تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی بر فلور میکروبی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

سراج بیتا

Email: serajbita@yahoo.com

استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

چکیده:

در این مطالعه اثرات نانوذرات نقره کلوئیدی نانونسید بر فلور باکتریایی کل و باکتری‌های ویبریو آبشش، عضله و محیط آب پرورشی میگوی وانامی مورد بررسی قرار گرفت. پست لاروهای میگوی پا سفید غربی در داخل مخازن با حجم آب 5 لیتر به تعداد 12 قطعه در هر تیمار، در 3 تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره تیمار 1: ($25\%LC_{50}$ (0/97 mg/L AgNP)، تیمار 2: ($50\%LC_{50}$ mg/L 1/95 AgNP) و تیمار 3: ($75\%LC_{50}$ (2/92 mg/L AgNP)) و یک تیمار نیز به عنوان تیمار شاهد (در مجموع 4 تیمار و هر کدام با 3 تکرار) تقسیم‌بندی شدند و تا پایان دوره به مدت 14 روز با نانوذرات نقره مواجهه شدند. طبق نتایج با افزایش غلظت نانوذرات نقره بار باکتریایی کل و تعداد ویبریو کل در بافت آبشش، عضله و محیط آب پرورشی میگوها به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$). بیشترین شمارش باکتریایی کل و ویبریو نیز مربوط به آب پرورشی بود. نتایج نشان داد که غلظت‌های بالای نانوذرات نقره اثرات ضدباکتریایی بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین دارد.

کلمات کلیدی: نانوذرات نقره، فلور باکتریایی، میگوی وانامی

The Effect of Colloidal Silver Nanoparticles on Microbial Flora of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*

Seraj Bita

Email: serajbita@yahoo.com

Assistant Professor of Fisheries Department, Faculty Of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

Abstract:

In this study, the effects of colloidal silver nanoparticles on total bacterial flora and vibrio of gill, muscle and rearing water of shrimp were studied. Post larvae of pacific white shrimp in 5 liters of water reservoirs with 12 shrimp per treatment, in 3 treatments with different concentrations of silver nanoparticles: 1: ($25\%LC_{50}$ (mg / L AgNP 0.97), treatment 2 ($50\%LC_{50}$ (mg / L AgNP 1.95) and treatment 3: ($75\%LC_{50}$ (mg / L AgNP 2.92) and one treatment as control (4 treatments in total and 3 replicates) They were exposed to silver nanoparticles for 14 days. According to the results, with increasing concentrations of silver nanoparticles, total bacterial load and total vibrio count in gill tissue, muscle, and shrimp water culture medium significantly decreased (The highest total bacterial count and vibrio are also related to breeding water The results showed that high concentrations of silver nanoparticles had more antibacterial effects than low concentrations.

Key words: Silver nanoparticles, Bacterial Flora, *Litopenaeus vannamei*

1-مقدمه:

پرورش میگو یکی از فعالیت های مهم آبزی پروری در بسیاری از کشورهای گرمسیری است. میزان بیماری در صنعت آبزیان به دلیل تشدید فعالیت های آبزی پروری افزایش یافته است (Shariff و همکاران، 2001). میگوی پا سفید غربی (Litopenaeus vannamei) بیشترین میزان تولیدات از طریق آبزی‌پروری را دارد (FAO، 2012). با این حال، تولید میگو در بعضی از کشورها به علت ظهور چند بیماری مرتبط با آبزی پروری (Lightner، 2011)، از جمله سندرم مرگ و میر اولیه (EMS) ناشی از یک سویه *Vibrio parahaemolyticus*، بیشتر در آسیا و آمریکای لاتین، به شدت کاهش یافته است (Lightner و همکاران، 2012؛ Tran و همکاران، 2013). عفونت های ناشی از ویبریو، مسئله مهمی در پرورش میگو هستند. به عنوان درمان با ویبریوز، آنتی بیوتیک ها به طور معمول استفاده می شود؛ با این حال، استفاده نامناسب و یا بیش از حد در حوزه آبزی پروری منجر به انتخاب باکتری مقاوم شده است (Deifordt و همکاران، 2011). علاوه بر این، استفاده از آنتی بیوتیک ها در آبزیان می تواند سلامت انسان و محیط را تحت تاثیر قرار دهد (Costanzo و همکاران، 2005). بنابراین، برای توسعه پایدار بخش آبزی پروری، لازم است که گام هایی در جهت جایگزینی استفاده از آنتی بیوتیک ها برداشته شود که یکی از این مواد جایگزین نانوذرات نقره است. اثرات ضد میکروبی یون یا نمک نقره (Ag) به خوبی شناخته شده است، اما اثرات نانوذرات نقره بر میکروارگانیسم ها و مکانیزم های ضد میکروبی به طور کامل واضح نیست (Składanowski و همکاران، 2016)، اما نانوذرات نقره خاصیت ضدمیکروبی داشته و می‌توانند اثرات شدیدی را بر علیه باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک و بیماری‌زا داشته باشند. با توجه به اندازه نانوذرات، آن‌ها وارد سلول باکتری شده و در نتیجه سیستم آنزیمی در زنجیره تنفسی باکتری را مختل نموده و سبب تغییر در سنتز DNA باکتری می‌شوند (Salomoni و همکاران، 2017).

2-مواد و روش:

تعداد 350 قطعه پست لارو میگوی وانامی (*Litopeneaus vannami*) سالم با میانگین وزنی 1/76±0/18 گرم (انحراف معیار ± وزن) از مرکز تکثیر جاسک تهیه و به آزمایشگاه منتقل داده شدند. سازش‌پذیری پست لارو میگوها به مدت دو هفته انجام شد. پس از اتمام دوره سازش‌پذیری به منظور انجام تست سمیت تحت کشنده، پست لاروهای میگو در داخل مخازن با حجم آب 5 لیتر به تعداد 12 قطعه در هر تیمار، در 3 تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره تیمار 1: ($25\%LC_{50}$ (0/97 mg/L AgNP)، تیمار 2: ($50\%LC_{50}$ (1/95 mg/L AgNP) و تیمار 3: ($75\%LC_{50}$ (2/92 mg/L AgNP): تیمار 3) و یک تیمار نیز به عنوان تیمار شاهد (در مجموع 4 تیمار و هر کدام با 3 تکرار) تقسیم‌بندی شدند و تا پایان دوره به مدت 14 روز نگهداری شد. در پایان دوره ازمایش 6 عدد میگو از هر تیمار را خارج نموده و عضله و آبشش آنها در شرایط استریل جداسازی و هموژن شد. آماده‌سازی نمونه‌ها، رقت‌سازی و آزمایشات باکتریایی از آبشش، عضله و محیط آب پرورشی میگوی وانامی بر طبق روش Downes و Ito (2001) و APHA (2005) انجام شد. آزمایشات باکتری‌شناسی آب با استفاده از رقت‌سازی آب با سرم فیزیولوژی استریل (2/5٪) و کشت 0/1 از رقت مورد نظر انجام شد. برای کشت باکتری‌های آبشش و عضله نیز 0/25 گرم از این بافت‌ها در 6/25 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل 2/5 درصد هموژن شد. جهت شمارش کل باکتری‌های مزوفیل و سرمادوست از محیط کشت TSA (مرک، آلمان) و تعداد کل ویبریو TCBS استفاده شد. بعد از ساخت محیط کشت، 0/1 سی‌سی از نمونه‌های هموژن‌شده به روش PCA کشت داده می‌شد. شمارش پلیت‌های کشت داده‌شده پس از 48 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه‌سانتی‌گراد (بار باکتری‌های کل) و دمای 30 درجه‌سانتی-گراد (تعداد کل ویبریو) انجام می‌شد. داده ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند در صورت وجود اختلاف معنی داری بین تیمارها در سطح 5 درصد از آزمون توکی استفاده شد.

3-نتایج و بحث:

نتایج حاصل از شمارش باکتریایی کل و ویبریو در بافت آبشش، عضله و محیط آب پرورشی میگوی پاسفید غربی در جدول 1 تا 3 آورده شده است. در بافت آبشش شمارش باکتریایی کل و ویبریو در تیمار شاهد نسبت به بقیه تیمارها بیشتر بود (جدول 1). تعداد باکتریایی کل و ویبریو بافت آبشش با افزایش غلظت نانوذرات نقره به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$)، به‌طوری که تعداد باکتریایی کل در تیمار 3 در مقایسه تمام تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p<0/05$). تعداد ویبریو کل بافت آبشش در تیمار 2 و 3 در مقایسه بقیه تیمارها کاهش یافت ($p<0/05$) و کمترین میزان آن در تیمار 4 مشاهده شد. بین تیمار 1 و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$).

جدول 1- نتایج شمارش باکتریایی کل و ویبریو در آبشش میگوی پا سفید غربی طی در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره

تعداد ویبریو کل ($\times 10^4$ cfu/g)	تعداد باکتریایی کل ($\times 10^4$ cfu/g)	غلظت نانوذرات نقره (میلی گرم در لیتر)
^{b}2/80 0±/64	^{b}4/66 0±/48	شاهد
^{b}2/96 0±/42	^{b}4/37 0±/56	0/97 : تیمار 1
^{a}1/15 0±/18	^{b}3/99 0±/29	1/95 : تیمار 2
^{a}1/08 0±/22	^{a}1/92 0±/44	2/92 : تیمار 3

حروف متفاوت در هر ستون، نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در تعداد بار باکتریایی بین تیمارها (P<0/05) می‌باشد

در بافت عضله تعداد باکتریایی کل و ویبریو کل در تیمار 3 در مقایسه تمام تیمار کاهش معنی‌داری داشت ($p<0/05$) و کمترین میزان آن نیز در تیمار 4 مشاهده شد (جدول 2).

جدول 2- نتایج شمارش باکتریایی کل و ویبریو در عضله میگوی پا سفید غربی طی در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره

تعداد ویبریو کل ($\times 10^4$ cfu/g)	تعداد باکتریایی کل ($\times 10^4$ cfu/g)	غلظت نانوذرات نقره (میلی گرم در لیتر)
^{b}5/11 1±/45	^{b}7/00 0±/89	شاهد
^{b}5/10 0±/89	^{b}7/05 1±/22	0/97 : تیمار 1
^{b}5/07 1±/33	^{b}6/75 1±/35	1/95 : تیمار 2
^{a}2/16 1±/22	^{a}2/87 0±/68	2/92 : تیمار 3

حروف متفاوت در هر ستون، نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در تعداد بار باکتریایی بین تیمارها (P<0/05) می‌باشد

تعداد باکتریایی کل و ویبریو در آب پرورشی نسبت به بافت آبشش و عضله بیشتر بود (جدول 3). طبق نتایج تعداد باکتریایی کل و ویبریو کل آب پرورشی میگو در تیمار 3 در مقایسه تمام تیمارها کاهش معنی‌داری داشت ($p<0/05$). همچنین بین تیمار 2 با سایر تیمارها نیز اختلاف معنی‌داری از نظر تعداد بار باکتریایی کل وجود داشت ($p<0/05$).

جدول 3- نتایج شمارش باکتریایی کل و ویبریو در آب پرورشی میگوی پا سفید غربی طی در مواجهه با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره

تعداد ویبریو کل ($\times 10^4$ cfu/ml)	تعداد باکتریایی کل ($\times 10^4$ cfu/ml)	غلظت نانوذرات نقره (میلی گرم در لیتر)
^{c}8/05 3±/48	^{c}9/94 3±/15	شاهد
^{c}8/13 1±/22	^{c}9/90 3±/48	0/97 : تیمار 1
^{b}6/24 2±/50	^{b}6/55 0±/87	1/95 : تیمار 2
^{a}4/00 2±/06	^{a}4/16 1±/45	2/92 : تیمار 3

حروف متفاوت در هر ستون، نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در تعداد بار باکتریایی بین تیمارها (P<0/05) می‌باشد

عوامل متعددی از قبیل شرایط محیط پرورشی، تغذیه، نوع گونه و میزان استرس بر تعداد باکتریایی آبزیان تاثیر دارند (Ringo و Birkbeck، 1999). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که محیط آب پرورشی در مقایسه بافت آبشش و عضله میگو دارای جمعیت باکتریایی بیشتری می‌باشد. با افزایش غلظت نانوذرات نقره تعداد باکتریایی کل و ویبریو کاهش یافت که نشان می‌دهد تاثیر نانوذرات نقره بر بار باکتریایی میگوی پا سفید غربی به صورت وابسته به دز هست. که این نتایج با یافته‌های سایر محققین که بیانگر خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره می‌باشد مطابقت دارد (Morones و همکاران، 2005؛ Panacek و همکاران، 2006؛ Shahverdi و همکاران، 2007). با اینکه مکانیسم باکتری کشی ذرات کلوئیدی نقره بر علیه باکتری‌ها به خوبی شناخته نشده است (Panacek و همکاران 2006)، ولی احتمال می‌رود نانوذرات نقره از طریق اتصال به سطح غشای سلول یا نفوذ به داخل سلول و باند شدن با DNA، سبب اختلال در عملکرد باکتری و در نتیجه مرگ آن شوند. در مطالعه‌ای توسط خورشیدی و همکاران (1394) تعداد جمعیت باکتریایی ماهی کپور علفخوار با افزایش غلظت نانوذرات نقره به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین نیکی و همکاران (1395) دریافتند که نانوذرات نقره بر فلور باکتریایی ماهی کپور معمولی تاثیر معنی‌داری نداشتند ($p>0/05$) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت ندارد. در مجموع می‌توان گفت استفاده از غلظت 2/92 میلی‌گرم در لیتر

نانوذرات نقره سبب کاهش بیشتر بار باکتریایی و تاثیرپذیری بیشتر بر باکتری‌ها به‌ویژه در عضله میگو می‌شود که از این جهت استفاده از نانوذرات نقره به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در جهت کنترل و پیشگیری با آلودگی باکتریایی برای پست لارو میگوی پا سفید غربی توصیه می‌شود.

4-منابع:

1- خورشیدی ز.، کلباسی م.ر. و بهروزی ش.، 1394. بررسی تغییرات فلور باکتریایی روده و پوست ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) تحت تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، 3 (4)، 79-94.

2- نیکی ن.، رحیمی ر.، شالویی ف. و نیکوخواه ف.، 1395. تاثیر نانوذرات نقره کلوئیدی بر جمعیت فلور باکتریایی روده ماهی کپور معمولی. مجله منابع طبیعی ایران، شیلات، 69 (1)، 123-131.

3- American Public Health Association (APHA)., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, 560 pp.

4- Costanzo D., Murby J. and Bates J., 2005. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. Marine Pollution Bulletin, 51:218-223.

5- Defoirdt T., Sorgeloos P. and Bossier P., 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. Current Opinion in Microbiology, 14:251-258.

6- Downes M.P. and K Ito., 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, 600 pp.

7- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations., 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. SOFIA, Rome. 209p.

8- Lightner D. V., Redman, R. M., Pantoja C. R., Tang K. F., Noble B.L., Schofield P.; Mohney L. L., Nunan L.M. and Navarro S. A., 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. Journal of Invertebrate Pathology, 110:174-183.

9- Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramírez J.T. and Yacaman M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology, 16: 2346.

10- Panacek A., Kvítek L., Prucek R., Kolar M., Veerová R., Pizurova N., Sharma V.K., Tatjana N. and Zboril R., 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. The Journal of Physical Chemistry B, 110: 16248-16253.

11- Ringo E. and Birkbeck T.H., 1999. Intestinal microflora of fish larvae and fry. Aquaculture Research, 30(2): 73–93.

12- Salomoni R., Léo P., Montemor A.F., Rinaldi B.G and Rodrigues M.F., 2017. Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. Nanotechnology Science and Applied, 10: 115–121.

13- Shariff M., Yusoff F.M., Devaraja T.N. and Rao P.S.S., 2001. The effectiveness of a commercial microbial product in poorly prepared tiger shrimp, *Penaeus monodon* (*Fabricius*), ponds. Aquaculter Reserach, 32: 181-187.

14- Składanowski M, Golinska P, Rudnicka K, Dahm H, Rai M., 2016. Evaluation of cytotoxicity, immune compatibility and antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles. Medical Microbiology and Immunology, 205(6):603–613.

15- Tran L., Nunan L., Redman R.M., Mohney L.L., Pantoja C.R., Fitzsimmons K. and Lightner D. V., 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Diseases of Aquatic Organisms, 105:e55.