل باکتری‌های گرم مثبت عملکرد بهتری دارند. با این حال در برخی مطالعات نتایجی عکس نتایج فوق گزارش شده است، به عنوان مثال MubarakAli و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره را بر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گرم منفی *اشریشیا کلای* بررسی کرده و گزارش کردند که نانوذرات نقره علیه باکتری‌های گرم منفی موثرتر از باکتری‌های گرم مثبت عمل می‌کنند و علت این امر را ضخامت بیشتر دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت ذکر کردند. به هر حال احتمالاً کارایی باکتری‌کشی نانوذرات نقره تنها منحصر به نوع دیواره سلولی در باکتری‌های گرم مثبت یا گرم منفی نیست و مطالعات بیشتری در این زمینه مورد نیاز می‌باشد.

باید به این نکته نیز توجه نمود که در آزمایشاتی که در محیط‌های مایع نمکی بر روی باکتری‌ها صورت می‌گیرد احتمال توده‌ای شدن نانوذرات نقره بر اثر واکنش با ترکیبات نمکی وجود دارد که این امر باعث بزرگ شدن اندازه ذرات و در نتیجه کاهش سطح تماس بین نانوذرات و باکتری‌ها می‌شود. بنابراین در چنین مطالعاتی به منظور جلوگیری از رسوب نانوذرات، باید محلول‌ها به خوبی هم زده شوند که این امر می‌تواند اثرات منفی تجمع نانوذرات را کم رنگ یا خنثی کند (Ruparelia et al., 2008).

براساس یافته‌های این پژوهش مطالعه می‌توان این طور جمع‌بندی نمود که نانوذرات نقره از پتانسیل بالایی برای کاهش میکرو ارگانیسم‌های بیماری‌زا در سیستم‌های تکثیر و پرورش آبزیان و عوامل فساد میکروبی در آبزیان برخوردارند. با این حال استفاده

مستقیم از کلونید نانوذرات نقره در آبی‌پروری نیازمند مطالعات بیش‌تر و وسیع‌تری است. در عوض پیشنهاد می‌شود که از این مواد به صورت غیرمستقیم و در قالب فیلترهای تصفیه آب و یا پوشش‌های ضدمیکروبی بر روی ادوات آبی‌پروری استفاده گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از ریاست محترم پژوهشکده میگوی کشور به خاطر همکاری در تأمین هزینه این پژوهش و همچنین از زحمات خانم مهندس عصمت محمدی باغملائی سپاس‌گزاری می‌گردد.

منابع

۱. حسینی، س.ح.، حاجی رضایی، س.، ۱۳۹۳. تاثیر پرورش توام میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) و ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) بر تنوع و شیوع گونه‌های باکتری جنس ویبریو در مزارع پرورش میگو. نشریه توسعه آبی‌پروری، ۹ (۱)، ۳۱-۲۵.
۲. قائدینا، ب.، میربخش، م.، ذریه زهرا، ج. ۲۰۲۰. تاثیر جیره حاوی پروبیوتیک (*Bacillus subtilis*) بر شاخص‌های سلامتی، عملکرد سیستم ایمنی و پیشگیری از بیماری لکه سفید در میگوی سفید غربی. نشریه توسعه آبی‌پروری، ۱۴ (۳)، ۸۸-۹۹.
3. Austin, B., 2010. Review Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 140, 310-317.
4. De la Peña, L. D., Kakai, T., Muroga, K., 1995. Dynamics of *Vibrio* sp PJ in organs of orally infected kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Journal of Fish Pathology*, 30, 39-45.
5. Finegold, S.M., Martin, W.J., 1982. *Diagnostic microbiology*. 6nd edition,

15. MubarakAli, D., Thajuddin, N., Jeganathan, K., Gunasekaran, M. 2011. Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85, 360-365.
16. Nafisi Bahabadi, M., Hosseinpour Delavar, F., Mirbakhsh, M., Niknam, K. and Johari, S.A., 2017. Assessment of antibacterial activity of two different sizes of colloidal silver nanoparticle (cAgNPs) against *Vibrio harveyi* isolated from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 2(1), 463-472.
17. Nanda, A., Saravanan, M. 2009. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine*, 5, 452-456.
18. Nash, G.L., 1990. *Penaeus monodon* grow-out diseases. in: New, M.B., de Saram, H., Singh, T. (Eds.), *Technical and Economic Aspects of Shrimp Farming*. Proceedings of the Aquatech '90 Conference, Kuala Lumpur, Malaysia.
19. Purivirojkul, W., Areechon, N., 2007. Application of *Bacillus spp.* isolated from the intestine of black tiger shrimp (*Penaeus monodon Fabricius*) from natural habitat for control pathogenic bacteria in aquaculture. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 41, 125-132.
20. Ramamoorthy, S., Kannaiyan, P., Moturi, M., Devadas, T., Muthuramalingam, J., Natarajan, L., Arunachalam, N., Ponniah, A.G., 2013. Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against *Vibrio harveyi*. *Indian Journal of Fisheries*, 60(4), 107-112.
21. Ruparelia, J.P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P., Mukherji, S., 2008. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 707-716.
22. Sharma, Y.K., Yngard, R.A., Lin, Y., 2009. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145, 83-96.
- Missouri: The C. V. Mosby Company Inc., 532-659.
6. Gabriel, A.G., Felipe, A.V., 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture Potential. *Recent research developments in microbiology*, 4: 333-348.
7. Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A., 2005. *Bacillus cereus* Gastroenteritis. In: *Modern Food Microbiology*, 7th ed, New York, Springer Science, 583-590.
8. Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R., Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128, 203-209.
9. 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., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeong, D.H., Cho, M.H., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 3(1), 95-101.
10. Liesje, S., Bart, D., Paul, V., Benny, F., Pyck, G. 2011. The Antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 113-189.
11. Lightner, D.V., Bell, T.A., Redman, R.M., Mohny, L.L., Natividad, J.N., Rukyani, A., Poernomo, A., 1992. A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawn/ shrimps of the Americas and Indopacific. in: *Diseases in Asian Aquaculture I*. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 57-80.
12. Liu, J., Sonshine, D.A., Shervani, S., Hurt, R.H., 2010. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *Journal of ACS Nano*, 4(11), 6903-6913.
13. Mesalhy Aly, S., Abd-El-Rahman A.M., John, G., Mohamed, M.F., 2008. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture*, 277, 1-6.
14. Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., Yacaman, M.J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 2346.

23. Tumah, H.N., 2009. Bacterial biocide resistance. *Journal of Chemotherapy*, 1, 5-15.
24. Vaseeharan, B., Ramasamy, P., Chen, J.C., 2010. Antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by tea leaf extracts against pathogenic *Vibrio harveyi* and its protective efficacy on juvenile *Fenneropenaeus indicus*. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 352-356.
25. Vigneshwaran, N., Kathe, A.A., Varadarajan, P.V., Nachane, R.P., Balasubramanya, R.H., 2007. Functional finishing of cotton fabrics using silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7, 1893-1897.
26. Woo, K., Hye, Ch., 2008. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli*. *Journal of the American Dental Association*. 74 (7), 217-247.
27. Yoon, K., Byeon, J.H., Park, J-H, Hwang, J., 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 373, 572-5.