



The efficacy of silver nanoparticles and oxytetracycline in treating *Aeromonas hydrophila* bacterial infection in common carp (*Cyprinus carpio*)

Pegah Farhang¹ | Amirreza Abed-Elmdoust^{2✉} | Alireza Mirvaghefi³

1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: pegah.farhang@ut.ac.ir

2. Corresponding Author, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: amirabed@ut.ac.ir

3. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: avaghefi@ut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received 28 August 2024

Received in revised form 05 November 2024

Accepted 29 November 2024

Published online 01 July 2025

Keywords:

Blood cells,

General health,

Hemoglobin,

Nanomedicine,

Survival.

ABSTRACT

One of the most common pathogenic bacteria is *Aeromonas hydrophila*, which causes various infections with bleeding in farmed fish. The general solution is to use different antibiotics to deal with this bacterium. On the other hand, nanoparticle technology based on antibacterial properties is considered a useful alternative to antibiotics. Therefore, in this study, the effectiveness of 20% oxytetracycline antibiotic and silver nanoparticles with a size of 20-60 nm in curing the disease caused by *A. hydrophila* bacteria in common carp fish has been considered. For this purpose, 5 treatments were considered: negative control, positive control, patient with oxytetracycline treatment, patient with silver nanoparticle treatment, and patient with combined treatment of oxytetracycline and silver nanoparticle. The consumption amount of oxytetracycline and silver nanoparticles was estimated as 0.36 g and 0.0012 mg, respectively. According to the results, the amount of white blood cells in the positive control group was the highest (20.18 ± 0.76) and different from other treatments ($P=0.00$, $F=122.95$). Also, the number of red blood cells ($P=0.00$, $F=18.38$) and hemoglobin ($P=0.01$, $F=12.43$) in the negative control group was the highest ($Hb=8.40 \pm 0.79$ and $RBC=2.40 \pm 0.11$), and in the positive control group had the lowest value ($Hb=5.27 \pm 0.60$ and $RBC=1.38 \pm 0.26$). The lowest and highest survival percentage was observed in the negative control group (99.00 ± 1.00) and the positive control group (21.33 ± 2.52), respectively. There is a correlation between red blood cell increase, hemoglobin increase, white blood cell decrease, and increased survival. In general, silver nanoparticles and oxytetracycline play an effective role in reducing infectious symptoms and inhibiting bacteria. The simultaneous use of oxytetracycline and nanosilver seems appropriate if it is under-documented and management planning, to reduce treatment costs and environmental risks.

Cite this article: Farhang, P., Abed-Elmdoust, A., & Mirvaghefi, A. (2025). The efficacy of silver nanoparticles and oxytetracycline in treating *Aeromonas hydrophila* bacterial infection in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Natural Environment*, 78 (Monitoring and Management of Natural Environmental Pollutants), 75-85. DOI: <http://doi.org/10.22059/jne.2024.381255.2705>



اثربخشی نانوذره نقره و اکسی تتراسایکلین در درمان آلودگی باکتریایی *Aeromonas hydrophila* در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

پگاه فرهنگ^۱ | امیررضا عابد علم دوست^۲ | علیرضا میرواقفی^۳

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشکدهگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: pegah.farhang@ut.ac.ir
۲. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشکدهگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: amirabed@ut.ac.ir
۳. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشکدهگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: avaghefi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	از متداول ترین باکتری های بیماری زا <i>Aeromonas hydrophila</i> است که باعث ایجاد انواع عفونت همراه با خونریزی در ماهیان پرورشی می گردد. راهکار عمومی، استفاده از انواع آنتی بیوتیک برای مقابله با این باکتری است. از طرفی، استفاده از فناوری نانوذرات با تکیه بر خواص آنتی باکتریایی، به عنوان راهکاری مفید و جایگزین آنتی بیوتیک ها مطرح است. بنابراین در این مطالعه کارایی آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین ۲۰٪ و نانوذره نقره با اندازه ۶۰-۲۰ نانومتر در رفع بیماری حاصل از باکتری <i>آئروموناس هیدروفیلا</i> در ماهی کپور معمولی مد نظر قرار گرفته است. برای این منظور ۵ تیمار شامل گروه های شاهد منفی، شاهد مثبت، بیمار با درمان اکسی تتراسایکلین، بیمار با درمان نانوذره نقره و بیمار با درمان ترکیبی اکسی تتراسایکلین و نانوذره نقره در نظر گرفته شد. مقدار مصرفی اکسی تتراسایکلین و نانوذره نقره به ترتیب معادل ۰/۳۶ گرم و ۰/۰۱۲ میلی گرم برآورد شد. براساس نتایج به دست آمده میزان گلبول سفید در گروه کنترل مثبت در بیشترین مقدار (۲۰/۱۸±۰/۷۶) بوده و با دیگر تیمارها اختلاف (P=۰/۰۰، F=۱۲۲/۹۵) دارد. همچنین میزان گلبول قرمز (P=۰/۰۰، F=۱۸/۳۸) و هموگلوبین (F=۱۲/۴۳، P=۰/۰۰) در گروه کنترل منفی در بیشترین مقدار (Hb=۸/۴۰±۰/۷۹ و RBC=۲/۴۰±۰/۱۱) و در گروه کنترل مثبت در کمترین مقدار (Hb=۵/۲۷±۰/۶۰ و RBC=۱/۳۸±۰/۲۶) بوده است. میزان درصد بقا در کمترین و بیشترین مقدار به ترتیب در گروه کنترل منفی (۹۹/۰۰±۱/۰۰) و گروه کنترل مثبت (۲۱/۳۳±۲/۵۲) مشاهده شد. بین افزایش گلبول قرمز، افزایش هموگلوبین، کاهش گلبول سفید و افزایش بقا همبستگی وجود دارد. به طور کلی نانوذره نقره و اکسی تتراسایکلین در کاهش علائم عفونی و مهارکنندگی باکتری نقش مؤثری دارند. استفاده همزمان از اکسی تتراسایکلین و نانوذره نقره در صورتی که با برنامه ریزی مدون و مدیریتی، به منظور کاهش هزینه های درمان و خطرات محیط زیستی باشد، مناسب به نظر می رسد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۰۷	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۸/۱۵	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۰۹	
تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۴/۱۰	
کلیدواژه ها: بقا، سلامت عمومی، سلول های خونی، نانودارو، هموگلوبین.	

استناد: فرهنگ، پگاه؛ عابد علم دوست، امیررضا؛ میرواقفی، علیرضا (۱۴۰۴). اثربخشی نانوذره نقره و اکسی تتراسایکلین در درمان آلودگی باکتریایی *Aeromonas hydrophila* در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *محیط زیست طبیعی*، ۷۷ (ویژه نامه پایش و مدیریت آلاینده های محیط زیست طبیعی)، ۸۵-۷۵.

DOI: <http://doi.org/10.22059/jne.2024.381255.2705>



© نویسنده گان

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

عوامل بیماری‌زای مختلف باکتریایی موجب مرگ‌ومیر جمعی در آبزیان می‌شوند و تهدید بزرگی برای توسعه آبزی‌پروری به‌شمار می‌آیند (Abdelsalam et al., 2009; Eissa et al., 2015; Ei-Jakee et al., 2020). یکی از متداول‌ترین این عوامل *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) است که با ترشح آنزیم‌های پروتئولیتیک، همولایزین و انتروتوکسین، انواع عفونت همراه با خونریزی خصوصاً در بافت‌های زیر شکم، اطراف دهان و اطراف مخرج و همچنین پوسیدگی دم و باله‌ها را در ماهیان آب شور و شیرین ایجاد می‌کند و خسارت چشمگیری برای پرورش‌دهندگان ایجاد می‌کند (Ahmadi et al., 2011). خطر مرگ‌ومیر گروهی ماهیان باعث شده است که پرورش‌دهندگان آبزیان از ترکیبات شیمیایی آنتی‌بیوتیکی سینتتیک استفاده کنند. با این حال استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است آثار مضر بر سلامت انسان داشته باشد و باعث ایجاد آلودگی شدید در بوم‌سازگان‌هایی آبی شود (Schmidt et al., 2000; Mahmoud et al., 2016). در میان مسائلی مانند استفاده نادرست یا بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها، محدودیت‌های مصرف اشکال آنتی‌بیوتیکی معمول (مانند حلالیت و فراهمی زیستی ضعیف آنتی‌بیوتیک‌های آب‌گریز، نیمه‌عمر و زمان‌های گردش خون سیستمیک کوتاه و احتمال بسیار کم قرارگرفتن در معرض بافت‌های سالم به‌دلیل عدم انتخاب‌پذیری و هدف‌پذیری و جذب کم سلولی) وجود دارد. در نتیجه، آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد استفاده دارای غلظت‌های ناکافی در محل‌های عفونت هستند که نیاز به افزایش دوز آنتی‌بیوتیک و دفعات تجویز دارند و این امر با عوارض جانبی بیشتر، همراه است (Cho et al., 2008; Teillant et al., 2015; Baptista et al., 2018). آنتی‌بیوتیک‌ها به‌صورت پیشگیرانه، درمانی یا متافیلاکتیک در آبزی‌پروری استفاده می‌شوند (Lozano et al., 2017; Patel et al., 2019; Lulijwa et al., 2020; Okoye et al., 2022). از آنجاکه آنتی‌بیوتیک‌های موجود در برابر گونه‌های خاص باکتریایی کم‌اثر یا بی‌اثر شده‌اند، درمان چندین عفونت باکتریایی بسیار سخت و به یکی از چالش‌های اساسی در آبزی‌پروری تبدیل شده است.

با ظهور نانوذرات و معرفی آنها در صنایع مختلف، رویکردی جدید در درمان عفونت‌های باکتریایی ایجاد شده است (Huh and Kwon, 2011; Sharma et al., 2012; Gao et al., 2018). نانوذرات می‌توانند به‌طور مؤثر به سطح باکتری متصل شده و دیواره سلولی آنها را پاره کنند و از این طریق در مرگ سلولی باکتری‌ها مؤثر باشند (Wang et al., 2017). همچنین مشاهده شده است که نانوذراتی با اندازه کمتر از ۲۰ نانومتر می‌توانند به دیواره سلول باکتری نفوذ نمایند و به نوبه خود از طریق تخریب اندامک‌های سلول که در نهایت منجر به مرگ باکتری‌ها می‌شود، مسیرهای بیوشیمیایی را با مشکل روبه‌رو کنند (Arakha et al., 2015). در مطالعات بسیاری کارایی نانوذرات در مقابله با باکتری‌هایی مانند *شریشیاکلی* (Jayaseelan et al., 2012; Bowman et al., 2012; Lima et al., 2013)، *استرپتوکوکوس اینیا*، *فوتوباکتریوم دامسلا* (Cheng et al., 2011)، *آئروموناس هیدروفیلا*

(Jayaseelan et al., 2012; Swain et al., 2014; Shaalan et al., 2020; Kakakhel et al., 2021; Giri et al., 2022; Salah et al., 2023)، *فلاووباکتریوم برانشیوفیلوم* (Swain et al., 2014) و *سودوموناس آئروژیناس* (Jayaseelan et al., 2012) در ماهیانی چون کپور معمولی (Welz et al., 2018; Kondera et al., 2020; Shaalan et al., 2020)، کپور هندی (Kakakhel et al., 2021; Antony et al., 2013; Reddy 2013)، گورخر ماهی (Bowman et al., 2012)، و قزل‌آلا (Avsever et al., 2019) تأیید شده است.

کپورماهیان به‌عنوان یکی از گونه‌های پرطرفدار در سراسر جهان شناخته می‌شود. کپور معمولی یک گزینه مناسب برای آبزی‌پروری تجاری در آسیا و برخی از کشورهای اروپایی در نظر گرفته می‌شود زیرا این گونه قابلیت سازگاری بسیار بالایی با محیط و غذا دارد (Rahman, 2015). در برخی از کشورهای اروپایی، بیش از ۸۰ درصد از کل تولید ماهی از ماهی کپور معمولی حاصل می‌شود (Anton-Pardo et al., 2014).

با توجه به اینکه امروزه مبحث استفاده ترکیبی از آنتی‌بیوتیک‌ها و نانوذرات، به‌منظور افزایش بهره‌وری، مطرح است، در این تحقیق استفاده همزمان اکسی‌تتراسایکلین به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک پرمصرف در آبزی‌پروری و نانوذره نقره به‌عنوان یک نانوذره کارآمد با تأثیر بالقوه ضد عفونی‌کننده در مقابل طیف بسیار وسیعی از باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها (FAO, 2010)، در تیمار و بهبود کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مبتلا به *آئروموناس هیدروفیلا* بررسی شده است.

روش شناسی پژوهش

مکان و زمان: این پژوهش در آزمایشگاه و کارگاه بهداشت و بیماری های آبزیان گروه شیلات، دانشکده گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در استان البرز انجام شد. فرایندهای آزمایشی از ۲۲ خرداد ماه ۱۴۰۲ لغایت ۱۴ مرداد ماه ۱۴۰۲ صورت گرفت. تیمارها هر کدام در سه تکرار طی ۵ روز مورد مطالعه قرار گرفتند.

آماده سازی ماهیان: تعداد ۴۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* با میانگین وزنی $3/12 \pm 0/89$ گرم از مجموعه آبی پروری البرز ایران واقع در هشتگرد، خریداری شد. ماهیان به منظور سازگاری ۱۵ روزه، به کارگاه بهداشت و بیماری های آبزیان منتقل شدند. تعداد ۱۵ مخزن با شرایط بهداشتی و هوادهی مناسب، به منظور انجام آزمایش ها در نظر گرفتن ۵ تیمار (جدول ۱) و ۳ تکرار، آماده سازی شد. به هر مخزن، ۲۰ عدد ماهی وارد و ۲۰٪ حجم آب مخازن در طول دوره آزمایش تعویض شد. به میزان ۲٪ وزن بدن غذادهی روزانه صورت گرفت (Wang et al., 2015) که برای هر مخزن میزان غذادهی معادل ۱/۲ گرم برآورد شد. در طول دوره آزمایش، هر روز ۲۰٪ از آب مخازن سیفون شده و از مخزن های ذخیره آب که به منظور کلر زایی ۴۸ ساعت زودتر آبیگری شده بودند، دوباره آبیگری شدند.

جدول ۱- تیمارهای در نظر گرفته شده برای انجام آزمایش

تیمار	عنوان تیمار	شرح تیمار
۱	گروه شاهد منفی (C.N)	عدم قرارگیری تحت هیچ تیماری
۲	گروه شاهد مثبت (C.P)	قرارگیری در معرض باکتری <i>Aeromonas hydrophila</i>
۳	گروه بیمار + اکسی تتراسایکلین (۰/۳۶ گرم) (CP.OX)	قرارگیری در معرض باکتری <i>Aeromonas hydrophila</i> و تیمار شده با آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین
۴	گروه بیمار + نانوذرات نقره (۰/۰۱۲ میلی گرم) (CP.AG)	قرارگیری در معرض باکتری <i>Aeromonas hydrophila</i> و تیمار شده با نانوذره نقره
۵	گروه بیمار + اکسی تتراسایکلین (۰/۳۶ گرم) + نانوذرات نقره (۰/۰۱۲ میلی گرم) (CP.OX.AG)	قرارگیری در معرض باکتری <i>Aeromonas hydrophila</i> و تیمار شده با آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین و نانوذره نقره

تهیه و مصرف آنتی بیوتیک و نانوذره: آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین ۲۰٪ ساخت شرکت رویان دارو، خریداری شد. با توجه به این که به ۲۰۰ میلی گرم آنتی بیوتیک به ازای هر کیلو وزن بدن نیاز بود، ۰/۳۶ گرم آنتی بیوتیک به صورت روزانه روی غذا اسپری شد.

پودر نانوذره نقره از شرکت مهندسی پایدار ابتکار آرمینانو (ARMINANO) خریداری شد. شماره سی ای اس^۱ این محصول ۷۴۴۰-۲۲ و اندازه ذرات آن ۲۰ تا ۶۰ نانومتر برآورد شد. میزان نانوذره روزانه تجویز شده در غذای ۶ مخزن نانوذره دار، برابر با ۰/۰۱۲ میلی گرم برآورد شد. نانوذره نیز در مقدار مشخصی آب محلول و سپس روی غذا اسپری شد (Elgendy et al., 2022).

تهیه باکتری *Aeromonas hydrophila* و بیماری زایی: سوش میکروبی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* به شماره ۱۳۲ به صورت رشد یافته روی محیط مغذی تریپتون سویا آگار (TSA)، از مؤسسه تحقیقاتی و سرم سازی رازی تهیه و در شرایط استاندارد به آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل شد (Joseph and Camahan, 1994). حجم باکتریایی در محیط کشت تریپتون سویا برات (TSB) در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت گردید و برات حاصل نیز پس از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و ذخیره باکتریایی لازم پس از دو بار شستشو با محلول بافر فسفات نمکی (PS) با pH ۷/۲ تهیه گردید. ماهی ها با روش تماس مستقیم با باکتری ها آلوده شدند. بدین صورت که پس از به دست آوردن غلظت 10^{11} ، به میزان ۳۲۰ میکرولیتر از محلول باکتری به ۳۲ لیتر آب ماهی انتقال یافت و ماهیان به مدت ۳۰ دقیقه در آب حاوی باکتری، حمام داده شدند (Akhlaghi, 2000). پس از سپری شدن ۲۴ ساعت از در معرض باکتری قرار گرفتن ماهیان، برای اینکه در پژوهش حاضر این اطمینان حاصل شود که بیماری زایی ناشی از باکتری *آئروموناس* بوده است، از نظر تلفات و ضایعات

¹CAS No

خونریزی‌دهنده روی پوست و علائم بالینی ناشی از آترومونازیس تحت نظر گرفته قرار گرفتند و قسمتی از کلیه ماهیانی که علامت دادند، برای انجام تست مولکولی PCR جدا شد (Zargari et al., 2018, Ragasa et al., 2019). با مشاهده این علائم اقدامات لازم برای شروع درمان از طریق آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین و نانوذره نقره و ترکیب هر دو انجام پذیرفت. **شاخص‌های کیفی آب:** در طول پژوهش، با استفاده از پیراسنج آب مدل Hanna HI9811-5، خصوصیات فیزیکی آب اندازه‌گیری شد (جدول ۲).

جدول ۲- شاخص‌های کیفی آب اندازه‌گیری شده در پژوهش حاضر				
شاخص	دما	pH	نیترات	سختی
مقادیر	۲۶/۴۹	۸/۹	۴/۳	۳۴۴/۲۵

ارزیابی ماهیان در پایان آزمایش: در پایان دوره آزمایش در هر تیمار از ماهیان بازمانده خونگیری صورت گرفت. شمارش سلول‌های قرمز (RBC) و سفید (WBC) خون به روش هموسیتومتری انجام و همچنین میزان هموگلوبین و تلفات و مرگ‌ومیر ثبت شد. به‌منظور شمارش گلبول‌های سفید، نمونه‌های خون با غلظت ۱:۵۰ توسط محلول داسیز^۲ رقیق شد و سپس توسط لام نتوبار و میکروسکوپ مورد شمارش قرار گرفت. تعداد گلبول‌های سفید در واحد میلی‌متر مکعب طبق رابطه زیر محاسبه گردید: تعداد WBC موجود در mm^3 = تعداد سلول‌های شمارش شده در $1/\text{mm}^3 \times 10$ (منطقه مورد شمارش) $\times 50$ (رقت محلول) گلبول‌های قرمز خون نیز پس از رقیق‌سازی خون با غلظت ۱:۵۰ و با استفاده از محلول هایم^۳، توسط لام نتوبار و میکروسکوپ، مورد شمارش قرار گرفت. سپس تعداد گلبول‌های قرمز در واحد میلی‌متر مکعب طبق رابطه زیر محاسبه گردید: تعداد RBC موجود در mm^3 = تعداد سلول‌های شمارش شده در $2/\text{mm}^3 \times 50$ (منطقه مورد شمارش) $\times 50$ (رقت محلول) همچنین برای سنجش سطح هموگلوبین نیز نمونه‌های خون با محلول درابکین^۴ مخلوط و سپس در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه، انکوبه شد. سپس میزان جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد.

تجزیه و تحلیل آماری: طرح آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار اجرا شد. داده‌های کمی با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) در نرم‌افزار SPSS v. 21 تجزیه و تحلیل شدند (در صورت نیاز از تبدیل داده‌ها برای نرمال شدن داده‌ها استفاده شد) برای بررسی تفاوت‌های معنی‌دار بین میانگین‌های تیمارها، از آزمون‌های توکی در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید. همچنین برای تعیین اختلاف معنی‌دار در داده درصدی از آزمون کروسکال-والیس استفاده شد. همبستگی بین متغیرها توسط آزمون correlations تعیین شد. تمامی داده‌ها و نمودارهای لازم با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ پردازش و ترسیم شدند.

یافته‌های پژوهش

گلبول‌های سفید (WBC): در تحقیق حاضر نیز همان‌طور در شکل ۱ مشاهده می‌شود، میزان گلبول سفید در گروه کنترل مثبت (بیمار بدون تیمار) در بیشترین مقدار ($20/18 \pm 0/76$) قرار دارد، به‌طوری که تعداد گلبول‌های سفید در این گروه با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌دار دارد ($P=0/00$, $F=122/95$) در تمامی تیمارهای دارویی تعداد گلبول‌های سفید به‌حالت اولیه و سالم ماهی بازگشت داشته است که نشان‌دهنده کاهش آثار سوء باکتری بر سیستم ایمنی ماهی بوده است. در این تحقیق اثر هم‌افزایی و افزایش قدرت ضد باکتریایی ترکیب اکسی‌تتراسایکلین و نانوقره به‌صورت معنی‌دار مشاهده نشده و برتری نسبت به تیمار اکسی‌تتراسایکلین و تیمار نانوقره به‌تنهایی نداشته است.

گلبول‌های قرمز (RBC): در این تحقیق میزان گلبول قرمز در گروه کنترل منفی (ماهیان سالم) در بیشترین مقدار ($2/40 \pm 0/11$) و کم‌ترین مقدار ($1/38 \pm 0/26$) در گروه کنترل مثبت (ماهیان بیمار بدون تیمار) ثبت شد که نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار عفونت باکتریایی بر گلبول‌های قرمز است ($P=0/00$, $F=18/38$). در این آزمایش اثر هم‌افزایی و افزایش قدرت ضدباکتریایی در ترکیب

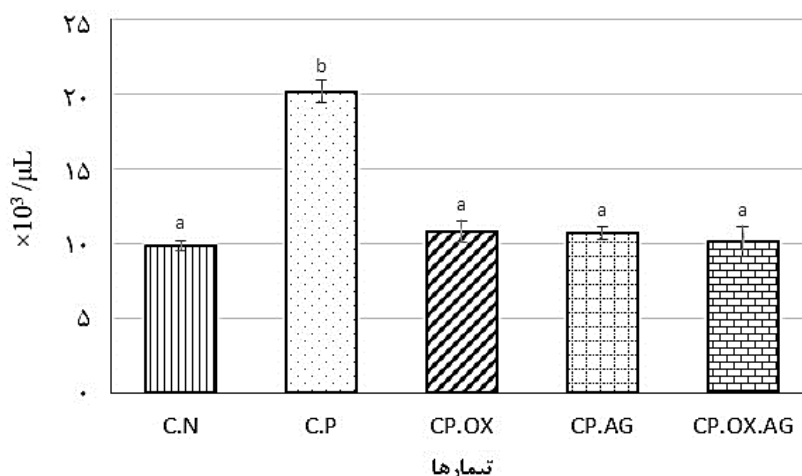
^۲Dacies

^۳Hayem

^۴Drabkin

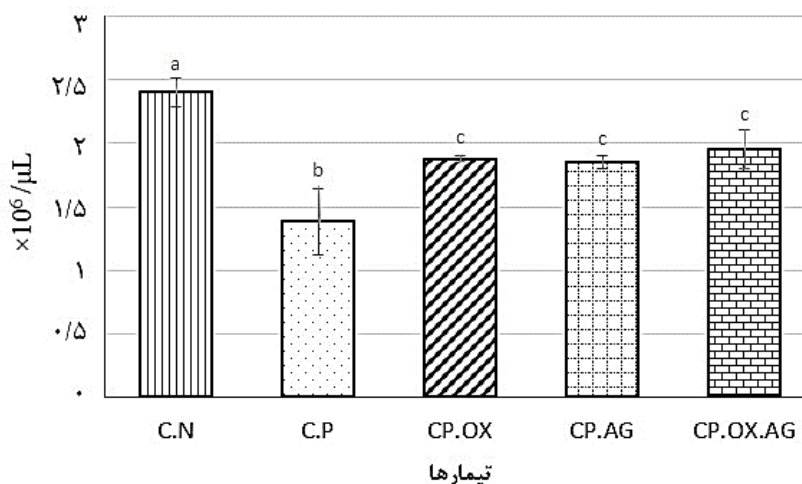
اکسی تتراسایکلین و نانوقره به صورت معنی دار مشاهده نشده و برتری نسبت به تیمار اکسی تتراسایکلین و تیمار نانوقره به تنهایی نداشته است. در تمامی موارد تعداد گلبول قرمز حالت برگشتی به سمت حالت سالم را نشان می دهد (شکل ۲).

گلبول های سفید



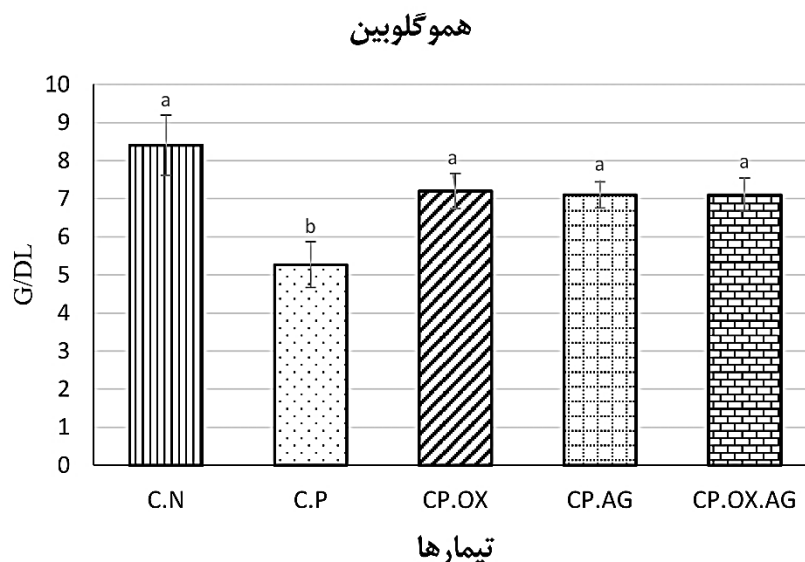
شکل ۱- تعداد گلبول های سفید در تیمارهای مختلف ماهی کپور معمولی (CN: کنترل منفی، CP: کنترل مثبت، CP.OX: ماهی بیمار تحت درمان اکسی تتراسایکلین، CP.AG: ماهی بیمار تحت درمان نانوقره و CP.OX.AG: ماهی بیمار تحت درمان همزمان اکسی تتراسایکلین و نانوقره)

گلبول های قرمز



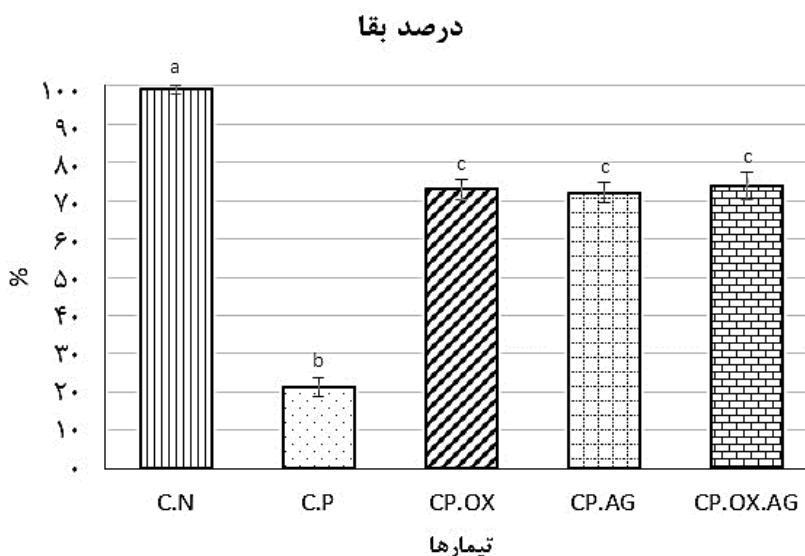
شکل ۲- تعداد گلبول های قرمز در تیمارهای مختلف ماهی کپور معمولی (CN: کنترل منفی، CP: کنترل مثبت، CP.OX: ماهی بیمار تحت درمان اکسی تتراسایکلین، CP.AG: ماهی بیمار تحت درمان نانوقره و CP.OX.AG: ماهی بیمار تحت درمان همزمان اکسی تتراسایکلین و نانوقره)

هموگلوبین (Hb): همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود، میزان هموگلوبین در گروه کنترل منفی (ماهیان سالم) در بیشترین مقدار ($8/40 \pm 0/79$) و گروه کنترل مثبت (ماهیان بیمار بدون تیمار) در کمترین مقدار ($5/27 \pm 0/60$) قرار دارد. در این آزمایش اختلاف بین کل تیمارها معنی دار بوده ($P=0/01$, $F=12/43$) اما در بین تیمارهای دارویی اکسی تتراسایکلین، نانوقره و ترکیب اکسی تتراسایکلین و نانوقره، اختلاف معنی داری مشاهده نمی شود و برتری نسبت به هم ندارند؛ به طور کلی در هر سه تیمار بازگشت به شرایط بهبود قابل مشاهده است.



شکل ۳- تعداد هموگلوبین در تیمارهای مختلف ماهی کپور معمولی (CN: کنترل منفی، CP: کنترل مثبت، CP.OX: ماهی بیمار تحت درمان اکسی تتراسایکلین، CP.AG: ماهی بیمار تحت درمان نانونقره و CP.OX.AG: ماهی بیمار تحت درمان همزمان اکسی تتراسایکلین و نانونقره)

بقا: براساس نتایج به دست آمده، میزان درصد بقا در کمترین و بیشترین مقدار به ترتیب در گروه کنترل منفی ($99/00 \pm 1/00$) و گروه کنترل مثبت ($21/33 \pm 2/52$) مشاهده می شود (شکل ۴). اختلاف بین کل تیمارها معنی دار بوده اما در بین تیمارهای دارویی اکسی تتراسایکلین، نانونقره و اکسی تتراسایکلین با نانونقره، اختلاف معنی داری مشاهده نمی شود.



شکل ۴- درصد بقا در تیمارهای مختلف ماهی کپور معمولی (CN: کنترل منفی، CP: کنترل مثبت، CP.OX: ماهی بیمار تحت درمان اکسی تتراسایکلین، CP.AG: ماهی بیمار تحت درمان نانونقره و CP.OX.AG: ماهی بیمار تحت درمان همزمان اکسی تتراسایکلین و نانونقره)

همبستگی فاکتورها: ارتباط بین افزایش بقا و کاهش تعداد گلبول سفید ($\text{Pearson Correlation} = -0/93, P = 0/00$)، افزایش گلبول قرمز ($\text{Pearson Correlation} = 0/92, P = 0/00$) و افزایش هموگلوبین ($\text{Pearson Correlation} = 0/91, P = 0/00$)، معنی دار بوده است. همچنین ارتباط بین افزایش گلبول سفید با کاهش گلبول قرمز ($\text{Pearson Correlation} = -0/80, P = 0/00$) و کاهش هموگلوبین ($\text{Pearson Correlation} = -0/85, P = 0/00$) نیز معنی دار بود. آنچنان که میزان گلبول قرمز و هموگلوبین نیز رابطه معنی دار مثبت ($\text{Pearson Correlation} = 0/87, P = 0/00$) را نشان می دهد.

بحث و نتیجه گیری

آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین با هدف متوقف کردن سنتز پروتئین های باکتری، به زیر واحد 30S در جایگاه A ریبوزوم باکتری *اُتروموناس هیدروفیلا* متصل شده و از این طریق مانع انتقال اسیدهای آمینه فعال به ریبوزوم می شود. در فرآیند تولید پروتئین ها، اتصال tRNA باکتری به جایگاه A ریبوزوم ضروری است. بنابراین، با مصرف آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین و اشغال جایگاه A ریبوزوم توسط این آنتی بیوتیک، فضای لازم برای اتصال آمینواسیل tRNA به ریبوزوم از بین می رود. تحقیقات نشان داده اند که نانوذرات نقره نیز می توانند از طریق مکانیسم های مختلفی علیه باکتری ها عمل کنند و برخلاف آنتی بیوتیک ها، از بروز مقاومت در باکتری ها جلوگیری نمایند (Knetsch and Koole, 2011). به این معنا که نانوذرات امکان آزادسازی یون های Ag^+ را فراهم می کنند و این یون ها به پروتئین های غشای سلولی متصل شده و باعث تجزیه و مرگ سلول های باکتریایی می شوند. همچنین، این نانوذرات قادرند به سیتوکروم ها و اسیدهای نوکلئیک متصل شده و موجب آسیب و جلوگیری از تقسیم سلولی شوند (Huang et al., 2012).

در پژوهش حاضر، به نظر می رسد که با استفاده از آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین، نانوذرات نقره یا ترکیبی از هر دو، سنتز پروتئین باکتری محدود شده و مرگ سلولی در باکتری *اُتروموناس هیدروفیلا* رخ داده است. در نتیجه، با مرگ سلولی باکتری، تعداد گلبول های سفید خون ماهی در هنگام استفاده از تیمار آنتی بیوتیکی به حالت طبیعی و سالم بازگشته است. همان طور که ذکر شد باکتری *اُتروموناس هیدروفیلا* موجب بیماری در ماهی می شود. حضور این باکتری در بدن ماهی با علائمی همچون کم خونی، ضعف و تورم و التهاب پوستی همراه است (Avsever et al., 2019). در واقع باکتری در بدن ماهی با تولید توکسین ها و آنزیم های مخرب، به سلول های خونی آسیب رسانده و باعث همولیز گلبول های قرمز می شود. از طرف دیگر، عفونت ناشی از این باکتری می تواند منجر به واکنش های التهابی شدید در بدن ماهی شود که خود باعث کاهش تعداد گلبول های قرمز می گردد (Ahmadi et al., 2011). در این میان سیستم ایمنی بدن با افزایش تولید گلبول های سفید شروع به مقابله با باکتری می کند و در نتیجه افزایش گلبول های سفید در خون مشاهده می شود. در نهایت با به خطر افتادن سلامت بدن ماهی، میزان بقا تحت تأثیر بیماری کاهش می یابد (Avsever et al., 2019; Kondera et al., 2020).

آنتی بیوتیک ها راه حلی متداول در مقابله با عفونت های باکتریایی آبزیان هستند (Swain et al., 2014; Lulijwa et al., 2020). Kondera و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه خود، آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و جنتامایسین را راهکاری در جهت کاهش سطح گلبول های سفید کپورماهی بیمار عنوان نمودند. در این تحقیق نیز اثر آنتی باکتریال و کاهش دهنده عفونت باکتریایی اکسی تتراسایکلین با کاهش میزان گلبول سفید و افزایش میزان گلبول قرمز، هموگلوبین و درصد بقا در مقایسه با تیمار بیمار، تأیید شده است.

محققان بسیاری نانوذرات را جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک ها به منظور کاهش خطرات محیط زیستی و مصارف انسانی، عنوان نموده اند (Huh and Kwon, 2011; Sharma et al., 2012; Gao et al., 2018). این ذرات با مکانیسم های مختلف و با تکیه بر اندازه بسیار ریز، به غشا سلولی آسیب رسانده و باعث اختلال در انتقال پروتئین ها و غیرفعال شدن برخی آنزیم های سلول باکتری می گردند (Wang et al., 2017; Giri et al., 2022). بدین ترتیب اثر بازدارندگی بر رشد و تکثیر باکتری داشته و باکتری را کنترل و مهار می کنند (Welz et al., 2018; Shaalan et al., 2020; Kakakhel et al., 2021). در مطالعات بسیاری اثر نانونقره بر افزایش گلبول قرمز، افزایش بقا و کاهش شرایط استرس اکسیداتیو تحت تأثیر دوز و زمان معین تأیید شده است (Jayaseelan et al., 2012; Swain et al., 2014; Shaalan et al., 2020; Kakakhel et al., 2021; Salah et al., 2023). در این تحقیق نیز تیمار نانونقره با کاهش میزان گلبول سفید، افزایش میزان گلبول قرمز، هموگلوبین و درصد بقا در مقایسه با تیمار بیمار، همراستا با مطالعات پیشین بوده است.

در ارتباط با کاربرد همزمان تیمار نانوذرات و آنتی بیوتیک ها، در تحقیق حاضر با توجه به این که در مدت زمان ۵ روز صورت گرفته، روند بهبود، مشابه تیمارهای اکسی تتراسایکلین و نانونقره بوده و کاهش میزان گلبول سفید و افزایش میزان گلبول قرمز، هموگلوبین و درصد بقا در مقایسه با تیمار بیمار، مشاهده شده است. در مطالعات پیشین این ترکیب به صورت آزمایشگاهی و صرفاً

بر روی کشت باکتریایی صورت گرفته که روند بهبود به صورت افزایشی بوده است (Baptista et al., 2018). این تفاوت می تواند ناشی از عملکرد نانوذره بر روی بدن موجود و احتمال ایجاد برخی اختلالات در موجود زنده باشد (Giri et al., 2022).

نتیجه گیری

بیماری های باکتریایی یک بحران در آبی پروری محسوب می شوند که غالباً با درمان آنتی بیوتیکی همراه اند. امروزه استفاده از نانوذرات یک رویکرد مناسب برای کنترل این نوع بیماری ها فراهم کرده است. در عین حال، استفاده از نانوذرات، نیازمند تکنیک های مناسب و دانش جامع از ویژگی های متمایز فیزیکی شیمیایی نانوذرات است. عملکرد آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین و نانوذره نقره هر کدام به صورت مجزا در کاهش اثرات بیماری و رفع علائم آن مثبت است اما در ترکیب نانوذره نقره و آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین، بسته به شرایط فیزیکی شیمیایی موجود و همچنین نوع و عملکرد نانوذره می تواند متفاوت باشد.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، هر سه روش، روند مهار کنندگی باکتریایی و بازبانی سلامت مشابهی داشته و در ارتباط با رفع آثار عفونت باکتریایی ارجحیتی نسبت به هم ندارند. در واقع عملکرد ترکیب نانوذره نقره و اکسی تتراسایکلین، نه کاهشی و نه افزایشی بوده است و نتایج به دست آمده مطابق شرایط استفاده منفرد از هر کدام است. اما با در نظر گرفتن مخاطرات محیط زیستی یا سمیت فردی لازم است مطالعات دقیق تر و بلند مدت صورت گیرد. همچنین تحقیقات ناشی از ترکیب این دو ماده و مقایسه عملکرد آنها غالباً در بعد آزمایشگاهی و صرفاً بر کشت میکروبی صورت گرفته است، بنابراین نیاز به مطالعات بیشتر، در محیط طبیعی و به صورت بالینی در آبیان است. شاید بهتر باشد به جای همزمانی استفاده از این دو ماده، از آنها به صورت متوالی و با برنامه ریزی استفاده شود تا هم آثار سوء بر بدن ماهی، محیط زیست و بوم سازگان آبی کاهش یابد و هم به لحاظ دیدگاه مدیریتی، کاراترین و کم هزینه ترین روش ترکیبی اجرا شود.

References

- Abdelsalam, M., Chen, S.-C., Yoshida, T., 2009. Surface properties of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from marine fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 29(1), 16–24.
- Ahmadi, K., Mirvaghefi, A., Banayi, M., Moosavi, M., 2011. Study of blood factors and histopathology caused by *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries* 64(3), 217-227 (In Persian)
- Akhlaghi, M., 2000. Immunogenicity of *Aeromonas hydrophila* in common carp. *Journal of Veterinary Research -University of Tehran*. (In Persian)
- Anton-Pardo, M., Hlavac, D., Masilko, J., Hartman, P., Adamek, Z., 2014. Natural diet of mirror and scaly carp (*Cyprinus carpio*) phenotypes in earth ponds. *Folia Zoologica* 63(4), 229-237.
- M., Siva, D., 2013. Antimicrobial activity of *Leucas aspera* engineered silver nanoparticles against *Aeromonas hydrophila* in infected *Catla catla*. *Colloids Surfaces Biointerfaces* 109, 20-24.
- Arakha, M., Pal, S., Samantarrai, D., Panigrahi, T.K., Mallick, B.C., Pramanik, K., Mallick, B., Jha, S., 2015. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. *Scientific Reports* 5, 14813.
- Avsever, M.L., Kum, C., Telli, E., Şişman, T., Çelik, E.Ş., Başaran, F., 2019. Isolation and identification of *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms with diseases in Turkey and detection of some virulence factors. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 19(7), 609-618.
- Baptista, P. V., McCusker, M. P., Carvalho, A., Ferreira, D. A., Mohan, N. M., Martins, M., Fernandes, A.R., 2018. Nano-strategies to fight multidrug-resistant bacteria "A Battle of the Titans". *Frontiers in Microbiology* 9, 1441.
- Bowman, C., Bailey, F., Elrod-Erickson, M., Neigh, A., Otter, R., 2012. Effects of silver nanoparticles on zebrafish (*Danio rerio*) and *Escherichia coli* (ATCC 25922): A comparison of toxicity based on total surface area versus mass concentration of particles in a model eukaryotic and prokaryotic system. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31.
- Cheng, T.C., Yao, K.S., Yeh, N., 2011. Bactericidal effect of blue LED light irradiated TiO₂/Fe₃O₄ particles on fish pathogen in seawater. *Thin Solid Films* 519, 5002-5006.

- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Shin, D. M., 2008. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research* 14(5), 1310-1316.
- Ei-Jakee, J., Elshamy, S., Hassan, A., Abdelsalam, M., Younis, N., El- Hady, M.A., Eissa, A.E., 2020. Isolation and characterization of mycoplasmas from some moribund Egyptian fishes. *Aquaculture International* 28(3), 901-912.
- Eissa, A.E., Abdelsalam, M., Abumhara, A., Kammon, A., Gammoudi, F.T., Ben Naser, K.M., Asheg, A., 2015. First record of *Vibrio vulnificus*/ *Anisakis pegreffii* concurrent infection in black scorpionfish (*Scorpaena porcus*) from the south Mediterranean basin. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 6, 1537-1548.
- Elgendy, M.Y., Shaalan, M., Abdelsalam, M., Eissa, A.E., El-Adawy, M. M., Seida, A.A., 2022. Antibacterial activity of silver nanoparticles against antibiotic-resistant *Aeromonas veronii* infections in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in vitro and in vivo assay. *Aquaculture Research* 53, 901-920.
- Gao, W., Chen, Y., Zhang, Y., Zhang, Q., Zhang, L., 2018. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 127, 46-57.
- Giri, A.K., Jena, B., Biswal, B., 2022. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Eugenia roxburghii* DC. extract and activity against biofilm-producing bacteria. *International Journal of Scientific Reports* 12, 8383.
- Huang, K., Ma, H., Liu, J., Huo, S., Kumar, A., Wei, T., 2012. Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo. *ACS Nano* 6(5), 4483-93.
- Huh, A.J., Kwon, Y.J., 2011. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release* 156(2), 128-145.
- Jayaseelan, C., Rahuman, A.A., Kirthi, A.V., 2012. Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 90, 78-84.
- Joseph, Sam. W., Amy, M. Carnahan., 1994. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annual Review of Fish Diseases* 4, 315-343.
- Kakakhel, M., Wu, F., Feng, H., Hassan, Z., Ali, I., Saif, I., Din, S., Wang, W., 2021. Biological synthesis of silver nanoparticles using animal blood, their preventive efficiency of bacterial species, and ecotoxicity in common carp fish. *Microscopy Research and Technique* 84, 1765-1774.
- Knetsch, M.L., Koole, L.H., 2011. New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers* 3(1), 340-366.
- Kondera, E., Bojarski, B., Ługowska, K., Kot, B., Witeska, M., 2020. Effects of Oxytetracycline and Gentamicin Therapeutic Doses on Hematological, Biochemical and Hematopoietic Parameters in *Cyprinus carpio* Juveniles. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 10.
- Lima, E., Guerra, R., Lara, V., Guzman, A., 2013. Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Chemistry Central Journal* 7, 1-7.
- Lozano, I., Diaz, N.F., Munoz, S., Riquelme, C., 2017. Antibiotics in Chilean aquaculture: a review. *Antibiotic Use in Animals* 3, 2-44.
- Lulijwa, R., Rupia, E.J., Alfaro, A.C., 2020. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health, and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture* 12, 640-663.
- Mahmoud, M.A., Abdelsalam, M., Mahdy, O.A., El Miniawy, H.M.F., Ahmed, Z.A.M., Osman, A.H., Zaki Ewiss, M. A., 2016. Infectious bacterial pathogens, parasites and pathological correlations of sewage pollution as an important threat to farmed fishes in Egypt. *Environmental Pollution*; 219, 939-948.
- Okoye, C.O., Okeke, E.S., Okoye, K.C., Echude, D., Andong, F.A., Chukwudozie, K.I., Okoye, H.U., Ezeonyejiaku, C.D., 2022. Occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products (PPCPs) and pesticides in African water systems: A need for timely intervention. *Heliyon* 8(3), e09143.
- Ragasa, L., Dinglasan, J., Felipe, I., Basiao, Z., Velarde, M., 2019. Exposure to *Aeromonas hydrophila* induces inflammation and increases expression of the gene encoding for a putative dual CTLD-containing lectin in milkfish liver. *Comparative Biochemical and Molecular Biology* 230, 37-47 .

- Rahman, M.M., 2015. Effects of co-cultured common carp on nutrients and food web dynamics in rohu aquaculture ponds. *Aquaculture Environment Interactions* 6, 223-232.
- Reddy, T., 2013. Effect of Silver Nanoparticles On Energy Metabolism In Selected Tissues Of *Aeromonas hydrophila* Infected Indian Major Carp, *Catla Catla*. *IOSR Journal of Pharmacy* 3, 49-55.
- Salah, M., Aly, Alaa Eldin Eissa., Nashwa, Abdel-Razek., Asmaa, O. El- Ramlawy., 2023. Chitosan nanoparticles and green synthesized silver nanoparticles as novel alternatives to antibiotics for preventing *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* infection in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 11(1), 38-54.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., Larsen, J.L., 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environment Microbiology* 66(11), 4908– 4915.
- Shaalán, M., Sellyei, B., El-Matbouli, M., Székely, C., 2020. Efficacy of silver nanoparticles to control flavobacteriosis caused by *Flavobacterium johnsoniae* in common carp *Cyprinus carpio*. *Diseases of aquatic organisms* 137 3, 175-183 .
- Sharma, A., Kumar Arya, D., Dua, M., Chhatwal, G. S., Johri, A. K., 2012. Nano-technology for targeted drug delivery to combat antibiotic resistance. *Expert Opinion on Drug Delivery* 9(11), 1325-1332.
- Swain, P., Nayak, S.K., Sasmal, A., 2014. Antimicrobial activity of metal based nanoparticles against microbes associated with diseases in aquaculture. *World Journal of Microbiol Biotechnology* 30, 2491-2502.
- Teillant, A., Gandra, S., Barter, D., Morgan, D. J., Laxminarayan, R., 2015. Potential burden of antibiotic resistance on surgery and cancer chemotherapy antibiotic prophylaxis in the USA: A literature review and modelling study. *The Lancet Infectious Diseases* 15(12), 1429-1437.
- Wang, L., Hu, C., Shaom L., 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine* 12, 1227.
- Wang, J.L., Meng, X.L., Lu, R.h., Wu, C., Luo, Y.T., Yan, X., Li, X.J., Kong, X.H., Nie, G.X., 2015. Effects of *Rehmannia glutinosa* on growth performance, immunological parameters and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 435, 293-300.
- Welz, P., Khan, N., Prins, A., 2018. The effect of biogenic and chemically manufactured silver nanoparticles on the benthic bacterial communities in river sediments. *The Science of the total environment* 644, 1380-1390.
- Zargari, A., Mazandarani, M., Hoseini, S., 2018. Effects of safflower (*Carthamus tinctorius*) extract on serum antibacterial activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae* and *Yersinia ruckeri*. *International Journal of Aquatic Biology* 6, 1-7.