



## Application of Porous Ceramic Substrates Containing Silver Nanoparticles in Water Filtration System for Infection Control of *Vibrio harveyi* in White Leg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original Research

#### Authors

Hosseinpour Delavar F.<sup>\*1</sup> MSc,  
Nafisi Bahabadi M.<sup>2</sup> PhD,  
Mirbakhsh M.<sup>3</sup> PhD,  
Niknam Kh.<sup>4</sup> PhD,  
Johari S.A.<sup>5</sup> PhD,  
Mohammadi Baghmollaii E.<sup>6</sup> MSc

#### How to cite this article

Hosseinpour Delavar F, Nafisi Bahabadi M, Mirbakhsh M, Niknam Kh, Johari S.A, Mohammadi Baghmollaii E. Application of Porous Ceramic Substrates Containing Silver Nanoparticles in Water Filtration System for Infection Control of *Vibrio harveyi* in White Leg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Fisheries Science and Technology. 2018;7(4): 311-319.

<sup>1</sup>Fisheries Department, Fisheries & Environment Faculty, Gorgan University of Agriculture & Natural Resources, Gorgan, Iran

<sup>2</sup>Fisheries Department, Agriculture & Natural Resources Faculty, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

<sup>3</sup>Iranian Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran

<sup>4</sup>Organic Chemistry Department, Sciences Faculty, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

<sup>5</sup>Fisheries Department, Natural Resources Faculty, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

<sup>6</sup>Biology Department, Sciences Faculty, University of Isfahan, Isfahan, Iran

#### \*Correspondence

Address: Gorgan University of Agriculture & Natural Resources, Basij Square, Gorgan, Iran. Postal Code: 4918943464

Phone: -

Fax: -

fhosseinpour18@gmail.com

#### Article History

Received: March 19, 2018

Accepted: August 14, 2019

ePublished: December 20, 2018

### ABSTRACT

The use of environmentally friendly methods is one of the new approaches in combating pathogens in aquaculture systems. The purpose of this research was the possibility evaluation of indirect use of Ag-NPs-coated porous ceramic in water filtration of culture system of shrimp post-larvae to control *Vibrio harveyi*. In this study, Ag-NPs-coated filters were characterized by various analytical techniques such as FTIR, XRD, ICP, and SEM. In this study, the antibacterial activity of Ag-NPs-coated on porous ceramic against mentioned bacteria via in vitro experiments Zone of inhibition test and Test tub test were determined. Then porous ceramic filter media used for water treatment. Therefore, the performance of the Ag-NPs-coated on porous ceramics in removing pathogenic bacteria was studied in two phases: In the first phase, *V. harveyi* was inoculated to the water and efficacy of filters of inhibition of bacteria was evaluated via total count of bacteria in the test water; in the second phase, the performance of the Ag-NPs-coated on porous ceramic was tested in the presence of shrimp larvae and efficacy of filters in inhibition of bacteria was evaluated via total count of bacteria, mortality rate, clinical signs, and also hepatopancreas and muscle culture. Based on the results, the highest zone of inhibition obtained in presence of Ag-NPs-coated porous ceramic modified by an aminosilane coupling agent, 3-Amino-Propyl-Triethoxysilane (APTES; the samples were immersed in the silver colloidal solution for 24h). The results of the flow test showed the highest bacteria removal efficiency from water with complete removal of the targeted pathogen. In the second phase, the results indicated a significant difference in decreasing of water bacteria, shrimp mortality and disease symptoms in treatment containing silver compounds compare to controls. According to results, Ag-NPs-coated porous ceramic have a high bacteria removal efficiency for the disinfection of water of culture system of shrimp to control *Vibrio harveyi*.

**Keywords** *Litopenaeus vannamei*; Porous Ceramic; Silver Nanoparticles; *Vibrio harveyi*

### CITATION LINKS

[1] Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in ... [2] Distribution of luminescent *Vibrio harveyi* and their bacteriophages in a commercial shrimp hatchery ... [3] Vibrios as causal agents ... [4] Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* ... [5] Bacterial contamination in shrimp farms in Abadan ... [6] Infectious disease in shrimp species with aquaculture ... [7] Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* ... [8] Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated ... [9] Nanotechnology as a novel tool in fisheries and aquaculture development ... [10] Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical ... [11] Physicochemical characterization and antimicrobial activity of nanosilver ... [12] Antimicrobial effects of silver ... [13] Effect of nanosilver particles on hatchability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ... [14] The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, ... [15] Coating of silver film onto the inner pore surfaces of the reticulated alumina ... [16] Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for ... [17] Performance evaluation of ceramic filter ... [18] Reducing diarrhea through the use of household-based ceramic ... [19] Sustainable colloidal-silver-impregnated ceramic filter for ... [20] Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as ... [21] Application of granule and filament silver zeolite (zeomic) in ... [22] New trends on microbiological water ... [23] Cost-effective filter materials coated with silver nanoparticles for ... [24] Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions ... [25] Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of ... [26] Preparation of colloidal ... [27] Molecular identification of *Vibrio harveyi* from larval stage of Pacific white shrimp... [28] Antibiotic glass slide coated with silver nanoparticles ... [29] Chemical assembly of silver nanoparticles on stainless steel for ... [30] Fabrication of antibacterial water filters by coating silver nanoparticles on ...

## کاربرد بسترهای سرامیک متخلخل پوشش یافته با نانوذرات نقره در سیستم فیلتراسیون آب پرورش پستلارو میگوی سفید غربی به منظور کنترل عفونت ناشی از باکتری ویبریو هاروی

فاطمه حسین پور دلاور\* MSc

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

محمود نفیسی بهابادی PhD

گروه شیلات و آبزی پروری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر، بوشهر، ایران

مریم میربخش PhD

پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران

خدا بخش نیکنام PhD

گروه شیمی آلی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه خلیج فارس بوشهر، بوشهر، ایران

سیدعلی جوهری PhD

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

عصمت محمدی باغملایی MSc

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

### چکیده

استفاده از روش های سازگار با محیط زیست یکی از راهکارهای نوین در مبارزه با عوامل بیماری زا در سیستم های تکثیر و پرورش آبزیان است. هدف مطالعه حاضر بررسی امکان استفاده غیرمستقیم از فیلترهای سرامیکی محتوی نانوذرات نقره در سیستم فیلتراسیون آب پرورش پستلارو میگوی سفید غربی به منظور کنترل باکتری ویبریو هاروی بوده است. بدین منظور، بسترهای فیلتر سرامیکی با نانوذرات نقره پوشش داده شد و توسط تکنیک های ICP، XRD، FT-IR و SEM مورد بررسی قرار گرفت. در ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی فیلترهای محتوی نانوذرات نقره در شرایط آزمایشگاهی از آزمون های آنتی بیوگرام روی پلیت و داخل لوله استفاده شد. سپس عملکرد فیلترها در شرایط "درون تنی" در دو مرحله مطالعه شد: در مرحله اول باکتری به آب تلقیح و کارایی فیلترها از طریق سنجش بار باکتریایی آب ارزیابی شد، در مرحله دوم عملکرد فیلترها در حضور لاروهای میگوی سفید غربی از طریق سنجش بار باکتریایی آب، میزان مرگ و میر و علایم بالینی میگوها و نیز کشت از هیاتوپانکراس و عضله مطالعه شد. براساس نتایج، بالاترین قطر هاله عدم رشد در قطعات سرامیکی نقره اندود در حضور پیش ماده ۳-آمینو-پروپیل-تری اتوکسی سیلان (APTES: ۲۴ ساعت غوطه ور در کلوتید) به دست آمد. نتایج حاصل از آزمون فیلترها در شرایط "درون تنی" نشان داد که باکتری ها به طور کامل حذف شدند. در مرحله دوم نیز نتایج اختلاف معنی داری را در کاهش بار باکتریایی آب، تلفات میگو و ظهور علایم بیماری در تیمارهای حاوی نانوذرات نقره نشان داد. با توجه به این نتایج فیلترهای نقره اندود دارای کارایی بسیار بالایی برای استفاده در سیستم فیلتراسیون آب هستند.

**کلیدواژه ها:** میگوی سفید غربی، سرامیک متخلخل، نانوذرات نقره، ویبریو هاروی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲۳

\*نویسنده مسئول: fhosseinpour18@gmail.com

### مقدمه

در بیست سال اخیر صنعت آبزی پروری و به ویژه پرورش میگو پیشرفت قابل توجهی داشته است. صنعت آبزی پروری علی رغم این رشد قابل توجه همواره با مشکلاتی روبه رو بوده است که از آن جمله می توان به کنترل کیفیت آب، شیوع بیماری ها و غیره اشاره کرد. به نحوی که شیوع بیماری ها به عنوان مشکل اصلی پرورش میگو و آبزی پروری، گسترش اقتصادی این صنعت را در بسیاری از کشورها تحت تاثیر قرار داده است. از مهم ترین میکروارگانیسم های پاتوژنیک که این صنعت با آن درگیر است باکتری ها بالاخص ویبریو ها هستند.

یکی از مهاجم ترین ویبریو ها، ویبریو هاروی (*Vibrio harveyi*) عامل ویبریوزیس درخشان (لومینسانس) به عنوان مهم ترین معضل بهداشتی و بیماری های میگوهای پرورشی مطرح است [1-4]. اگرچه این نوع عفونت بیشتر در تفریخگاه ها عمومیت دارد [5, 6] و سبب تلفات بالای ۷۰٪ در لارو و پستلارو میگوها می شود [7]، ولی اخیراً به یک مشکل برای استخرهای پرورشی نیز تبدیل شده و تحت عنوان بیماری میگوهای درخشان یا سندرم درخشندگی باکتریایی شناخته شده است [5, 8]. هرچند راه حل هایی نیز برای حل این مشکلات ارایه شده است اما موفقیت چندان در پی نداشته است. به عنوان مثال در زمینه کنترل بیماری استفاده از داروهای ضد میکروبی (پادزیست ها) مطرح شد که پس از سال ها این داروها خود مشکلات عدیده ای از جمله مقاوم شدن پاتوژن ها، مسایل زیست محیطی و غیره را ایجاد نمودند به طوری که امروزه در اغلب کشورها استفاده از پادزیست ها ممنوع یا با محدودیت های شدیدی مواجه شده است. در سال های اخیر استفاده از فناوری نانو به عنوان جایگزینی برای روش های درمان قبلی مطرح شده که به نظر می رسد که می تواند بسیاری از مشکلات را مرتفع سازد.

فناوری نانو تکنیک طراحی، تولید، توصیف و کاربرد ساختارها و ابزارها و سیستم هایی با مقیاس یک تا ۱۰۰ نانومتر است که در این ابعاد خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی ماده غیرمعمول بوده و کاربردهای جدید و منحصر به فردی از این مواد نانومتری ممکن می شود [9]. در این میان نانوذرات فلزی از جایگاه ویژه ای برخوردار هستند [10]. نانوذرات نقره اغلب به دلیل خواص ضدباکتریایی آن مورد استفاده قرار می گیرند [11] و نتایج تمام مطالعاتی که تاکنون درباره اثرات ضدباکتریایی نانوذرات نقره انجام شده است، نشان می دهد این ماده در غلظت های پایین سبب مهار رشد و مرگ میکروارگانیسم ها می شود، در حالی که اثر سمی چندان بر سلول های یوکاریوتی ندارند [12]. یکی از مهم ترین مزایای نانوذرات نقره در مقایسه با پادزیست ها این است که آنها می توانند اهداف مختلفی را با عملکردهای متفاوت و به طور همزمان تهدید کنند و بنابراین مقاومت در مقابل این قبیل مواد ضد میکروبی در مقایسه با پادزیست های رایج به سختی پدید می آید [12].

همزمان با پیشرفت فناوری نانو در سال های اخیر، از نانوذرات نقره برای درمان بیماری های آبزیان به صورت حمام مستقیم استفاده شده است [13, 14] که متعاقب با آن نگرانی ناشی از پیامدهای منفی انتشار این ذرات در محیط زیست دو چندان شده است. به همین دلیل هدف از انجام مطالعه حاضر امکان سنجی استفاده غیرمستقیم از خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره در قالب پوشش دهی این نانوذرات روی بسترهای فیلتری از جنس سرامیک متخلخل و سپس استفاده از این بسترها برای تصفیه آب مورد استفاده در آبزی پروری است.

استفاده از سرامیک متخلخل محتوی نانوذرات نقره در تصفیه آب نسبتاً جدید است [15, 16]. در اواخر دهه ۱۹۸۰ و اوایل دهه ۱۹۹۰ استفاده از فیلترهای سرامیکی به منظور تیمار آب در بازارهای جهان سوم ظاهر گشت و ارزیابی عملکرد آنها در تعدادی از مقالات منتشر شد [17-19]. فیلترهای سرامیکی برای حذف کدورت و همچنین پاتوژن ها در آب طراحی شده اند و دارای قیمت پایینی هستند [19]. یکی از برتری های فیلترهای سرامیکی نسبت به سایر فیلترها شبکه سه بعدی و تو در توی آنها است که موجب به دام افتادن ذرات ناخالص آب می شود. آب هنگام عبور از این شبکه تو در تو و به هم پیوسته دائماً با دیواره فیلترها برخورد می کند که همین امر سبب جداسازی و چسبیدن ذرات ناخالص به دیواره فیلترها می شود [15]. از طرفی انواع

اسیدسولفوریک ۹۸٪ / آب اکسیژنه ۳۰٪) که به آرامی در حال جوشیدن بود غوطه‌ور شد؛ سپس به منظور عامل‌دار کردن سطح سرامیک‌ها از طریق تعدیل گروه‌های آمینی در سطوح مجاری سرامیک‌های متخلخل، فیلترها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول اتانولی محتوی ۳- آمینو- پروپیل- تری‌اتوکسی‌سیلان ۱٪ (APTES) غوطه‌ور شدند. اسیدیته محلول در حدود ۵/۵-۳/۵ با اضافه کردن محلول آبی  $\text{CH}_3\text{COOH}$  تنظیم شد. سپس سرامیک‌های متخلخل با اتانول شسته شده و در شرایط خلاء در آن در دمای  $100^\circ\text{C}$  به مدت حداقل ۲ ساعت قرار داده شدند تا به اتصال کامل مولکول‌های APTES روی سرامیک‌های متخلخل کمک کند. قطعات سرامیکی طی سه زمان ۲۴، ۳۰ و ۳۶ ساعت در محلول کلوتید نانوذرات نقره غوطه‌ور شدند. سپس سرامیک‌ها به وسیله اتانول شسته شدند تا نانوذراتی که به خوبی به سطح سرامیک‌ها متصل نشده‌اند رها شوند و در پایان در معرض هوای آزاد قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند [16].

**تعیین ویژگی‌های سرامیک‌های پوشش‌یافته با نانوذرات نقره:** به منظور حصول اطمینان از نحوه مناسب پوشش‌دهی و تعیین ویژگی‌های نانوذرات پوشش‌یافته روی بسترهای سرامیکی، خصوصیات آنها توسط روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. به منظور شناسایی پیوندهای تشکیل شده در بسترهای سرامیکی پس از عامل‌دار کردن با گروه‌های آمینی، آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز به وسیله دستگاه FT-IR 460 Plus (JASCO؛ ژاپن) با تکنیک قرص KBr انجام شد. به منظور تعیین غلظت نانوذرات نقره پوشش‌دهی شده روی بسترهای سرامیکی از دستگاه طیف‌سنجی پلاسمای جفت‌شده القایی (ICP) مدل PerkinElmer Optima DV ICP-OES 7300 (پرکین‌المر؛ ایالات متحده آمریکا) استفاده شد (روش آماده‌سازی: به میزان ۰/۲ گرم از نمونه را توزین کرده و با مقدار ۱۰ سی‌سی اسیدنیتریک غلیظ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $90^\circ\text{C}$  حرارت می‌دهیم. پس از انحلال کامل آن را با آب مقطر (بدون یون کلر) به حجم ۵۰ سی‌سی می‌رسانیم). ماهیت بلورینگی نانوذرات نقره پوشش‌دهی شده روی بسترهای سرامیکی توسط دستگاه پراش پرتو ایکس (XRD) مدل Bruker D8 Advance (Bruker؛ آلمان) با تابش  $\text{CuK}\alpha$  و با طول موج ۱/۵۴۰۵۶ آنگستروم بررسی شد (زاویه تابش ۲۵). مورفولوژی و اندازه ذرات قرارگرفته روی بسترهای فیلتری با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل EM-3200 (KYKY؛ چین) بررسی شد.

**مطالعات در شرایط برون‌تن:** حساسیت باکتری ویبریو به بسترهای فیلتری پوشش‌یافته با نانوذرات نقره با استفاده از آزمون آنتی‌بیوگرام روی پلیت و آنتی‌بیوگرام داخل لوله مورد بررسی قرار گرفت. در آزمون آنتی‌بیوگرام روی پلیت، قطعات سرامیکی پوشش‌دهی شده با نانوذرات نقره روی سطح پلیت‌های محتوی محیط کشت مولر هینتون آگار نمکی و باکتری ویبریو هاروی ISO1 PTTC 1755 (معادل ۵/۵ مک فارلند) قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای  $30^\circ\text{C}$ ، اندازه هاله عدم رشد اطراف سرامیک محتوی نانوذرات نقره که باکتری‌ها نتوانسته بودند، رشد کنند با نمونه شاهد (سرامیک‌های فاقد نانوذرات نقره) مقایسه شد [16]. برای انجام آزمایش آنتی‌بیوگرام داخل لوله، در داخل لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط مایع تریپتیک سوی‌براث نمکی، ۱ سی‌سی از سوسپانسیون باکتریایی ویبریو هاروی معادل ۵/۵ مک فارلند تلقیح شد، سپس قطعاتی به ابعاد  $1 \times 1$  سانتی‌متر از بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش‌یافته با نانوذرات نقره درون آن انداخته شد. پس از گذشت ۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت، از محیط کشت داخل لوله روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار نمکی کشت داده

میکروارگانیزم‌ها می‌توانند به سطح سرامیک‌های متخلخل متصل شده و باعث رشد بیوفیلم در آنها شوند و یکی از راهکارهای مناسب برای مبارزه با این پدیده تلفیق فیلترهای سرامیکی با نانوذرات نقره است [16].

از مطالعات انجام‌شده در استفاده از فیلترهای پوشش‌دهی شده با نقره در تصفیه آب می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: اسمیت و /ویندل [19] و وی و همکاران [16] امکان‌سنجی استفاده از فیلترهای سرامیکی ارتقایافته با نانوذرات نقره و خصوصیات ضدباکتری آن را به منظور تصفیه میکروبیولوژیکی آب آشامیدنی مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که نانوذرات نقره با آزادسازی یون‌های نقره توانسته‌اند به سلول‌های باکتری آسیب برسانند. در مطالعه‌ای که توسط جین و همکاران [20] صورت گرفت چگونگی آماده‌سازی و خصوصیات بسترهایی از جنس فوم‌های پلی‌اورتان پوشش‌دهی شده با نانوذرات نقره به منظور کنترل دو سویه از/شریشیا کلی بررسی شد، نتایج این تحقیق خواص ضدباکتریایی پلی‌اورتان نقره‌اندود را اثبات کرد. همچنین قهرمانی و همکاران [21] در یک تحقیق با هدف کنترل باکتری استریپتوکوکوس/اینیایی امکان‌سنجی کاربرد نانوذرات نقره و ژئولیت نقره در سیستم فیلتراسیون آب پرورش بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را مورد مطالعه قرار دادند و نتایج اختلاف معنی‌داری را در کاهش بار باکتریایی آب، تلفات ماهی و ظهور علائم بیماری در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد.

اگرچه مطالعات مختلفی وجود دارد که از نانوذرات نقره به صورت پوشش‌دهی روی بسترهای مختلف برای کاربردهای ضد میکروبی استفاده شده است [20، 22، 23]، اما همچنان تلاش برای یافتن بسترهایی جدید به منظور نشان دادن نانوذرات روی آن و بررسی تأثیرات ضدباکتریایی آنها در پیشگیری یا درمان بیماری‌های منتقله از آب و هوا ادامه دارد. بنابراین هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی امکان‌سنجی کاربرد بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش‌یافته با نانوذرات نقره در سیستم فیلتراسیون آب مورد استفاده در پرورش پست‌لارو میگوی سفید غربی بود.

## مواد و روش‌ها

**سویه باکتری:** برای این مطالعه از سویه باکتریایی ویبریو هاروی (*Vibrio harveyi* ISO1 PTTC 1755) که قبلاً از میگوهای تلف‌شده بر اثر بیماری ویبریوزیس توسط پژوهشکده میگوی بوشهر جداسازی و خالص‌سازی شده بود، استفاده شد (NCBI: GU974342.1).

**نانوذرات نقره:** در مطالعه حاضر از کلوتید نانوذرات نقره (نانونصب پارس؛ ایران) با نام تجاری نانوسید L2000 استفاده شد. مشخصات این کلوتید قبلاً به طور کامل مورد سنجش قرار گرفته و گزارش شده است [24، 25]. براساس نتایج مطالعات مذکور، به طور خلاصه کلوتید مورد استفاده حاوی نانوذرات نقره با غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر، پتانسیل زتای  $53/33 \pm 7/86$  میلی‌ولت و اسیدیته ۲/۴۰ بود؛ همچنین میانگین قطر نانوذرات نقره در کلوتید مذکور  $16/6$  نانومتر است. نانونقره مذکور توسط سازمان ثبت اختراعات ایالات متحده آمریکا با شماره ۲۰۰۹۰۱۳۸۲۵ به ثبت رسیده است [26].

**سرامیک متخلخل:** سرامیک متخلخل با ترکیب سیلیکون‌کارباید (محتوی بیش از ۶۰٪ سیلیس) و ابعاد  $4 \times 4 \times 2$  سانتی‌متر (فارس‌ریزان مواد؛ تهران؛ ایران) در آزمایشگاه با اعمال نیروی فیزیکی به ابعاد کوچک‌تر ( $1 \times 1$  سانتی‌متر) تبدیل شد.

**فریند پوشش‌دهی سرامیک‌ها با نانوذرات نقره:** ابتدا قطعات سرامیکی به مدت ۲۰ دقیقه داخل محلول پیرانها (۳:۱ حجمی/حجمی،

شد؛ پس از شمارش پرکنه‌های باکتریایی، به منظور تعیین اثر سرامیک‌های مورد استفاده بر باکتری مورد آزمایش، تعیین و مقایسه فراوانی باکتریایی کل در نمونه‌های تیمار و کنترل صورت گرفت [16].

**آزمون جریان:** ۱۴۵ قطعه پست‌لارو یک‌ماهه (PL 30) میگوی سفید غربی از یکی از مراکز تکثیر بخش خصوصی واقع در شهرستان دلواری در استان بوشهر تهیه شد و به آزمایشگاه تحقیقاتی پژوهشکده میگوی کشور انتقال یافت و پس از عادت‌پذیری در یک تانک ۲۰۰ لیتری رهاسازی شدند، سازگار نمودن میگوها با شرایط آزمایشگاه با بررسی سلامت آنها از نظر علایم ظاهری به مدت ۷ روز با کنترل شرایط محیطی شامل دمای  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  و شوری  $36 \pm 2$  گرم در لیتر انجام شد. سایر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب شور استفاده شده در آزمایش حاضر در جدول ۱ نشان داده شده است.

**جدول ۱) مقادیر برخی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب مورد استفاده طی انجام آزمایش**

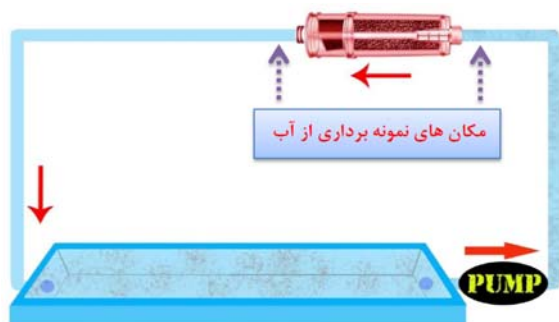
| فاکتورها                  | مقدار   |
|---------------------------|---------|
| سختی (گرم بر لیتر)        | ۵/۸۵    |
| اسیدیته                   | ۷/۹-۸/۲ |
| کلراید (گرم بر لیتر)      | ۲۰/۴۴   |
| فسفات (میلی گرم بر لیتر)  | ۰/۳۹    |
| نیتریت (میلی گرم بر لیتر) | ۰/۰۱۸   |
| نیترات (میلی گرم بر لیتر) | ۰/۰۸۱   |

پس از سازگار نمودن و استرس زدایی میگوها در شرایط آزمایشگاه، عملیات زیست‌سنجی با اندازه‌گیری طول کل و وزن پست‌لاروها انجام شد و تعداد ۱۵ قطعه میگو با وزن متوسط  $1.5 \pm 0.2$  گرم و اندازه تقریبی  $6.0 \pm 0.6$  سانتی‌متر به هر آکواریوم (۵ لیتری) انتقال یافت. سیستم‌های فیلتری شامل ستون‌های دست‌ساز پلی‌وینیل کلراید (PVC) با قطر ۷ و طول ۲۷ سانتی‌متر بود. هر ستون با ۳۷۵ گرم از فوم‌های سرامیکی (با اندازه  $4 \pm 0.5$  سانتی‌متر مربع) پر و برای جلوگیری از خروج این بسترها، ورودی و خروجی فیلترها توسط لایه نازکی از فوم‌های اسفنجی مسدود شد تا امکان جریان آب وجود داشته باشد.

پس از بررسی خواص ضد میکروبی سرامیک‌های پوشش‌دهی شده با نانوذرات نقره در شرایط آزمایشگاهی، بهترین فیلتر انتخاب شد (فیلترهای دارای گروه آمینی که به مدت ۲۴ ساعت در کلئید نانوذرات نقره غوطه‌ور بودند بیشترین هاله رشد را داشتند). قبل از نصب و راه‌اندازی فیلترها در آکواریوم‌ها، ابتدا بسترهای فیلتر سرامیکی در یک نوبت با استفاده از آب مقطر شست‌وشو داده شد تا آن بخشی از نانوذرات که روی بستر به خوبی تثبیت نشده و از استحکام لازم برخوردار نبودند از این طریق حذف شوند. عملکرد سیستم‌های فیلتری پوشش‌دهی شده با نانوذرات نقره در مقایسه با فیلترهای شاهد (در دو شکل به صورت کنترل مثبت حاوی باکتری ویبریو هاروی و کنترل منفی بدون اضافه کردن باکتری ویبریو هاروی) در حذف این باکتری بیماری‌زا در دو مرحله مورد مطالعه قرار گرفت. در مرحله اول (بدون حضور میگو) هر کدام از آکواریوم‌های ۵ لیتری با آب دریای استریل آبیگری شدند. پس از راه‌اندازی فیلترها در یک سیستم گردش با دبی یک لیتر در دقیقه، آلوده‌سازی آب به وسیله باکتری ویبریو هاروی با تراکم  $1.5 \times 10^4$  کلونی در میلی‌لیتر انجام شد [27]. برای سنجش میزان کنترل باکتری توسط فیلترها نمونه‌برداری از آب ورودی و خروجی فیلترها در ساعات ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۴ بعد از راه‌اندازی فیلترها انجام شد.

نمونه‌ها بلافاصله روی محیط اختصاصی ویبریو، تیوسولفات سیترات نمک صفراوی ساکاروز (TCBS) کشت داده و انکوبه شدند و پلیت‌ها در فواصل زمانی ۲۴ تا ۴۸ ساعت به طور مرتب به منظور شمارش کلونی‌های باکتری بررسی شدند.

در مرحله دوم فیلترهای مذکور در ورودی سیستم پرورش پست‌لارو میگوی سفید غربی قرار داده شد و کارایی آن در شرایط حضور میگو در یک دوره ۲۱ روزه ارزیابی شد. بدین ترتیب که آب در یک سیستم گردش قبل از ورود به آکواریوم‌ها از فیلتر عبور داده شد. سپس اقدام به آلوده‌سازی هر یک از آکواریوم‌ها با باکتری ویبریو هاروی شد [27]. سپس در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت بعد از راه‌اندازی فیلترها از آب نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها روی محیط TCBS کشت و انکوبه شدند و پلیت‌ها در فواصل زمانی ۲۴ تا ۴۸ ساعت به طور مرتب به منظور شمارش کلونی‌های باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. برای سنجش کارایی هر یک از فیلترها علاوه بر نمونه‌برداری و کشت باکتری از نمونه آب، میزان مرگ و میر پست‌لاروها، علایم ظاهری و ضریب بازماندگی آنها در گروه‌های تحت تیمار فیلترهای محتوی نانوذرات نقره در مقایسه با گروه شاهد محاسبه و بررسی شد. به منظور اطمینان از بروز ویبریوزیس در میگوهای تلف شده، مقداری از عضله و هپاتوپانکراس آنها در محیط TCBS کشت داده شد و حضور یا عدم حضور باکتری ویبریو هاروی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در پایان به منظور ارزیابی تشکیل بیوفیلم باکتریایی از هر فیلتر به میزان یک گرم در داخل محیط تربیتیک‌سوی‌براث (TSB) کشت داده و کدورت ناشی از رشد باکتری بعد از ۲۴ ساعت بررسی و از آن روی محیط TCBS کشت تهیه شد (شکل ۱).



**شکل ۱) طرح شماتیک سیستم فیلتراسیون حذف باکتری بیماری‌زای ویبریو هاروی**

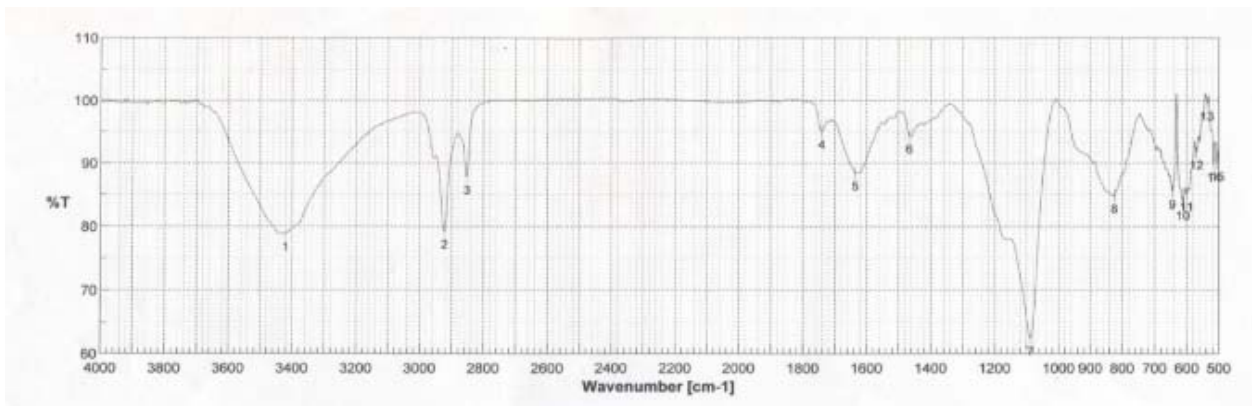
**تجزیه و تحلیل آماری:** نرمالیتی داده‌های حاصل از این تحقیق با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف پردازش شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزارهای اکسل ۲۰۱۰ و SAS 9.1.3 Portable و X'Pert High Score Version 1.0d 2003 صورت گرفت. برای تعیین معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها، آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه در سطح ۰/۰۱ و آزمون دانکن استفاده شدند.

## یافته‌ها

**ویژگی‌های بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش‌یافته با نانوذرات نقره:** نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز در نمودار ۱ نشان داده شده است. پیک‌های در محدوده  $1100$  و  $800$   $\text{cm}^{-1}$  به ترتیب به ارتعاشات کششی و خمشی Si-O-Si نسبت داده می‌شود که نشان از حضور بالای سیلیکا در فوم‌ها است. همچنین پیک پهنی که در  $3400$   $\text{cm}^{-1}$  مشاهده می‌شود مربوط به ارتعاشات کششی گروه OH سیلیکا است. پیک‌های مشاهده شده در  $1640$  و  $1460$   $\text{cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به

نتایج حاصل از طیف‌سنجی پلاسما جفت‌شده القایی در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است براساس داده‌های موجود در جدول‌ها مشاهده می‌شود که میزان نانوذرات نقره پوشش‌یافته روی بسترهای پوشش‌داده‌شده با گروه‌های آمینی بیشتر از بسترهای بدون APTES است؛ از طرفی مشاهده شد که با افزایش زمان غوطه‌وری نمونه‌ها در کلوتید نانوذرات نقره در زمان‌های مذکور تفاوت چشمگیری در غلظت نانوذرات نقره تثبیت‌شده روی سطوح دیده نمی‌شود (جدول‌های ۲ و ۳).

ارتعاشات کششی گروه N-H و ارتعاش خمشی گروه  $\text{NH}_2$  است که حضور گروه‌های آمینی مربوط به APTES در بستر را تایید می‌کند. پیک‌های  $2860\text{ cm}^{-1}$  و  $2920$  به ارتعاش کششی گروه‌های  $\text{CH}_2$  مربوط است. این بررسی مقایسه‌ای اثبات می‌کند که گروه‌های OH روی سطح سیلیکاتی با گروه‌های اتوکسی‌سیلان واکنش داده و منتج به خروج گروه‌های اتوکسی از ترکیب APTES شده و تشکیل گروه  $\text{NH}_2\text{-propyl-Si-O-Si}$  روی سطح می‌شود. همان‌طور که واضح است گروه آمین آزاد روی سطح سرامیک تشکیل می‌شود.



نمودار (۱) طیف FT-IR بسترهای فیلتر سرامیکی پس از عامل‌دارکردن با پیش‌ماده APTES

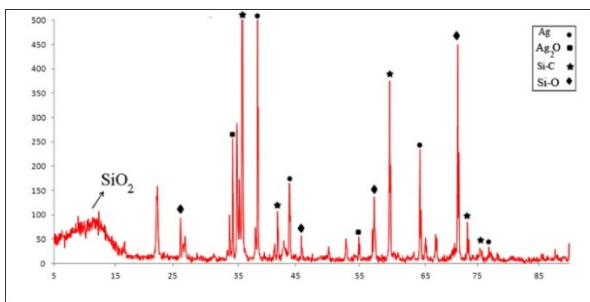
است. نتایج حاصل از بررسی منحنی‌های پراش اشعه ایکس نشان‌دهنده ساختار کریستالی نانوذرات نقره در زاویه  $2\theta$ ،  $38/2$ ،  $44/5$ ،  $64/4$  و  $77/1$  درجه است. از نتایج مشهود است که وجود قله‌های (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) به ترتیب در زوایای ذکرشده، غالباً به علت حضور ذرات نقره در مقیاس نانو است، همچنین درجه کریستالی نمونه‌ها، ساختار بلوری fcc را در آنها نشان می‌دهد. همچنین نوع ساختار کریستالی و زوایای سایر طیف‌های مشخص‌شده در نمودارهای ۲ تا ۵ در جدول ۴ ذکر شده است.

جدول (۲) نتایج حاصل از آنالیز ICP در بسترهای فیلتر سرامیکی در حضور پیش‌ماده APTES

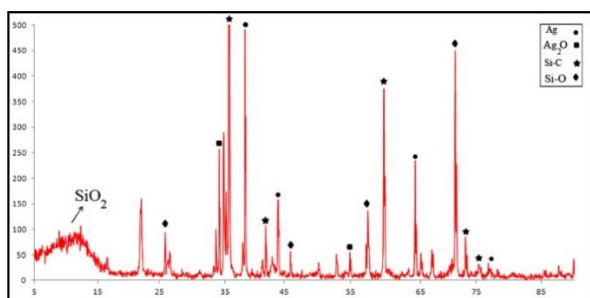
| میزان نانوذرات نقره در فوم‌های سرامیکی (ppm) | زمان تیمارهای مختلف (ساعت) |
|----------------------------------------------|----------------------------|
| ۴۴۰                                          | ۲۴                         |
| ۴۶۵                                          | ۳۰                         |
| ۴۷۰                                          | ۳۶                         |

جدول (۳) نتایج حاصل از آنالیز ICP در بسترهای فیلتر سرامیکی در غیاب APTES

| میزان نانوذرات نقره در فوم‌های سرامیکی (ppm) | زمان تیمارهای مختلف (ساعت) |
|----------------------------------------------|----------------------------|
| ۳۰۰                                          | ۲۴                         |
| ۳۳۵                                          | ۳۰                         |
| ۳۴۲                                          | ۳۶                         |



نمودار (۲) طیف XRD بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش‌داده‌شده با نانوذرات نقره در حضور پیش‌ماده APTES، پس از ۲۴ ساعت غوطه‌وری در کلوتید نانوذرات نقره



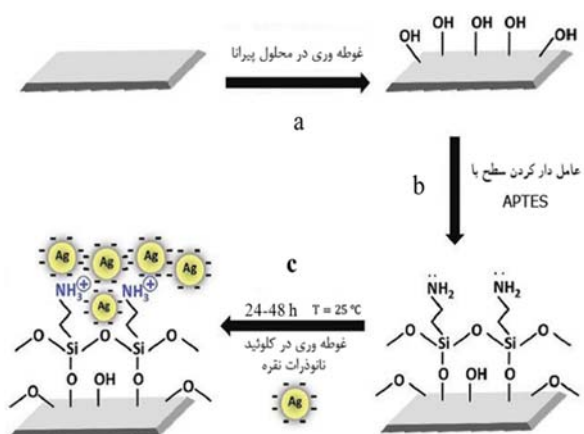
نمودار (۳) طیف XRD بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش‌داده‌شده با نانوذرات نقره در حضور پیش‌ماده APTES، پس از ۳۰ ساعت غوطه‌وری در کلوتید نانوذرات نقره

جدول (۴) طیف‌های پراش اشعه ایکس

| عناصر                 | زاویه $2\theta$ | نوع ساختار کریستالی |
|-----------------------|-----------------|---------------------|
| Ag                    | $38/2$          | ۱۱۱                 |
|                       | $44/5$          | ۲۰۰                 |
|                       | $64/4$          | ۲۲۰                 |
|                       | $77/1$          | ۳۱۱                 |
| $\text{Ag}_2\text{O}$ | $33/3$          | ۱۱۱                 |
|                       | $55/00$         | ۲۲۰                 |
| Si-O                  | $28/4$          | ۱۱۱                 |
|                       | $47/3$          | ۲۲۰                 |
|                       | $57$            | ۳۱۱                 |
|                       | $69$            | ۴۰۰                 |
| Si-C                  | $36$            | ۱۱۱                 |
|                       | $41/9$          | ۲۰۰                 |
|                       | $60$            | ۲۲۰                 |
|                       | $72$            | ۳۱۱                 |
|                       | $76$            | ۲۲۲                 |

الگوهای پراش اشعه ایکس مربوط به بسترهای فیلتر سرامیکی پس از پوشش‌دهی با نانوذرات نقره در نمودارهای ۲ تا ۵ نشان داده شده

**نتایج تست‌های آنتی‌بیوگرام:** فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره تثبیت‌شده روی فوم‌های سرامیکی با مشاهده و اندازه‌گیری هاله محدودیت رشد باکتری مذکور در اطراف نمونه‌های حاوی نانوذرات نقره برای میکروارگانیزم آزمایش‌شده به اثبات رسید. نتایج به‌دست‌آمده در این بررسی حاکی از حساسیت بالای باکتری ویبریو هاروی به نانوذرات نقره است زیرا این باکتری حتی در غلظت‌های بسیار کم نانوذرات تثبیت‌شده روی فوم‌های سرامیکی نیز تشکیل هاله‌ای مشخص داده است. همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، بیشترین قطر هاله عدم رشد علیه باکتری ویبریو هاروی در بسترهای فیلتر سرامیکی دارای گروه‌های آمینی که به مدت ۲۴ ساعت در کلونید نانوذرات نقره غوطه‌ور بوده‌اند مشاهده شد (به‌طور متوسط ۲۰/۷۳ میلی‌متر) و کمترین قطر هاله عدم رشد که بر باکتری ویبریو هاروی موثر بود، برای فوم‌های نقره‌اندود فاقد گروه‌های آمینی در ۲۴ ساعت غوطه‌وری به دست آمد (به‌طور متوسط ۱۸ میلی‌متر). این در حالی است که در تیمارهای محتوی بسترهای فیلتر سرامیکی فاقد نانوذرات نقره، هیچ هاله عدم رشد باکتری مشاهده نشد (شکل ۳). نتایج آزمایش تست لوله نشان می‌دهد که بعد از تماس باکتری در زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۲۴ با سرامیک‌های پوشش‌یافته با نانوذرات نقره در مقایسه با نمونه‌های شاهد دارای سرامیک معمولی و فاقد آن هیچ باکتری و کدورتی مشاهده نشد. نتایج مشخص نمود که نانوذرات نقره تثبیت‌شده روی بسترهای فیلتر سرامیکی در این آزمایش اثر ضدباکتریایی مناسبی بر باکتری مذکور داشته‌اند (جدول ۵ و شکل ۴).

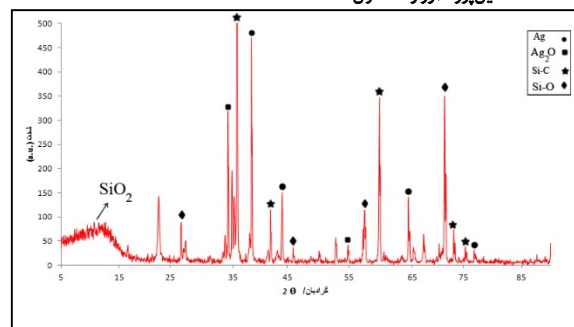


**شکل ۳** مکانیزم پیشنهادی واکنش بین سطح سرامیک متخلخل و نانوذرات نقره از طریق پل ارتباطی APTES

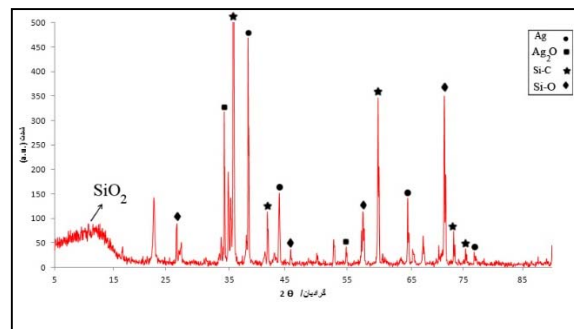
**جدول ۵** مقایسه میانگین هاله عدم رشد باکتری ویبریو هاروی در مقابل بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش‌یافته با نانوذرات نقره

| نوع بستر فیلتر | میانگین هاله عدم رشد (میلی‌متر) |
|----------------|---------------------------------|
| A-24 hr        | ۲۰/۷۳±۰/۲۸ <sup>A</sup>         |
| A-30 hr        | ۱۸/۴۷±۰/۳۵ <sup>B</sup>         |
| P-24 hr        | ۱۸/۰۳۱±۰/۳۷ <sup>B</sup>        |
| P-30 hr        | ۱۸/۲۵±۰/۲۵ <sup>B</sup>         |
| شاهد           | ۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>C</sup>          |

(۱) نمونه‌های تهیه‌شده در حضور پیش‌ماده APTES از طریق غوطه‌وری به مدت ۲۴ ساعت در کلونید نانوذرات نقره، (۲) نمونه‌های تهیه‌شده در حضور پیش‌ماده APTES از طریق غوطه‌وری به مدت ۳۰ ساعت در کلونید نانوذرات نقره، (۳) نمونه‌های تهیه‌شده در غیاب پیش‌ماده APTES از طریق غوطه‌وری به مدت ۲۴ ساعت در کلونید نانوذرات نقره، (۴) نمونه‌های تهیه‌شده در غیاب پیش‌ماده APTES از طریق غوطه‌وری به مدت ۳۰ ساعت در کلونید نانوذرات نقره؛ \*حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها (میانگین±انحراف معیار) است.

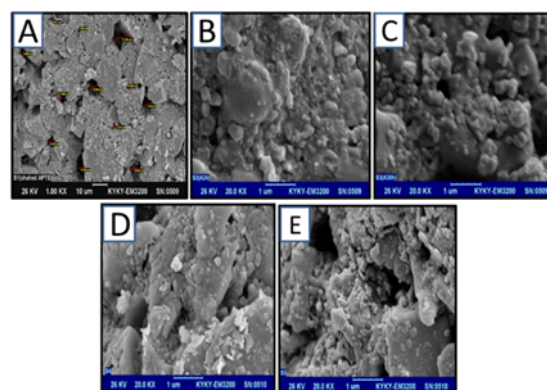


**نمودار ۴** طیف XRD بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره در غیاب پیش‌ماده APTES، پس از ۲۴ ساعت غوطه‌وری در کلونید نانوذرات نقره

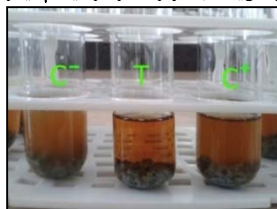


**نمودار ۵** طیف XRD بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره در غیاب پیش‌ماده APTES، پس از ۳۰ ساعت غوطه‌وری در کلونید نانوذرات نقره

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح بسترهای فیلتر سرامیکی معمولی و بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش‌یافته با نانوذرات نیز نشان‌دهنده پوشش مناسب سطوح فوم‌های سرامیکی با نانوذرات نقره است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در هر جفت شکل B، C، D و E با افزایش زمان غوطه‌وری مقدار نانوذرات نقره کوت‌شده افزایش یافته در نتیجه رافنس و زبری سطح افزایش پیدا کرده است. همچنین به نظر می‌رسد که حضور گروه‌های آمینی APTES روی سطوح مورد نظر موجب افزایش کوتینگ نانوذرات نقره و افزایش رافنس سطح شده است (مثل تاثیر زمان؛ شکل ۲؛ نمودارهای ۲ تا ۵).



**شکل ۲** تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح بسترهای فیلتر سرامیکی (A: بسترهای فیلتر سرامیکی معمولی؛ B: بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره در حضور APTES، پس از ۲۴ ساعت غوطه‌وری در کلونید نانوذرات نقره؛ C: بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره در حضور APTES، پس از ۳۰ ساعت غوطه‌وری در کلونید نانوذرات نقره؛ D: بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره در غیاب APTES، پس از ۲۴ ساعت غوطه‌وری در کلونید نانوذرات نقره؛ E: بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش داده‌شده با نانوذرات نقره در غیاب APTES، پس از ۳۰ ساعت غوطه‌وری در کلونید نانوذرات نقره)



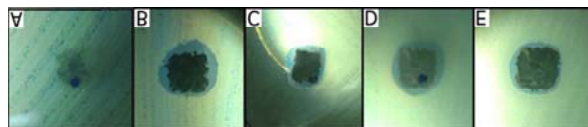
**شکل ۵)** مقایسه کدورت داخل لوله‌ها حاوی فیلترهای سرامیکی بعد از پایان کار در محیط تریپتیک‌سوی‌پراث (C-): فیلتر مدیاهای کنترل منفی، C+: فیلتر مدیاهای کنترل مثبت، T: فیلتر مدیاهای پوشش‌یافته با نانوذرات نقره

### بحث

نتایج تمام آزمون‌های مختلفی که به‌منظور بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره در این پژوهش انجام شد، نشان می‌دهد که این ماده در غلظت‌های پایین سبب مهار رشد باکتری و بیبریو هاروی می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده در آزمون هاله عدم رشد حاکی از حساسیت بالای باکتری و بیبریو هاروی به نانوذرات نقره است؛ زیرا این باکتری حتی در غلظت‌های بسیار کم نانوذرات تثبیت‌شده روی بسترهای فیلتر سرامیکی تشکیل هاله‌ای مشخص داده است. با این حال، با توجه به نتایج حاصل از تست هاله عدم رشد ملاحظه می‌شود که در نمونه‌های دارای گروه‌های آمینی، با افزایش زمان غوطه‌وری در کلونی نانوذرات نقره از ۲۴ به ۳۰ ساعت، قطر هاله عدم رشد باکتری به میزان قابل توجهی کاهش یافته است ( $p \leq 0.01$ ). این در حالی است که در قطر هاله عدم رشد نمونه‌های فاقد گروه آمینی با افزایش زمان غوطه‌وری نمونه‌ها در کلونی تغییر چندانی حاصل نشده است ( $p \geq 0.01$ ). یکی از دلایل احتمالی تغییر میزان خاصیت باکتری‌کشی فیلترها میزان کوتینگ نانوذرات نقره روی بستر آنها است، برای مثال این امکان وجود دارد که در تیمار عامل‌دار شده با گروه‌های آمینی با افزایش زمان غوطه‌وری، تعداد لایه‌های تثبیت‌شده افزایش یافته، در نتیجه خاصیت ضد میکروبی این بسترها کاهش می‌یابد.

نتایج به‌دست‌آمده از تعیین خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره قرارگرفته روی بسترهای فیلتر سرامیکی نشان داد که شدت پیک‌های ۱۱۱ و ۲۰۰ در الگوهای XRD در نمونه‌های دارای گروه آمینی با قدرت باکتری‌کشی رابطه‌ای معکوس دارد، ولی در نمونه‌های فاقد گروه آمینی تغییر قابل محسوسی مشاهده نشد. این بخش از یافته‌ها با نتایج مطالعه *ام‌پنیانا مونیاتسی* و همکاران [23] هم‌خوانی داشت. بنابراین به نظر می‌رسد که نحوه تاثیرگذاری مدت زمان غوطه‌وری، بر عملکرد بسترهای فیلتر سرامیکی نیازمند تحقیقات بیشتری است. این نتایج تا حدودی مشابه نتایج حاصله در بسیاری از مطالعات دیگر است، از جمله یافته‌های مطالعات *وی و همکاران* [16, 28] و *چن و همکاران* [29] که اثرات فوم‌های سرامیکی، شیشه‌ای و استیل نقره‌اندود را بر باکتری *شرشیا کلی*، *جین و پرادیپ* [20]، همچنین *حیدرپور و همکاران* [22] و *فونگ‌فونگ و همکاران* [30] که تاثیر فوم‌های پلی‌اورتان محتوی نانونقره را به‌صورت بررسی هاله عدم رشد مطالعه نمودند.

هرچند در سال‌های اخیر، اثر ضدباکتریایی نانومواد مختلف از قبیل نانوذرات نقره در سیستم‌های تصفیه آب و به شکل غیرمستقیم گزارش شده است [20, 22, 23]، اما با توجه به بررسی در منابع موجود، تاکنون هیچ پژوهش مستندی مبنی بر کاربرد ضد میکروبی بسترهای نقره‌اندود در تصفیه میکروبی آب شور گزارش نشده است و این پژوهش اولین گزارش در این باره در ایران و جهان است. بنابراین در مطالعه حاضر، برای اولین بار به بررسی اثر ضدباکتریایی فیلترهای



**شکل ۴)** هاله عدم رشد در نمونه‌های سرامیکی (A): نمونه شاهد فاقد نانوذرات نقره، B: نمونه‌های تهیه‌شده در حضور پیش ماده APTES، غوطه‌ور در کلونی نانوذرات نقره به مدت ۲۴ ساعت، C: نمونه‌های تهیه‌شده در حضور پیش‌ماده APTES، غوطه‌ور در کلونی نانوذرات نقره به مدت ۳۰ ساعت، D: نمونه‌های تهیه‌شده در غیاب APTES، غوطه‌ور در کلونی نانوذرات نقره به مدت ۳۰ ساعت، E: نمونه‌های تهیه‌شده در غیاب APTES، غوطه‌ور در کلونی نانوذرات نقره به مدت ۲۴ ساعت

**نتایج آزمون جریان:** عملکرد سیستم‌های فیلتری در حذف باکتری و بیبریو در دو مرحله مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج به شکل ذیل است:

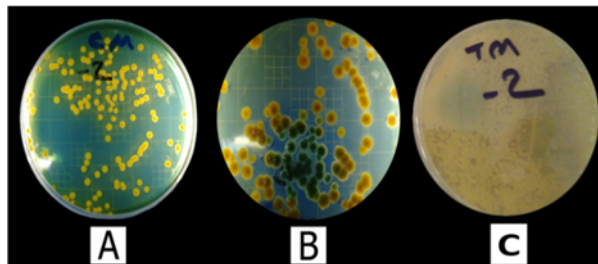
در مرحله اول نتایج نشان داد که همه فیلترها قادر به حذف کامل باکتری و بیبریو هاروی از آب بودند به‌طوری که بالاترین کارایی حذف به میزان ۱۰۰٪ به دست آمد. بنابر نتایج به‌دست‌آمده از شمارش باکتری در آب تیمارهای طی زمان‌های مختلف مشخص شد که به‌علت عدم رشد باکتری در زمان‌های نمونه‌برداری آب، قبل و بعد از فیلتر، این فیلترها باکتری مذکور را در ۲ ساعت بعد از راه‌اندازی فیلترها به‌طور کامل از آب حذف نموده‌اند.

همچنین در مرحله دوم با توجه به نتایج حاصل از شمارش باکتری‌ها، فیلترهای مذکور توانستند باکتری را با کارایی ۱۰۰٪ در ۲ ساعت بعد از راه‌اندازی فیلترها به‌طور کامل از آب حذف نمایند. همچنین براساس نتایج، میزان تلفات در طول دوره ۲۱ روزه آزمایش در تیمار کنترل منفی صفر بود. در حالی که در تیمار کنترل مثبت بیش از ۹۵٪ میگوها تا پایان دوره تلف شدند؛ اما در تیمار سرامیک‌های محتوی نانوذرات نقره میزان تلفات تقریباً ۳۰٪ بود که با دو تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد داشت ( $p < 0.01$ ). درصد تلفات در جدول ۶ نشان داده شده است (جدول ۶، شکل‌های ۵ و ۶).

**جدول ۶)** درصد تلفات ناشی از آلوده‌سازی با باکتری و بیبریو هاروی در تیمارهای مختلف

| تیمارها                                                                          | درصد تلفات  |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| کنترل منفی (فوم‌های سرامیکی فاقد نانوذرات نقره بدون اضافه‌کردن باکتری به آب)     | ۰/۰۰±۰/۰۰C  |
| کنترل مثبت (فوم‌های سرامیکی فاقد نانوذرات نقره همراه با اضافه‌کردن باکتری به آب) | ۹۷/۲۴±۳/۹۱A |
| بسترهای فیلتر سرامیکی پوشش‌یافته با نانوذرات نقره                                | ۳۳/۳۳±۴/۴۴B |

\* مقادیر نشان‌دهنده میانگین±انحراف معیار حاصل از سه‌بار تکرار آزمایش هستند.



**شکل ۶)** تصویر پرگنه‌های رشد یافته باکتری و بیبریو در هیاتوپانکراس میگو در محیط TCBS: A: کنترل منفی، B: تیمار سرامیک‌های نقره‌اندود و C: کنترل مثبت

سرامیکی نقره‌اندود در سیستم پرورش پست‌لارو میگوی سفید غربی پرداخته شد.

در این پژوهش با تلاش در جهت افزایش بهره واکنش سعی شده است تا در حد ممکن روش به‌کاررفته به‌منظور تهیه سطوح پوشش‌داده‌شده با نانوذرات نقره به سمت ایده‌آل‌های مطرح در علم شیمی سوق یابد. بنابراین براساس نتایج گزارش‌شده و طی واکنش بین بستر سیلیکاتی و گروه‌های آمینی (آمینوسیلان) می‌توان واکنش‌های زیر را پیشنهاد کرد (شکل ۳):

سطوح فوم‌های سرامیک متخلخل پس از هیدرولیز در محلول پیرانا دارای میزان زیادی گروه‌های هیدروکسید می‌شود. زمانی که فوم‌های سرامیکی در محلول APTES غوطه‌ور می‌شود پس از چگالش گروه‌های آمینی روی سطوح سرامیک متخلخل، بین گروه‌های هیدروکسید مولکول‌های هیدرولیزشده APTES و هیدروکسید سطوح سرامیک متخلخل پیوند برقرار می‌شود، در نتیجه پلی از اکسیژن بین مولکول‌های APTES و سطوح سرامیکی تشکیل می‌شود و باندهای Si-O-Si را تشکیل می‌دهند. زمانی که این فوم‌های اصلاح‌شده در کلئید نانوذرات نقره غوطه‌ور می‌شود اتم‌های نقره در نانوذرات با گروه‌های  $\text{NH}_2$  موجود در سطوح سرامیک متصل می‌شوند و یک پیوند قوی کوئوردیناسیون بین زنجیره APTES و نانوذرات نقره تشکیل می‌شود، در نتیجه نانوذرات نقره به‌طور محکم روی سطوح فوم‌ها تثبیت می‌شوند [16, 29].

طبق نتایج به‌دست‌آمده از شمارش باکتری در آب در تیمارها طی زمان‌های مختلف مشخص شد که به‌علت عدم رشد باکتری در زمان‌های نمونه‌برداری آب، قبل و بعد از فیلتر، این فیلترها باکتری مذکور را در مدت زمان ۲ ساعت بعد از راه‌اندازی فیلترها به‌طور کامل از آب حذف نموده‌اند. این مطالعه نشان داد که این فیلترها می‌توانند به‌عنوان یک فیلتر مقرون‌به‌صرفه برای ضدعفونی آب مراکز تکتیر و پرورش میگو مورد استفاده قرار گیرند.

طبق یافته‌های بسیاری از پژوهشگران بسترهای فیلتری شاهد نتوانسته بودند که باکتری را به‌طور کامل از آب حذف کنند اما در تحقیق حاضر بسترهای فیلتری معمولی فاقد نانوذرات توانستند باکتری‌ها را به‌طور کامل از آب حذف نمایند (البته در یک دوره موقت کمتر از یک هفته). از جمله وی و همکاران در سال ۲۰۰۹ [16] نشان دادند که فیلترهای سرامیکی شاهد (فاقد نانوذرات) قادر به حذف باکتری از آب نبوده همچنین جین و پرادیپ [20] و فونگ‌فونگ و همکاران [30] نشان دادند که فیلترهای پلی‌اورتان فاقد نانوذرات نقره قادر به حذف باکتری از آب تیمار شده نیستند؛ بنابراین نتایج این بخش از پژوهش با نتایج محققان مذکور مغایرت داشت اما با نتایج حاصل از پژوهش /سمیت و /ویاندل [19] هم‌خوانی داشت. براساس تمام موارد مطرح‌شده در قسمت بالا می‌توان به این صورت استنباط کرد که بسترهای سرامیکی متخلخل معمولی فاقد نانوذرات نقره می‌توانند سد راه باکتری‌ها شوند اما قادر به کشتن آنها نیستند، بنابراین در محیط طبیعی نیاز به پاک‌سازی و احیاء کردن دارند. متأسفانه سطوح آلوده می‌توانند به‌عنوان مخزن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا عمل کنند و به‌طور بالقوه خطر عفونت را بالا می‌برند. میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به سطح فوم‌های سرامیکی متصل شوند و باعث تشکیل بیوفیلم‌هایی شوند که نسبت به رشد انفرادی سلول‌های باکتری در سوسپانسیون در برابر تیمارهای ضد میکروبی مقاومت بیشتری را نشان می‌دهند و به‌طور کلی حذف بیوفیلم به‌وسیله روش‌های معمولی که برای تیمار سلول‌های رشدیافته انفرادی در سوسپانسیون استفاده می‌شود، مشکل است و بنابراین

به‌منظور غلبه بر این زیان راه حل احتمالی پوشش‌دهی سطوح بسترهای فیلتر با نانوذرات نقره است [16].

با توجه به فلوربودن باکتری ویبریو هاروی در میگو، نتایج حاصل از کشت هیپاتوپانکراس و عضله میگوها در تیمارهای محتوی نانوذرات نقره در انتهای دوره آزمایش نشان داد که باکتری مذکور نتوانسته است بدن میگوهای سالم را تا حد کشنده و بیماری‌زایی آن آلوده کنند، به‌طوری که میزان رشد پرگنه‌ها مشابه کشت از میگوهای تیمار کنترل منفی بود (شکل ۶)؛ در حالی که در تیمار کنترل مثبت رشد پرگنه‌های باکتری ویبریو هاروی در کشت هیپاتوپانکراس و عضله میگوها، حاکی از آلوده‌شدن آنها با باکتری مذکور بود. در نتیجه استفاده از سرامیک‌های محتوی نانوذرات نقره در سیستم فیلتراسیون آب میگوها نتیجه خیلی بهتری نسبت به گروه شاهد (کنترل مثبت) داشته است.

از سوی دیگر با توجه به نتایج حاصل از کدورت داخل لوله‌های حاوی سه فیلتر مدیا و کشت آنها روی محیط اختصاصی ویبریو، مشاهده شد که در تیمار فیلترهای نقره‌اندود باکتری‌ها در مقایسه با دوگروه کنترل منفی و کنترل مثبت به‌طور کامل حذف شده است به‌طوری که در گروه‌های کنترل، باکتری‌ها روی فیلترها تشکیل بیوفیلم را داده بودند که رشد پرگنه‌ها روی محیط‌های کشت اختصاصی ویبریو تاییدکننده این بیانات بود؛ در نتیجه فیلترهای شاهد به‌عنوان یک مخزن باکتری‌های بیماری‌زا عمل می‌کنند که بعد از پرشدن ظرفیت‌شان با باکتری‌ها شروع به ره‌ایش کلونی‌های باکتریایی به داخل آب می‌کنند (شکل ۵).

در انجام این پروژه تحقیقاتی، محدودیتی خاصی که مانع از انجام مطالعه شود، مشاهده نشد. مطالعه حاضر پایه و گام نخست در ارزیابی عملکرد سیستم‌های فیلتراسیون مبتنی بر نانوذرات بود. بدین‌منظور پیشنهاد می‌شود، به‌منظور بهبود عملکرد احتمالی از فیلترهای پوشش‌دهی‌شده با نانوفلزات ارزان‌قیمت و سبز موضوع مطالعات بیشتر قرار گیرد.

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه موید آن است که استفاده از بسترهای فیلتر سرامیکی حاوی نانوذرات نقره در فیلترهای تصفیه آب پرورش میگوی سفید غربی می‌تواند منجر به کاهش معنی‌دار باکتری ویبریو هاروی در آب و جلوگیری از بروز بیماری در پست‌لاروهای میگوی سفید غربی شود. این مساله می‌تواند در آینده زمینه‌ساز پژوهش‌های گسترده‌تر به‌منظور بررسی این مکانیزم در پاک‌سازی سطوح و فضاهای آبی‌پروری و پوشش‌هایی که احتمال آلودگی در آن می‌رود، شود تا در نهایت بتوان فناوری جدید و قابل توسعه‌ای تحت شرایط بهینه و بدون وجود مشکلات ناشی از کاربرد مستقیم نانوذرات و بدون تولید محصولات جانبی ناشی از گندزدهای متداول در حذف آلاینده‌های میکروبی آب تولید کرد.

**تشکر و قدردانی:** نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی پژوهشکده میگوی کشور جناب آقای دکتر بابک قائدنی و مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس دانشگاه خلیج فارس بوشهر به خاطر حمایت‌های مالی از این طرح و فراهم‌نمودن امکانات لازم و همچنین جناب آقای مهندس عباس جمالی و سرکار خانم دکتر معصومه باوادی که در انجام این طرح ما را یاری فرمودند، سپاسگزاری می‌نمایند.

**تاییدیه اخلاقی:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

Musavi HA, Atee M, Dastmalchi F, et al. The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas hydrophila*. *Int J Vet Res*. 2009;3(2):137-42.

15- Mei F. Coating of silver film onto the inner pore surfaces of the reticulated alumina by an electroless plating method [Dissertation]. Cincinnati: University of Cincinnati; 2000. p. 94.

16- Lv Y, Liu H, Wang Z, Liu Sh, Hao L, Sang Y, et al. Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment. *J Membr Sci*. 2009;331(1-2):50-6.

17- Chaudhuri M, Verma SR, Gupta A. Performance evaluation of ceramic filter candles. *J Environ Eng*. 1994;120(6):1646-51.

18- Clasen TF, Brown J, Collin S, Suntura O, Cairncross S. Reducing diarrhea through the use of household-based ceramic water filters: A randomized, controlled trial in rural Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;70(6):651-7.

19- Oyanedel-Craver VA, Smith JA. Sustainable colloidal-silver-impregnated ceramic filter for point-of-use water treatment. *Environ Sci Technol*. 2007;42(3):927-33.

20- Jain P, Pradeep T. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnol Bioeng*. 2005;90(1):59-63.

21- Ghahremani M, Kalbassi MR, Soltani M, Johari SA. Application of granule and filament silver zeolite (zeomic) in water filtration system for infection control of *Streptococcus iniae* in fry rainbow trout. *Iran Vet J*. 2013;8(4):83-93. [Persian]

22- Heidarpour F, Ghani WAWAK, Fakhru'l-razi A, Sobri S. New trends on microbiological water treatment. *Dig J Nanomater Biostruct*. 2011;6(2):791-802.

23- Mpenyana-Monyatsi L, Mthombeni NH, Onyango MS, Momba MNB. Cost-effective filter materials coated with silver nanoparticles for the removal of pathogenic bacteria in groundwater. *Int J Environ Res Public Health*. 2012;9(1):244-71.

24- Asghari S, Johari SA, Lee JH, Kim YS, Jeon YB, Choi HJ, et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *J Nanobiotechnol*. 2012;10:14.

25- Johari SA, Kalbassi MR, Soltani M, Yu IJ. Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iran J Fish Sci*. 2013;12(1):76-95.

26- Rahman Nia J, Inventor. Preparation of colloidal nanosilver. United States patent US 7892317B2. 2011 February 22.

27- Mirbakhsh M, Afsharnasab M, Khanafari A, Razavi MR. Molecular identification of *Vibrio harveyi* from larval stage of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Boone (Crustacea: Decapoda) by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Iran J Fish Sci*. 2014;13(2):384-93.

28- Lv Y, Liu H, Wang Z, Hao L, Liu J, Wang Y, et al. Antibiotic glass slide coated with silver nanoparticles and its antimicrobial capabilities. *Polym Adv Technol*. 2008;19(11):1455-60.

29- Chen L, Zheng L, Lv Y, Liu H, Wang G, Ren N, et al. Chemical assembly of silver nanoparticles on stainless steel for antimicrobial applications. *Surf Coat Technol*. 2010;204(23):3871-5.

30- Phoung Phong NT, Thanh NVK, Phuong PH. Fabrication of antibacterial water filters by coating silver nanoparticles on flexible polyurethane foam. *J Phys Conf Ser*. 2009;187(1):012079.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می دارند هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** فاطمه حسین‌پور دلاور (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۰٪)؛ محمود نفیسی‌بهبادی (نویسنده دوم)، روش‌شناس (۲۵٪)؛ مریم میربخش (نویسنده سوم)، روش‌شناس (۲۵٪)؛ خدابخش نیکنام (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ سیدعلی جوهری (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ عصمت محمدی‌باغملایی (نویسنده ششم)، پژوهشگر کمکی (۵٪)

**منابع مالی:** مطالعه حاضر تحت حمایت مالی گرنت دانشجویی و پژوهشکده میگوی ایران بوده است.

## منابع

- 1- Nash G, Charetana N, Cholada T, Anutra A, Phusit P, Pongcham R. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand. *Asian Fish Soc*. 1992;10:143-5.
- 2- Chrisolite B, Thiyagarajan S, Alavandi SV, Abhilash EC, Kalaimani N, Vijayan KK, et al. Distribution of luminescent *Vibrio harveyi* and their bacteriophages in a commercial shrimp hatchery in south India. *Aquaculture*. 2008;275(1-4):13-9.
- 3- Austin B. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):310-7.
- 4- Baticados MCL, Lavilla-Pitogo CR, Cruz-Lacierda ER, De La Pena LD, Sunaz NA. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis Aquat Org*. 1990;9(2):133-9.
- 5- Mortezaei SNS, Kor NM, Tamjidi B, Jahanshahi AA. Bacterial contamination in shrimp farms in Abadan area. *Pajouhesh Va Sazandegi*. 2008;20(2):160-5. [Persian]
- 6- Guzman GA, Ascencio F. Infectious disease in shrimp species with aquaculture Potential. *Recent Res Dev in Microbiol*. 2000;4:333-48.
- 7- Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*. 1998;167(3-4):301-13.
- 8- Abraham TJ, Manley R, Palaniappan R, Dhevendaran K. Pathogenicity and antibiotic sensitivity of luminous *Vibrio harveyi* isolated from diseased penaeid shrimp. *J Aquac Trop*. 1997;1:1-8.
- 9- Ashraf M, Aklakur M, Sharma R, Ahmad Sh, Khan M. Nanotechnology as a novel tool in fisheries and aquaculture development: A review. *Iran J Energy Environ*. 2011;2(3):258-61.
- 10- Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol*. 2010;28(11):580-8.
- 11- Dabbagh MA, Moghimipour E, Ameri A, Sayfoddin N. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of nanosilver containing hydrogels. *Iran J Pharm Res*. 2007;7(1):21-8.
- 12- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*. 2007;3(1):95-101.
- 13- Soltani M, Esfandiary M, Sajadi MM, Khazraeenia S, Bamonar AR, Ahari H. Effect of nanosilver particles on hatchability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg and survival of the produced larvae. *Iran J Fish Sci*. 2011;10(1):167-78.
- 14- Soltani M, Ghodrathnema M, Ahari H, Ebrahimzadeh