

## اثرات نانو ذرات نقره بر سیستم ایمنی، خصوصیات بیوشیمیایی خون و جمعیت میکروبی روده در جوجه‌های گوشتی

• سید داود شریفی (نویسنده مسئول)

دانشیار گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

• حامد زرگران اصفهانی

آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۶-۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۱۱-۰۹

Email: sdsharifi@ut.ac.ir



### چکیده

امروزه استفاده از آنتی بیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد محدود شده است. نقره فلزی است که از گذشته‌های دور خواص ضد میکروبی آن شناخته شده است و گفته می‌شود که با کاهش اندازه ذرات این فلز به مقیاس نانو خواص ضد میکروبی آن به شدت افزایش می‌یابد. هدف از انجام این آزمایش بررسی تأثیر نانو ذرات نقره بر سیستم ایمنی و لیپیدهای خون و جمعیت میکروبی روده جوجه‌های گوشتی و مقایسه آن با آنتی بیوتیک فلاوومایسین بود. این آزمایش با استفاده از ۳۱۲ قطعه جوجه نر یک روزه سویه تجاری آربوراکرز در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و چهار تکرار انجام شد. از محلول ppm ۲۰۰۰ نانو ذرات نقره به مقدار ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی لیتر در تن جیره و یا متر مکعب آب آشامیدنی استفاده شد. یک تیمار بدون افزودنی و یک تیمار حاوی فلاوومایسین به عنوان تیمارهای شاهد در نظر گرفته شدند. افزودن ۸۰۰ میلی لیتر نانو ذرات نقره در جیره و یا آب آشامیدنی منوسیت‌ها را افزایش داد ( $p < 0.05$ ). سطوح مختلف نانو ذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی، اثری بر مقدار کلسترول، لیپوپروتئین‌های کم چگال (LDL) و لیپوپروتئین‌های پر چگال (HDL) خون و جمعیت کلی فرم‌های ایلئوم نداشت ولی جمعیت کلاستریدیوم‌های موجود در ایلئوم هنگام استفاده از ۸۰۰ میلی لیتر نانو ذرات نقره در جیره و یا آب آشامیدنی افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از نانو ذرات نقره به عنوان یک افزودنی جهت کنترل باکتری‌های مضر موجود در دستگاه گوارش و تقویت سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی مناسب نیست. تحقیقات بیشتر در این زمینه ضروری است.

کلمات کلیدی: جوجه گوشتی، صفات بیوشیمیایی خون، سیستم ایمنی، نانو ذرات نقره

- Veterinary Researches & Biological Products No 125 pp: 85-92

### **A study on the effects of silver nanoparticles as additive on immune system, blood biochemical properties and intestinal microflora of broiler chicks**

By: Sharifi, S.D., (Corresponding Author) Associate Professor, Department of Animal and Poultry Science, College of Abouraihan, University of Tehran, Tehran, Iran. and Zargarani Esfahani, H., MSc Student, Department of Animal and Poultry Science, College of Abouraihan, University of Tehran, Tehran, Iran.

Received: 2018-09-03

Accepted: 2019-01-29

Email: sdsharifi@ut.ac.ir

Today, the use of antibiotics is limited as a growth promoter. Silver has been known for its antimicrobial properties over the past, and it is said to increase its antimicrobial properties by decreasing the particle size to nano scale. The aim of this study was to evaluate the effect of silver nanoparticles on immune system and blood lipids and microbial population of broiler chickens and compare it with flavomycin. A total 312 day-old broilers (Arbor-Acre Plus) were used in a completely randomized design with 6 treatments diets and 4 replicates per each replicate. The nano-silver solution (2000 ppm) was used in 400 and 800 cc per ton diet or 1000lit water to prepare treatments. Two treatments with and without antibiotic (flavomycin 500g/t) were considered as control groups. Number of monocytes increased significantly in birds received diets or drinking water containing 800 ml silver nanoparticles ( $p < 0.05$ ). Different levels of silver nanoparticles in diet or drinking water had not significant effects on concentration of cholesterol, low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL) of serum and coliform bacteria in the ileum. But the number of cholestridia in the ileum of birds received 800 ml silver nanoparticles in diet or drinking water increased significantly ( $p < 0.05$ ). The results indicate that silver nanoparticles are not suitable for using as feed additives to encourage immune system and control pathogenic bacteria in broilers gut. Further studies are needed.

**Keyword:** Broiler chicks, Blood biochemical properties, Immune system, Silver nanoparticles

#### مقدمه

امروزه استفاده از افزودنی‌ها جهت بهبود رشد، تولید مطلوب و افزایش بهره‌وری خوراک، بسیار متداول می‌باشد. ترکیبات ضد میکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها از افزودنی‌هایی هستند که برای سال‌های متمادی جهت بهبود رشد و عملکرد، محافظت پرندگان از اثرات نامطلوب میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا و همچنین درمان بیماری‌ها در صنعت طیور استفاده می‌شوند. آنتی‌بیوتیک‌ها با کنترل و یا محدود نمودن رشد باکتری‌های بیماری‌زا (نظیر کلاستریدیم پرفرینجنس) و یا جلوگیری از رشد و جایگزینی گونه‌های متعددی از باکتری‌های غیر بیماری‌زای موجود در دستگاه گوارش طیور (نظیر لاکتوباسیل‌ها، بیفیدو باکترها و باکترئیدها) و در نتیجه کاهش متابولیت‌های میکروبی مضر مانند آمونیاک و دیگر ترکیبات سمی ازت دار در روده، سبب بهبود عملکرد می‌شوند (۱۹). بنابراین اثرات سودمند آنتی‌بیوتیک‌ها، ناشی از اثر آن‌ها بر جمعیت میکروبی مجرای روده می‌باشد. به این ترتیب ممکن است هضم و یا قابلیت دسترسی مواد مغذی مانند کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها را بهبود داده و از این طریق بر صفات بیوشیمیایی خون تأثیر گذارند (۱۷). امروزه به دلیل نگرانی از ایجاد مقاومت میکروبی در برابر

آبیوتیک‌ها کاربرد آنها در بیشتر نقاط دنیا محدود شده است (۲۰). لذا جهت دستیابی به عملکرد مطلوب و حفظ سلامتی و بهداشت طیور یافتن جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری است. اسیدهای آلی، پرو و پری بیوتیک‌ها و همچنین اسانس‌های گیاهی ترکیباتی می‌باشند که با ایجاد تغییر در فلور میکروبی دستگاه گوارش و کاهش باکتری‌های بیماری‌زا در دیواره روده، تولید ترکیبات سمی توسط آن‌ها را کاهش داده و موجب تغییر در مرفولوژی دیواره روده و بهبود هضم و جذب و در نهایت افزایش عملکرد می‌شوند (۱۲).

نانوتکنولوژی به عنوان یکی از پیشرفته‌ترین علوم در عصر حاضر، در تمام زوایای حیات جانوری، گیاهی، زیست محیطی و صنعتی نفوذ نموده و افق جدیدی را در علوم طبیعی باز کرده است. با تغییر اندازه ذرات از میکرومتر به نانومتر (۹-۱۰ متر یا یک میلیاردیم متر) به خاطر افزایش نسبت سطح به حجم تمام خواص فیزیکی و شیمیایی تغییر نموده و واکنش‌پذیری ذره به شدت افزایش می‌یابد. نقره فلزی است که از گذشته‌های دور خواص ضد میکروبی آن شناخته شده است. با کاهش اندازه ذرات این فلز به مقیاس نانو خواص آن به شدت افزایش می‌یابد. نانوذرات نقره یون‌ها +Ag ساطع می‌کنند که با پیوندهای HS- دیواره

شد. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: جیره شاهد (بدون افزودنی)، جیره حاوی فلاومایسین (۵۰۰ گرم در هر تن)، جیره حاوی ۴۰۰ میلی لیتر نانو ذرات نقره در هر تن خوراک، جیره حاوی ۸۰۰ میلی لیتر نانو ذرات نقره در هر تن خوراک، جیره حاوی ۴۰۰ میلی لیتر نانو ذرات نقره در هر متر مکعب آب آشامیدنی، جیره حاوی ۸۰۰ میلی لیتر نانو ذرات نقره در هر متر مکعب آب آشامیدنی.

در کل دوره آزمایش، ۲۴ ساعت نور در شبانه روز تأمین شد و آب و غذا در تمام مدت بطور آزاد در اختیار جوجه‌ها بود. برنامه واکسیناسیون توصیه شده در منطقه (نیوکاسل، گامبرو و لاسوتا) تا قبل از ۲۰ روزگی انجام شد. افزایش وزن، مصرف غذا و ضریب تبدیل غذایی به صورت هفتگی تا پایان دوره پرورش اندازه‌گیری شد. در پایان هفته پنجم دوره آزمایش بعد از اعمال دو ساعت گرسنگی، از هر واحد آزمایشی دو پرندۀ با وزن نزدیک به میانگین انتخاب و مقدار ۴ سی سی خون از طریق سیاهرگ بال از هر پرندۀ گرفته شد. نیمی از نمونه‌های خون گرفته شده برای بررسی فراوانی گلبول‌های سفید و همچنین تیترا آنتی‌بادی نیوکاسل اختصاص داده شد. لذا جهت جلوگیری از انعقاد، به آنها سیترات سدیم اضافه و به آزمایشگاه ارسال شد. سرم نمونه‌های اختصاص یافته برای بررسی صفات بیوشیمیایی، پس از ارسال به آزمایشگاه، به کمک سانتریفوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۵ دقیقه جدا شد. میزان کلسترول، تری گلیسرید، HDL و LDL سرم به کمک کیت‌های تجاری پارس آزمون و به روش آنزیمی-کلریمتری اندازه‌گیری شد (۱۵). به منظور بررسی جمعیت میکروبی دستگاه گوارش، در انتهای دوره پرورش از هر واحد آزمایشی یک پرندۀ به طور تصادفی انتخاب و به روش انسانی کشتار شد. بلافاصله پس از کشتار محوطه شکمی باز و از انتهای روده کوچک (ایلئوم) هر پرندۀ یک قطعه ۱۵ سانتی‌متری جدا شد. بعد از بستن دو انتهای آن با نخ، در نایلون زیپ-کیپ شماره‌گذاری شده، قرار داده شد و سپس با استفاده از فلاکس حاوی یخ، برای کشت باکتریایی به آزمایشگاه ارسال شد. تعداد کل باکتری‌ها، فراوانی گونه‌های لاکتوباسیل، کلی‌فرم‌ها و کلستریدیوم‌ها در محتویات ایلئوم تعیین شد. برای تعیین تعداد کل باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر نمونه مورد مطالعه از روشی معروف به روش برید (Breed) استفاده شد (۱). برای این منظور از لوله حاوی بافر که نمونه اولیه در آن حل شده بود مقدار یک میلی‌لیتر به داخل لوله درب‌دار دیگری منتقل و برای از بین بردن باکتری‌ها به آن چند قطره فرمالین اضافه شد. سپس مقدار ۰/۰۱ میلی‌لیتر از آن به روی لام مخصوص و بر روی سطحی به وسعت یک سانتیمتر مربع پخش شد. لام در حرارت محیط خشک و نمونه‌ها با استفاده از شعله تثبیت گردیدند. سپس چند قطره رنگ کریستال و یوله بر روی آن ریخته و پس از ۱۰ ثانیه با آب شسته شد. بعد از خشک کردن لام، به کمک میکروسکوپ تعداد باکتری‌ها در ۵ خانه شمارش گردید و میانگین گرفته شد. هر میدان میکروسکوپی یک پنج هزارم سانتی‌متر مربع است بنابراین مشاهده هر باکتری نمایانگر ۵۰۰۰ باکتری در یک سانتی‌متر مربع و به عبارت دیگر ۵۰۰/۰۰۰ باکتری در هر سانتی‌متر مکعب نمونه است (۳). برای تعیین فراوانی لاکتوباسیل‌ها، کلستریدیوم‌ها و کلی‌فرم‌ها به ترتیب از محیط‌های کشت Rogosa Agar(merck,05413)، Reinforced Salmonella- Shigella و colesteridium Agar(Merck, 05410) Agar(Merck, 7667) استفاده شد. محیط‌های کشت مذکور پس از آماده

میکروارگانیزم‌ها وارد واکنش شده و تولید AgS- کرده موجب مرگ آن‌ها می‌شود. نانوذرات نقره می‌توانند در فعالیت آنزیم‌های تنفسی و سیستم انتقال الکترون اختلال ایجاد نمایند. به علاوه می‌توانند با اتصال به سطح باکتری‌ها و ایجاد تغییر در ساختمان غشاء موجب مرگ باکتری‌ها شوند (۱۴ و ۱۸). نانو ذرات نقره در محیط آزمایشگاهی اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی دارند و می‌توانند از طریق سازوکارهای یونی و کاتالیستی گونه‌های مختلف میکروبی را از بین ببرند (۹). حساسیت و عدم پایداری باکتری‌های *E. coli*, *Staphylococcus cereus* و *Bacillus subtilis* به نانو نقره نشان داده شده است (۲). این ذرات به عنوان حامل اکسیژن عمل می‌نمایند و از این راه باعث کاهش میکروارگانیزم‌های بی‌هوازی و همچنین موجب افزایش در جمعیت میکروارگانیزم‌هایی که توانایی زندگی در حضور فشار اکسیژن تقلیل یافته را دارند مخصوصاً لاکتوباسیل‌ها می‌گردند (۷ و ۱۶) علی‌رغم توانایی این ماده در از بین بردن میکروبوها، گزارش‌های زیادی نیز در خصوص اثرات سمی این ماده در انسان و حیوانات وجود دارد (۴ و ۱۰).

با توجه به خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره، به نظر می‌رسد که بتوان از این ماده به عنوان افزودنی برای کنترل فعالیت میکروبی دستگاه گوارش طیور به جای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده نمود. گزارشات محدودی در خصوص تأثیر کاربرد این ترکیبات به عنوان افزودنی در دام و طیور وجود دارد. نشان داده شده است که افزودن نانوسیلور به خوراک، هیچ تأثیری بر عملکرد و افزایش وزن در خوک‌ها (۶) و جوجه‌های گوشتی (۲۱) ندارد. گزارش شده است که افزودن نانوذرات نقره در آب آشامیدنی بلدرچین‌ها اثرات تخریبی بر سلول‌های جاذب پرزهای دوازدهه ندارد ولی جمعیت لاکتوباسیل‌ها را در روده افزایش می‌دهد (۱۶). کاهش تعداد و اندازه فولیکول‌های لنفاوی غده بورس در جنین مرغ در اثر تزریق این ماده به داخل تخم مرغ‌های نطفه‌دار، گزارش شده است (۷). امروزه از نانو ذرات نقره در دامپروری برای شستشوی و ضد عفونی پستان و سم دام، ساختمان‌ها لباس‌ها استفاده می‌شود. با این حال، علی‌رغم اثرات ضد میکروبی این ترکیب در محیط آزمایشگاه، استفاده از آن به عنوان افزودنی در تغذیه دام و طیور به مطالعات بیشتری نیاز دارد. لذا این آزمایش به منظور بررسی امکان کاربرد نانوذرات نقره به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد و مطالعه اثر آن بر فعالیت میکروبی دستگاه گوارش، سیستم ایمنی و صفات بیوشیمیایی خون، در جوجه‌های گوشتی انجام گرفت.

### مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۳۱۲ قطعه جوجه نر یک روزه از سویه تجاری آربورا کرز پلاس در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار، چهار تکرار استفاده شد. جیره‌های آزمایشی بر پایه ذرت و کنجاله سویا برای سه دوره آغازین، رشد و پایانی و مطابق احتیاجات مواد مغذی توصیه شده سویه تجاری با استفاده از نرم‌افزار UFFDA تنظیم گردید (جدول ۱). از محلول نانو نقره (با غلظت ۲۰۰۰ PPM) تولیدی در داخل کشور به عنوان منبع نانوذرات و به مقدار ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌لیتر در هر تن خوراک و یا مترمکعب آب آشامیدنی استفاده شد. علاوه بر گروه شاهد یک تیمار حاوی فلاومایسین نیز به منظور مقایسه اثرات نانوذرات نقره با آنتی‌بیوتیک‌ها در نظر گرفته

شدند. در نهایت با ضرب نمودن تعداد کلنی‌ها در ضریب رقت، تعداد باکتری‌ها محاسبه شد (۳). داده‌های حاصل به کمک برنامه نرم‌افزاری SAS (نسخه ۹) و مطابق مدل آماری زیر تجزیه و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

در این رابطه  $Y_{ij}$ : مقدار هر مشاهده،  $\mu$ : میانگین جامعه،  $T_i$ : اثر تیمار و  $e_{ij}$ : خطای آزمایش می‌باشد.

### نتایج

تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد تاثیر معنی‌داری بر تیتراکتی‌بادی علیه بیماری نیوکاسل، تعداد گلبول‌های سفید خون، فراوانی هتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها، بازوفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها نداشتند (جدول ۲). ولی فراوانی منوسیت‌ها در جوجه‌هایی که سطح ۸۰۰ میلی‌لیتر نانو ذرات نقره در جیره و یا آب آشامیدنی دریافت نمودند به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). در این آزمایش هیچ گونه باند هتروفیلی و یا لنفوسیت غیر طبیعی که به ترتیب ناشی از اختلال در تولید هتروفیل‌ها و

شدن به پتری دیش منتقل شدند. در مورد کلوستریدیوم‌ها چون شمارش کلنی‌ها از طریق کشت نمونه اولیه میسر نبود، ابتدا نمونه‌های همراه بافر به مدت یک هفته در یخچال قرار داده شدند تا وارد مرحله هاگ شوند. سپس نمونه از یخچال خارج و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. این عمل برای اطمینان به از بین رفتن سایر باکتری‌های غیر هاگ‌زای موجود در نمونه‌ها انجام شد. سپس برای شمارش به کشت هاگ‌ها آنها اقدام شد. برای تعیین تعداد باکتری‌ها از روش شمارش کلنی استفاده شد. به همین منظور از نمونه اولیه به کمک بافر فسفات، ۱۳ سری رقت با ضریب رقیق‌سازی ۱۰، تهیه شد. از هر کدام از رقت‌ها ۲۰۰ میکرولیتر به هر کدام از محیط‌های کشت اختصاصی تلقیح شد. برای ایجاد محیط بی‌هوازی، پس از کشت نمونه، مقداری از همان محیط کشت به صورت لایه نازکی بر روی نمونه کشت شده اضافه شد. پلت‌ها پس از تلقیح، به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. دوره انکوباسیون تا زمان تشخیص کلنی‌های کامل ادامه یافت. این زمان در مورد باکتری‌های مختلف مورد مطالعه بین ۲۴ تا ۹۶ ساعت متغیر بود. پس از طی زمان انکوباسیون تعداد کلنی‌ها بر روی پلیت‌های مربوط به رقت‌هایی که تعداد کلنی‌هایی بین ۳۰ تا ۳۰۰ عدد داشتند، شمارش

جدول ۱- ترکیب جیره‌های آزمایشی در دوره‌های آغازین، رشد و پایانی\*

مواد خوراکی (%)	دوره آغازین (۱-۱۴ روزگی)	دوره رشد (۲۸-۱۵ روزگی)	دوره پایانی (۴۲-۲۹ روزگی)
ذرت	۶۷/۲	۶۶/۸	۷۱/۶
کنجاله سویا	۲۹/۳	۲۷/۸	۲۳/۴
روغن	--	۲	۲
پوسته صدف	۱/۴	۱/۴	۱/۳
دی کلسیم فسفات	۱/۴	۱/۲	۰/۹
نمک	۰/۲	۰/۲	۰/۲
مکمل ویتامینی**	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل معدنی**	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
دی - ال متیونین	۰/۱۷	۰/۱۰	۰/۱۰
اجزاء محاسبه شده			
میزان انرژی (Kcal/Kg)	۳۰۵۰	۳۱۰۰	۳۱۵۰
درصد پروتئین	۲۱/۹۲	۱۹/۳۸	۱۷/۷۲

\* برای تهیه جیره‌های حاوی نانو ذرات نقره به جیره‌های مذکور مقادیر ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌لیتر در تن محلول ۲۰۰۰ PPM آن اضافه شد. \*\* هرکیلو گرم مکمل ویتامینی حاوی ۴۴۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۷۲۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D، ۱۴۴۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۲۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین K، ۶۴۰ میلی‌گرم کوبالامین، ۶۱۲ میلی‌گرم تیامین، ۳۰۰۰ میلی‌گرم ریبولوین، ۴۸۹۶ میلی‌گرم اسید پانتوتیک، ۱۲۱۶۰ میلی‌گرم نیاسین، ۶۱۲ میلی‌گرم پیریدوکسین، ۲۰۰۰ میلی‌گرم بیوتین و ۲۶۰ گرم کولین کلراید می‌باشد. هر کیلوگرم مکمل معدنی حاوی ۶۴/۵ گرم منگنز، ۳۳/۸ گرم روی، ۱۰۰ گرم آهن، ۸ گرم مس، ۶۴۰ میلی‌گرم ید، ۱۹۰ میلی‌گرم کبالت و ۸ گرم سلنیوم می‌باشد.

افزایش معنی‌داری در تعداد منوسیت‌ها در مقایسه با سایر تیمارها شد. در طی عفونت پاتوژنیک، منوسیت‌ها برای کشتن پاتوژن‌ها جمع شده که این باعث التهاب می‌شود. حال چنانچه این عفونت در روده اتفاق افتد سبب ضخیم شدن دیواره روده می‌شود. بنابراین وجود منوسیت زیاد در خون نشان‌دهنده نوعی عفونت است.

گلبول‌های سفید با کموتاکسی جذب بافت‌های ملتهب می‌شوند. مواد شیمیایی مختلف در بافت‌ها می‌توانند منوسیت‌ها را به سمت خود بکشانند، که این پدیده را کموتاکسی گویند. سموم باکتریایی یکی از مهم‌ترین موادی است که باعث کموتاکسی می‌شود (۸). بنابراین ممکن است به دلیل بالا بودن معنی‌دار کلستریدیوم‌ها در تیمارهای حاوی ۸۰۰ سی‌سی نانو ذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی و در نتیجه ایجاد پدیده کموتاکسی، منجر به تحریک بدن در ساخت بیشتر منوسیت‌ها شده باشد. از سویی دیگر نانو ذرات نقره از طریق تولید رادیکال‌های فعال اکسیژنی، ممکن است موجب آسیب سلولی شده و در نتیجه پدیده کموتاکسی (ناشی از آزاد شدن مواد شیمیایی داخل سلولی) باعث افزایش ساخت و هجوم منوسیت‌ها شوند. سایر فاکتورهای ایمنی بیشتر مربوط به ایجاد عفونت در خون می‌باشد که در این تحقیق بین تیمارهای آزمایشی تفاوتی وجود نداشت. در همین رابطه، در آزمایشی با تزریق نانو ذرات نقره داخل تخم مرغ اثر این ترکیب را بر توسعه غده بورس فابریوس مطالعه و نشان داده شد که نانو ذرات نقره بر رشد جنینی تأثیری ندارد ولی تعداد و اندازه فولیکول‌های لنفی در غده بورس را کاهش می‌دهد (۷).

استفاده از سطوح مختلف نانو ذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی تأثیری بر صفات بیوشیمیایی خون نداشت. اما بررسی

یا لئوسیت‌های خونی است مشاهده نشد.

افزودن سطوح مختلف نانو ذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی تأثیر معنی‌داری بر کلسترول و LDL خون جوجه‌ها در مقایسه با گروه شاهد نداشت (جدول ۳). افزودن نانو ذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی غلظت تری‌گلیسرید خون جوجه‌ها را کاهش داد به طوری که این کاهش هنگام استفاده از سطح ۸۰۰ میلی لیتر نانو ذرات در جیره یا آب آشامیدنی معنی‌دار شد ( $p < 0/05$ ).

افزودن آنتی‌بیوتیک به جیره غلظت کلسترول، تری‌گلیسریدها و LDL سرم خون جوجه‌ها افزایش داد ( $p < 0/05$ ). افزودن سطوح مختلف نانو ذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی تأثیر معنی‌داری بر جمعیت کلی فرم‌های روده جوجه‌ها در مقایسه با گروه شاهد نداشت (جدول ۴). تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد تأثیر معنی‌داری را بر جمعیت لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترهای روده نداشتند. افزودن ۴۰۰ سی‌سی نانو ذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی اثر معنی‌داری بر جمعیت کلستریدیوم‌های روده آن‌ها در مقایسه با گروه شاهد نداشت، اما کاربرد ۸۰۰ سی‌سی نانو ذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی افزایش معنی‌داری را بر جمعیت کلستریدیوم‌های روده آن‌ها در مقایسه با گروه شاهد نشان داد.

### بحث

مطالعات اندکی در مورد تأثیر نانو ذرات نقره بر عملکرد، سیستم ایمنی، فلور میکروبی دستگاه گوارش و لیپیدهای سرم در حیوانات (بخصوص جوجه‌های گوشتی) انجام شده است. در این تحقیق استفاده از ۸۰۰ سی‌سی نانو ذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی سبب

جدول ۲- اثر نانو ذرات نقره بر تیتراکتی بادی علیه نیوکاسل و تعداد و فراوانی انواع گلبولهای سفید خون در جوجه‌های گوشتی

تیمار	هتروفیل (%)	لئوسیت (%)	منوسیت (%)	اُوزینوفیل (%)	گلبولهای سفید (عدد در هر میلی لیتر)	تیتراکتی نیوکاسل
شاهد	۳۳/۵	۶۳	۲/۲ <sup>b</sup>	۱/۳	۲۱۰۶۳/۳	۳/۳۳
فلاوومایسین	۳۳/۴	۶۳	۲ <sup>b</sup>	۱/۶	۲۱۱۲۳/۳	۳/۳۳
نانو نقره (۴۰۰ ml/ton خوراک)	۳۲/۶	۶۳/۵	۲/۴ <sup>b</sup>	۱/۵	۲۱۳۲۳/۳	۳/۶۶
نانو نقره (۸۰۰ ml/ton خوراک)	۳۲/۹	۶۳	۳/۱ <sup>a</sup>	۱	۲۱۳۹۰	۳/۳۳
نانو نقره (۴۰۰ ml/m <sup>۳</sup> آب آشامیدنی)	۳۲/۷	۶۳/۴	۲/۳ <sup>b</sup>	۱/۶	۲۱۱۵۰	۳/۳۳
نانو نقره (۸۰۰ ml/m <sup>۳</sup> آب آشامیدنی)	۳۳	۶۳/۱	۳/۱ <sup>a</sup>	۰/۸	۲۱۴۸۰	۳
SEM	۰/۷۲	۰/۷۲	۰/۰۰۵	۰/۰۴	۱۳۵/۵۲	۰/۶۰

a-b: اعداد در هر ستون با حروف غیر مشابه با هم اختلاف معنی دار دارند ( $P < 0/05$ ).

SEM: خطای معیار میانگین‌ها.

تغییر عملکرد غشاء باکتریایی و ممانعت از همانندسازی DNA در محیط آزمایشگاه (*In Vitro*) نشان داده شده است. واکنش یون‌های نقره با گروه‌های تیول موجود در آنزیم‌ها و پروتئین‌ها به عنوان عامل اصلی فعالیت ضد میکروبی یون‌های نقره شناخته شده است با اینحال سازوکارهای دیگری نظیر ایجاد پیوندهای هیدروژن با سایر اجزاء سلولی نیز ممکن است در این امر دخالت داشته باشند (۱۸). در این تحقیق هنگام استفاده از ۸۰۰ سی سی نانو ذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی نه تنها تعداد باکتری‌های موجود در ایلنوم کاهش نیافت، بلکه تعداد کلستریدیوم‌ها که یکی از انواع باکتری‌های مضر

داده‌های معنی‌دار نشده هنگام استفاده از ۸۰۰ سی سی نانو ذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی کاهش کلسترول و تری گلیسرید را نشان داد که ممکن است به دلیل دکنژوگه شدن اسیدهای صفاوی و در نتیجه کاهش هضم و جذب چربی‌ها باشد. فلور میکروبی موجب تبدیل بیولوژیکی اسیدهای صفاوی شده و با دکونژوگه کردن و دهیدروکسیله کردن صفا در جذب چربی توسط حیوان اختلال ایجاد می‌کند (۲۰). در این تحقیق تیمارهای آزمایشی اثری بر HDL نداشتند که با سایر گزارشات همخوانی دارد (۱۱). فعالیت ضد میکروبی نقره از طریق بلوکه کردن سیستم انتقال الکترون،

جدول ۳- اثر نانو ذرات نقره و آنتی بیوتیک روی کلسترول، تری گلیسرید، HDL و LDL (mg/dl)

تیما	کلسترول	تری گلیسرید	HDL	LDL
شاهد	۱۵۴ <sup>b</sup>	۱۱۴/۶ <sup>b</sup>	۱۰۹/۶	۱۸/۳ <sup>b</sup>
فلاوومایسین	۱۸۴ <sup>a</sup>	۱۲۲ <sup>a</sup>	۱۱۰/۱	۲۲/۹ <sup>a</sup>
نانو نقره (۴۰۰ ml/ton خوراک)	۱۴۸ <sup>b</sup>	۱۱۲ <sup>bc</sup>	۱۰۹	۱۷/۴ <sup>b</sup>
نانو نقره (۸۰۰ ml/ton خوراک)	۱۴۵/۳ <sup>b</sup>	۱۱۰ <sup>c</sup>	۱۰۸/۳	۱۶/۱ <sup>b</sup>
نانو نقره (۴۰۰ ml/m <sup>۳</sup> آب آشامیدنی)	۱۴۶/۶ <sup>b</sup>	۱۱۱ <sup>bc</sup>	۱۰۹/۳	۱۷/۱ <sup>b</sup>
نانو نقره (۸۰۰ ml/m <sup>۳</sup> آب آشامیدنی)	۱۴۵/۳ <sup>b</sup>	۱۰۹ <sup>c</sup>	۱۰۹	۱۶/۴ <sup>b</sup>
SEM	۲/۵۹	۱/۱۷	۱/۲۲	۰/۷۱

a-c: اعداد در هر ستون با حروف غیر مشابه با هم اختلاف معنی دار دارند ( $P < 0.05$ ).

SEM: خطای معیار میانگین‌ها

جدول ۴- اثر نانو ذرات نقره و آنتی بیوتیک بر جمعیت باکتریایی موجود در ایلنوم (LOG<sub>10</sub>)<sup>\*</sup>

a

تیما	کلی فرم	کلستریدیوم	لاکتوباسیلوس	بیفیدوباکتر
شاهد	۵/۴۶ <sup>a</sup>	۷/۳۵ <sup>b</sup>	۷/۹۰	۷/۳۸
فلاوومایسین	۵/۱۶ <sup>b</sup>	۷/۱۴ <sup>c</sup>	۷/۸۹	۷/۳۶
نانو نقره (۴۰۰ ml/ton خوراک)	۵/۵۱ <sup>a</sup>	۷/۳۸ <sup>b</sup>	۷/۹۳	۷/۴۰
نانو نقره (۸۰۰ ml/ton خوراک)	۵/۵۳ <sup>a</sup>	۷/۵۱ <sup>a</sup>	۷/۹۵	۷/۳۹
نانو نقره (۴۰۰ ml/m <sup>۳</sup> آب آشامیدنی)	۵/۵۲ <sup>a</sup>	۷/۳۷ <sup>b</sup>	۷/۹۲	۷/۳۹
نانو نقره (۸۰۰ ml/m <sup>۳</sup> آب آشامیدنی)	۵/۵۳ <sup>a</sup>	۷/۵۰ <sup>a</sup>	۷/۹۴	۷/۴۰
SEM	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۴

a-c: اعداد در هر ستون با حروف غیر مشابه با هم اختلاف معنی دار دارند ( $P < 0.05$ ).

SEM: خطای معیار میانگین‌ها



5. Esteive, G. E. J., V. A. M. Brufau, and A. K. Perez. 1997. Bioefficacy of enzyme preparations containing beta-glucanase and xylanase activities in broiler diets based on barley or heat, in combination with flavomycin. *Poultry Science* 76 : 1728-1737

6. Fondevila M., R. Herrero, M. C. Casallasa, L. Abeciaa, J. J. Duchab. 2008. Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology* 150: 259-269

7. Grudzien, M. and E. Sawosz. 2006. The influence of silver nanoparticles on chick embryo development and bursa Fabricius morphology. *Journal of Animal Feed and Science* 15: 111 – 115

8. Guyton, A. C. and J. E. Hall. 2006. Text Book of Medical Physiology. 11th Edition. Elsevier Inc.

9. Hoet, P. H., I. Bruske-Hohlfeld and O. V. Salata. 2004. Nanoparticles-known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology* 2: 12-14

10. Hollinger, M. A. 1996. Toxicological aspects of topical silver pharmaceuticals. *Critical Review Toxicology* 26:255-60

11. Khosravi, A., F. Boldaji, B. Dastar and S. Hasani. 2008. The use of some feed additives as growth promoter in broilers nutrition. *International Journal of Poultry Science* 7: 1095-1099

12. Leeson, S. and J. D. Summers. 2001. Scott's nutrition of Chickens. 4th Edition. University Books. Canada.

13. Nollet, L. 2005. AGP alternatives-part I. EU close to a future without antibiotic growth promoters. *World's Poultry*, 21: 14-15.

14. Percival, S L, P. G. Bowler and D. Russell. 2005. Bacterial resistance to silver in wound care. *Journal of Hospital Infection* 60: 1-7

15. Qureshi, A. A., Z. Din, N. Abuirmeileh, W. C. Burger, Y. Ahmad and C. Elson. 1983. Suppression of avian hepatic lipid metabolism by solvent extracts of garlic: Impact on serum lipids. *Journal of Nutrition* 113: 1746-55

16. Sawosz, E., M. Binek, M. Grodzik, S. P. Ziellin, M. Szmidt, T. Niemiec and A. Chwaiibog . 2007. Influence of hydrocolloidal silver nanoparticles on gastrointestinal microflora and morphology of enterocytes of quails. *Archives of Animal Nutrition* 61: 444 – 451

17. Scott, D. F. and P. D. Michael. 1987. Sub-therapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. *Applied Environmental microbiology* 331-336

18. Sondi, I. and S. B. Sondi. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275: 77-182

19. Tannock, G.W. 1997. Modification of the normal microbiota by diet, stress, antimicrobial agents, and probiotics. Pages 434-465, In: Gas-trointestinal Microbiology, vol. 2. Gastrointestinal Mi-

دستگاه گوارش هستند را نیز افزایش داد. بنابراین به نظر می‌رسد که نحوه اثرگذاری این ترکیب در محیط زنده (In Vivo) با محیط آزمایشگاه متفاوت باشد. مکانیسم عمل نانو ذرات نقره بر میکروارگانیسم‌ها در دستگاه گوارش مشخص نیست، اما به هر ترتیب ممکن است به دلیل بی‌اثر شدن در دستگاه گوارش و یا فراهم کردن محیطی مناسب برای میکروارگانیسم‌ها موجب افزایش تعداد آن‌ها شده باشند که شاید این موضوع با اختلالی که احتمالاً نانو ذرات نقره در روند هضم و جذب مواد مغذی ایجاد می‌کنند در ارتباط باشد (۹). نتایج آزمایش حاضر با گزارش در خصوص عدم تأثیر نانو ذرات نقره بر تعداد باکتری‌های گرم منفی سکوم بلدرچین همخوانی دارد (۱۶) ولی با گزارشات دیگر مبنی بر کاهش کلاسترییدیوم‌ها و لاکتوباسیل‌های موجود در دستگاه گوارش (۶)، و یا افزایش در تعداد لاکتوباسیل‌های موجود در روده کور (۱۶) در اثر استفاده از نانو ذرات نقره همخوانی ندارد. احتمالاً ترکیب ذرات فلز نقره با HCl و تولید AgCl به هنگام عبور از معده (۲) و یا جذب نانو ذرات نقره در بخش‌های بالائی روده کوچک و قبل از رسیدن به ایلئوم، موجب کاهش اثرات ضد میکروبی آن شده است. با وجودی که میزان نقره بافت‌ها بعد از مصرف نانو ذرات آن، ناچیز گزارش شده است (۶)، قابلیت رسوب این ترکیب در بافت‌ها به ویژه کبد نیز گزارش شده است (۲۱). استفاده از ۸۰۰ سی‌سی نانو ذرات نقره در جیره و آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی ممکن است موجب رشد میکروارگانیسم‌هایی شوند که مقادیر زیادی آمونیاک و سایر محصولات نیتروژنی سمی را در روده تولید می‌کنند. این موضوع ممکن است با محدودیت احتمالی که نانو ذرات نقره در شکست پروتئین‌ها ایجاد می‌کنند تشدید شود (۹). آمونیاک و سایر ترکیبات نیتروژنه نظیر تری متیل آمین ممکن است سمی بوده و باعث کاهش رشد شوند (۱۷).

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که نانو ذرات نقره تأثیر مثبتی در کنترل باکتری‌های مضر موجود در دستگاه گوارش و تقویت سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی ندارد و استفاده از آن به عنوان افزودنی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد مناسب نیست. تحقیقات بیشتر در این زمینه و همچنین یافتن روش‌های مناسب استفاده از این ترکیب ضد میکروبی در صنعت طیور ضروری است.

### منابع مورد استفاده

1. Ale Mohammad, M. M. 1986. Practical Microbiology. First publication, Tehran university press.
2. Atiyeh, B. S., M. Costagliola, S.N. Hayek, and S. A. Dibo. 2007. Effect of silver on burn wound infection control and healing. Review of the Literature Burns 33: 139-148.
3. Baron, E. J., and S. M. Finegold. 1990. Diagnostic Microbiology. 8th Edition. The C.V. Mos by Company. Toronto, Canada.
4. Benn, T. M. and P. Westerhoff. 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science and Technology* 42: 4133-4139

crobes and Host Interactions. R. I. Mackie, B. A. White and R. E. Isaacson,(ed.) Chapman and Hall, New York, NY.

20. Wakeman, G. W. 2005. AGP alternatives- part II. Dietary strategies to influence bacterial microflora. *World Poultry* 21: 28-29

21. Zargaran esfahani, H., S. D. Sharifi, A. Barin, and A. Afzal-zadeh. 2010. Influence of silver nanoparticles on performance and carcass properties of broiler chicks. *Iranian Journal of Animal science* 41:137-141(In Persian).

