Archive of SID

استفاده از گرانول و الیاف زئولیت نقره (زئومیک) در سیستم فیلتراسیون آب به منظور کاهش عفونت ناشی از باکتری *استرپتوکوکوس اینیائی* در بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان

مریم قهرمانی[۱]، محمدرضا کلباسی[۲]، مهدی سلطانی[۳] و سیدعلی جوهری[۴]

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۳۰

خلاصه

با توجه به امکان شیوع بیماری استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان ایران و خسارات ناشی از آن بر صنعت آبزی پروری، در این تحقیق امکان استفاده غیر مستقیم از زئولیت نقره به دو صورت گرانول (به میزان ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم) و الیاف (به میزان ۱۰۰ گرم) در سیستم فیلتراسیون آب پرورش بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان، با هدف کنترل باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*، مورد مطالعه قرار گرفت. پس از اطمینان از توان بازدارندگی زئولیت نقره بر علیه باکتری مذکور در شرایط آزمایشگاهی (از طریق آزمایش‌های تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)، آنتی‌بیوگرام روی پلیت و آنتی‌بیوگرام داخل لوله) فیلتر مدیاهای مذکور در فیلترهای تصفیه آب بکار گرفته شدند. در مرحله بعد جهت انجام آزمایش‌ها در محیط طبیعی، باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* (10^5 سلول در میلی‌لیتر) به آب تلقیح گردید و کارایی فیلترها در مهار باکتری از طریق سنجش بار باکتریایی آب، بررسی میزان مرگ و میر و علایم بالینی ماهیان و نیز کشت اندام‌های کلیه و طحال ارزیابی گردید. بر اساس نتایج به دست آمده حداقل غلظت بازدارنده زئولیت نقره بر رشد باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. نتایج حاصله اختلاف معنی‌داری را در کاهش بار باکتریایی آب، تلفات ماهی و ظهور علایم بیماری در تیمارهای حاوی ترکیبات نقره در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد و در مجموع از بین فیلتر مدیاهای آزمایش شده در این بررسی، الیاف زئولیت نقره با کاهش تعداد باکتری از $5/48\pm0/01$ log به $3/5\pm0/17$ log بالاترین کارایی را جهت استفاده در سیستم فیلتراسیون آب به منظور کنترل باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* داشت. با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد استفاده غیر مستقیم از ترکیبات نقره مورد مطالعه به صورت کاربرد در فیلترها از پتانسیل کافی در کاهش حدت و کنترل باکتری و پیشگیری از شیوع بیماری در سیستم پرورش قزل آلا برخوردار باشند. آگاهی از سایر تاثیرات جنبی اینگونه مواد بر روی آبزیان مستلزم انجام تحقیقات بیشتر است.

کلمات کلیدی: زئولیت نقره، قزل آلای رنگین کمان، استرپتوکوکوزیس، فیلتراسیون

مقدمه

امروزه صنعت آبزی پروری یکی از منابع مهم تأمین پروتئین در جهان محسوب می‌شود. در این خصوص پرورش ماهیان سردابی و به ویژه قزل آلای رنگین کمان *(Oncorhynchus mykiss)* از جایگاه خاصی برخوردار است. طبق آخرین آمار منتشر شده توسط سازمان خوار و بار و کشاورزی ملل متحد، در سال ۲۰۰۹ میزان تولید قزل آلای رنگین کمان بالغ بر ۷۳۶۴۲ تن بوده و ایران پس از ترکیه رتبه دوم جهان در تولید این ماهی در آب‌های شیرین را داشته است (۸). یقیناً پیشگیری از بیماری‌های آبزیان کلید موفقیت در صنعت آبزی پروری در آینده

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس
[۲] دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس E-mail: kalbassi_m@modares.ac.ir (نویسنده مسئول)
[۳] استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
[۴] دانشجوی دکترای تخصصی شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

www.SID.ir

Archive of SID

خواهد بود. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی شایع در اکثر مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان در سال‌های اخیر در بسیاری از کشورهای دنیا استرپتوکوکوزیس[1] گزارش شده است (۳). مطالعات متعددی در خصوص بیماری‌زایی، شناسایی و جداسازی بیماری از مزارع تکثیر و پرورش قزل آلای کشور انجام گرفته است (۱، ۲۶ و ۲۸) که بیانگر گسترش بیماری در مزارع قزل آلای کشور بوده و تا کنون موجب خسارات زیادی بر این صنعت گردیده است. به علاوه در این مطالعات گونه عمده درگیر در بروز استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل آلای ایران *استرپتوکوکوس اینیایی*[2] (۲۶) و لاکتوکوکوس گارویه[3] (۲۸) معرفی شده است.

به علت توسعه گونه‌های جدید باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و همچنین محدودیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، توسعه قابلیت‌های جدید برای محافظت در برابر باکتری‌ها نیازی ضروری است و استفاده از ترکیبات ضد میکروارگانیسم پایدار که باعث ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌ها نشود اجتناب‌ناپذیر است (۱۶، ۲۵ و ۳۳). در حال حاضر تحقیقات زیادی بر روی ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی و غیر آلی در حال انجام می‌باشد که در بین آنها نقره به دلیل پایداری بالا و طیف وسیع فعالیت ضدباکتریایی از مدت‌ها پیش مورد توجه بوده است (۷ و ۱۱).

زئولیت‌ها، آلومینوسیلیکات‌های سدیم هیدراته[4] هستند که به علت خواص فیزیکو شیمیایی بی‌نظیری همچون جذب گازها و عوامل سمی، خاصیت جابجایی یونی، غربال کنندگی مولکولی و خواص کاتالیتیک[5] (۶) به عنوان فیلترهای تصفیه آب بکار می‌روند (۱۸، ۳۲ و ۳۴). از طرفی زئولیت کشش قوی نسبت به یون نقره Ag^+ نشان می‌دهد و می‌تواند از طریق الکترواستاتیکی تا نزدیک به ۴۰٪ وزنی، یون نقره را در ساختار خود محصور نماید (۱۴ و ۳۰). زئولیتی که حاوی یون‌های نقره باشد (زئولیت نقره)، می‌تواند در ترکیب با انواع رزین‌ها و پلیمرهای مصنوعی و طبیعی فعالیت ضد باکتری و ضد قارچی از خود نشان دهد (۳۰ و ۳۱).

Kawahara و همکاران در سال ۲۰۰۰، باکتریایی زئولیت نقره را علیه باکتری‌های دهانی از جمله *Streptococcus mutans* و *Staphylococcus aureus* مورد بررسی قرار دادند. نتایج به دست آمده نشان داد که زئولیت نقره از رشد باکتری‌های مورد آزمایش تحت شرایط بی‌هوازی جلوگیری می‌کند و میزان MIC به دست آمده ۲۰۴۸-۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد (۱۴).

Inoue و همکاران در سال ۲۰۰۲، فعالیت ضد باکتریایی زئولیت نقره را در مقابل باکتری *E. coli* تحت شرایط هوازی مورد مطالعه قرار دادند و ثابت شد که فعالیت ضد باکتریایی یون Ag^+ تحت شرایط بدون اکسیژن قدرت کمتری نسبت به شرایط غنی از اکسیژن داشته است (۱۲). Matsumura و همکاران در سال ۲۰۰۳، در مطالعه‌ای به بررسی فعالیت ضد باکتریایی زئولیت نقره علیه باکتری *E. coli* پرداخته و به این نتیجه رسیدند که یون‌های نقره نقش مهمی را در فعالیت ضد باکتریایی زئولیت نقره ایفا می‌کنند (۱۷).

اگر چه مطالعات مختلفی وجود دارد که استفاده غیر مستقیم از ترکیبات نقره را به صورت فیلتر برای تصفیه آب پیشنهاد کرده‌اند (۲۴). اما در حال حاضر اطلاعات دقیقی در مورد تأثیرات ضد باکتریایی زئولیت نقره در پیشگیری یا درمان بیماری‌های آبزیان گزارش نشده است. بنابراین در مطالعه حاضر با هدف کنترل باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* امکان استفاده از زئولیت نقره در سیستم فیلتراسیون آب پرورش ماهی قزل آلای رنگین

1- Streptococosis
2- *Streptococcus iniaie*
3- *Lactococcus garvieae*
4- Hydrated sodium aluminosilicate
5- Catalytic

www.SID.ir

Archive of SID

کمان مورد مطالعه قرار گرفت. در این راستا سعی شده است تا به این فرضیه پاسخ داده شود که آیا استفاده از زئولیت نقره و همچنین فیلترهای حاوی گرانول یا الیاف زئولیت نقره در سیستم فیلتراسیون پرورش بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان منجر به کنترل باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* خواهد شد؟

مواد و روش کار

زئولیت نقره

پودر زئولیت نقره نوع AJ10N با نام تجاری زئومیک از شرکت ژاپنی سینانن[1] تهیه گردید. این ماده محتوی ۲/۵٪ وزنی یون نقره است که به طور الکترواستاتیک در ۸۴٪ وزنی زئولیت نوع A محصور شده و علاوه بر آن محتوی ۱۳/۵٪ وزنی فلز روی نیز می‌باشد. متوسط ابعاد زئولیت در این محصول ۲/۵ میکرومتر می‌باشد.

گرانول زئولیت نقره (زئومیک نوع BG02N)، با ابعاد ۲ تا ۵ میلی‌متر، از شرکت سینانن ژاپن تهیه گردید. این ماده متشکل از ۷۰٪ زئولیت نقره و ۳۰٪ رس (به عنوان بایندر) می‌باشد (میزان نهایی نقره برابر ۱/۷۵ درصد می‌باشد). الیاف زئولیت نقره از جنس پلیمر Polyamide و متشکل از ۵٪ زئولیت نقره (میزان نهایی نقره برابر ۰/۱۲۵ درصد) نیز از شرکت مذکور خریداری گردید (شکل ۱).

شکل ۱- تصویر الیاف زئولیت نقره (سمت راست) و گرانول زئولیت نقره (سمت چپ) مورد استفاده در سیستم فیلتراسیون آب.

باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*

استرپتوکوکوس‌ها باکتری‌های گرم مثبت کروی شکل با ضخامت کمتر از ۲ میکرون می‌باشند که در محیط‌های آبی به صورت دوتایی یا زنجیره‌ای دیده می‌شوند. انتقال آنها به صورت افقی و تماس مستقیم از ماهی مبتلا یا غذای آلوده صورت می‌گیرد (۱۵). استوک خالص باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* (با کد D) از گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید، که از تلفات ماهیان قزل آلای مزارع کشور جداسازی و شناسایی شده بود (۲۶). برای تهیه سوسپانسیون باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* به میزان لازم از پرگنه‌های باکتری روی محیط TSA حاوی ژلوز خوندار برداشته و به داخل یک لوله آزمایش محتوی بافر نمکی فسفات (PBS) (۷/۲ گرم Nacl، ۱/۴۸ گرم Na_2HPo_4، ۰/۴۳ گرم KH_2Po_4 در ۱ لیتر آب مقطر) منتقل و توسط شیکر یکنواخت گردید. سپس غلظت باکتری‌ها با محلول مک فارلند[2] ۱ (۰/۱ میلی‌لیتر $BaCl_2$ 1% ، ۹/۹ میلی‌لیتر H_2So_4 1%) تنظیم گردید تا تعداد ۳×۱۰^۸ سلول در میلی‌لیتر باکتری در سوسپانسیون مورد نظر موجود باشد.

1- Sinanen
2- Mac Farland Nephelometery Standards

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش‌های میکروبی

تعیین حداقل غلظت بازدارنده[1] زئولیت نقره (MIC)

برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده زئولیت نقره دوازده غلظت هندسی نزولی از زئولیت نقره شامل ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵،۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲،۷/۸۱، ۳/۹۰، ۱/۹۵ و ۰/۹۷ میکروگرم در میلی‌لیتر داخل لوله‌های آزمایش تهیه گردید. آنگاه ۱ میلی‌لیتر از محتویات هر کدام از لوله‌های آزمایش به شیشه‌های محتوی ۱۹ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیک سویا براث (TSB) اضافه شد. در مرحله بعد، از سوسپانسیون تهیه شده باکتری ۱۰ میکرولیتر به هر کدام از لوله‌های محتوی محیط کشت TSB و زئولیت نقره اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. پس از طی زمان ۲۴ ساعت با استفاده از میکروسمپلر، ۱۰ میکرولیتر از محتوی هر یک از شیشه‌ها برداشته و در مرکز پلیت‌های محتوی محیط کشت ژلوز خوندار اضافه و با استفاده از آنس کشت سطحی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار گرفت. محیط کشت فاقد زئولیت نقره نیز به عنوان شاهد آزمایش در نظر گرفته شد. همچنین تیمار کنترل منفی یعنی محیط کشت فاقد زئولیت نقره که بر روی آن کشتی انجام نگرفته بود آماده شد، تا از عدم حضور هر گونه میکروارگانیسم دیگری در شرایط آزمایش اطمینان حاصل گردد. رشد پرگنه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* در حضور زئولیت نقره با رشد آن در نمونه‌های شاهد مقایسه شد. غلظتی از زئولیت نقره که در آن هیچ‌گونه باکتری بر روی پلیت رشد نکرد به عنوان حداقل غلظت کشنده و غلظتی از زئولیت نقره که در آن بیش از ۹۰٪ باکتری‌ها در مقایسه با تیمار شاهد از بین رفتند، به عنوان حداقل غلظت بازدارنده زئولیت نقره مشخص شد (۲۷).

آزمایش آنتی‌بیوگرام روی پلیت[2]

برای انجام این آزمایش ابتدا میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* (حاوی 10^5 سلول در میلی‌لیتر) به محیط ژلوز خوندار تلقیح و کشت سطحی داده شد. سپس ۱ گرم از پودر زئولیت نقره در وسط پلیت‌های تلقیح شده با باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت کشت داخل انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اندازه ناحیه ممانعت از رشد باکتری اندازه‌گیری شد (۱۳).

آزمایش آنتی‌بیوگرام داخل لوله[3]

برای انجام این آزمایش ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* با تراکم 10^8 سلول در میلی‌لیتر داخل لوله‌های آزمایش محتوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته شد. پس از آن داخل هر لوله آزمایش ۱ گرم از پودر زئولیت نقره، اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر به خوبی مخلوط شد. در گروه شاهد نیز تمام شرایط یکسان بود و فقط پودر زئولیت نقره به لوله آزمایش اضافه نگردید. پس از انجام رقیق‌سازی به میزان ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های 10^{-1}، 10^{-3} و 10^{-5} برداشته و بر روی پلیت‌های محتوی محیط کشت ژلوز خوندار کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون صورت پذیرفت. پس از طی زمان انکوباسیون با بررسی میزان رشد باکتری بر روی پلیت، مشخص گردید که آیا پودر زئولیت نقره مورد استفاده قادر به ممانعت از رشد باکتری گردیده است یا خیر (۱۳).

مطالعات In vivo

پس از بررسی خواص ضد میکروبی زئولیت نقره در شرایط آزمایشگاهی، برخی روش‌های ممکن برای استفاده

1- Minimum inhibitory concentration
2- Zone of inhibition test
3- Test tube test

www.SID.ir

Archive of SID

غیر مستقیم از زئولیت نقره در مراحل پرورش بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان در کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان واقع در دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور با استفاده از فیلترهای تصفیه آب آکواریوم، پس از خارج نمودن فوم موجود در محفظه فیلترها، بسترهای مورد تحقیق در مقادیر زیر جایگزین فوم مذکور در فیلترها گردید:

۱- گرانول زئولیت نقره در مقادیر ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم در هر فیلتر.

۲- الیاف زئولیت نقره به میزان ۱۰۰ گرم در هر فیلتر.

۳- فیلترهای حاوی فوم معمولی (مرسوم در فیلترهای تصفیه آب آکواریوم) به عنوان تیمار شاهد.

برای شروع آزمایش در هر آکواریوم با حجم ۸۰ لیتر تعداد ۱۵ عدد بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان ۱۵-۱۰ گرمی قرار داده شد. پس از راه‌اندازی فیلترها آلوده‌سازی آب بوسیله باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* با تراکم 10^5 سلول در میلی‌لیتر انجام شد. در زمان‌های ۲، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از آلوده‌سازی، نمونه‌برداری از آب خروجی فیلترها انجام شد. برای انجام نمونه‌برداری در هریک از ساعت‌های مذکور از شیشه‌های ۵۰ میلی‌لیتری تیره رنگ که برای هر آکواریوم به صورت مجزا اختصاص داده شده بودند، استفاده گردید. بلافاصله پس از نمونه‌برداری، شیشه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شدند. برای شروع کشت نمونه‌های آب، ابتدا رقیق‌سازی متوالی انجام شد. به این ترتیب که ۱ میلی‌لیتر از نمونه آب مربوط به هر تیمار به ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک موجود در لوله آزمایش اول اضافه گردید. آنگاه ۱ میلی‌لیتر از لوله اول برداشته و به لوله دوم اضافه شد. این کار تا لوله آزمایش پنجم ادامه یافت و ۱ میلی‌لیتر انتهایی دور ریخته شد. به این ترتیب رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4} و 10^{-5}سلول در میلی‌لیتر تهیه گردید. پس از پایان رقیق‌سازی ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های 10^{-1}، 10^{-3} و 10^{-5} سلول در میلی‌لیتر بر روی محیط کشت ژل خون‌دار کشت داده شده و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (۲۶). پلیت‌ها در فواصل زمانی ۲۴ تا ۴۸ ساعت به طور مرتب جهت شمارش کلونی‌های باکتری بررسی شدند. برای سنجش کارایی هر یک از فیلترها علاوه بر کشت باکتری از نمونه آب، میزان مرگ و میر ماهیان و علایم ظاهری آنها نیز مورد بررسی قرار گرفت. در پایان دوره نیز برای بررسی رشد باکتری داخل اندام‌های ماهی (کلیه و طحال)، از هر یک از تیمارها به طور تصادفی ۳ ماهی انتخاب شده و کشت اندام‌های مذکور انجام شد. برای این منظور ابتدا سطح خارجی بدن هر ماهی به طور کامل با الکل استریل گردید. سپس توسط قیچی‌های استریل مجزا، یک برش طولی و یک برش عرضی از انتهای باله مخرجی هر ماهی داده شد تا امعاء و احشاء آن قابل رؤیت گردد. آنگاه توسط آنس استریل از کلیه و طحال هر ماهی یک تکه برداشته و روی پلیت‌های محتوی محیط کشت ژل خون‌دار کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفت. پس از طی ۲۴ ساعت پلیت‌ها جهت شمارش کلونی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت بررسی شدند و نتایج حاصله ثبت شد (۲).

تجزیه و تحلیل آماری

پراکنش طبیعی داده‌های حاصل از این تحقیق با آزمون کولموگروف- اسمیرنوف پردازش گردید. پردازش آماری نتایج حاصله شامل میزان رشد باکتری در آزمایش تعیین حداقل غلظت بازدارنده، بررسی تأثیر نوع بستر زئومیکی (گرانول یا الیاف) و مقایسه کارایی فیلترها توسط نرم‌افزار SPSS ۱۳/۲ و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام پذیرفت. مقایسه میانگین‌ها در سطح ۹۵٪ انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

آزمایش‌های میکروبی

نتایج آزمایش‌های مربوط به تعیین حداقل غلظت بازدارنده زئولیت نقره بر روی باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در جدول ۱ نشان داده شده است. رشد باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زئولیت نقره به طور کامل متوقف شد. تفاوت معنی‌داری در رشد باکتری در غلظت‌های ۰/۹۷ تا ۶۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر زئولیت نقره مشاهده نشد ($P\geq 0/05$) و پس از ۲۴ ساعت تمام سطح پلیت توسط باکتری پوشیده شد. اما از غلظت ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر زئولیت نقره، رشد باکتری نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری پیدا کرد و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر زئولیت نقره، هیچ رشدی مشاهده نگردید ($P<0/05$). بنابر نتایج حاصله حداقل غلظت بازدارنده زئولیت نقره در مورد کشت آزمایشگاهی باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد (در این غلظت میزان رشد باکتری نسبت به تیمار شاهد به میزان ۹۰٪ کاهش پیدا کرد). همچنین حداقل غلظت کشنده زئولیت نقره در مورد کشت آزمایشگاهی باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*، ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد (میزان رشد باکتری در این دوز به صفر رسید).

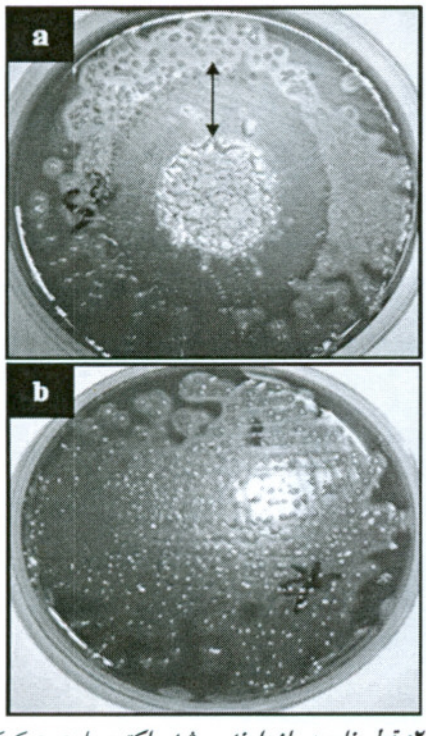
در مورد نتایج آزمایش آنتی‌بیوگرام داخل لوله نیز پس از یک تماس ۱۰ دقیقه‌ای باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* با زئولیت نقره، هیچ باکتری در آب تیمار شده با این ترکیب مشاهده نشد و رشد باکتری به طور کامل متوقف شد. قطر ناحیه بازدارنده[1] مربوط به پودر زئولیت نقره ۱۹/۳۳ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (شکل ۲).

جدول ۱: میزان رشد باکتری** استرپتوکوکوس اینیایی **بر روی محیط کشت ژل خون‌دار در حضور غلظت‌های مختلف زئولیت نقره در آزمایش تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)

غلظت زئولیت نقره (میکروگرم در میلی‌لیتر)	تعداد اولیه باکتری (سلول در میلی‌لیتر)	تعداد باکتری شمارش شده (سلول در میلی‌لیتر) پس از ۲۴ ساعت
۱۲۵	$3\times10^{8}\pm 0/002^{a}$	$2/7\times10^{4}\pm0/03^{*b}$
۲۵۰	$3\times10^{8}\pm0/002^{a}$	$2\times10^{2}\pm0/001^{c}$
۵۰۰	$3\times10^{8}\pm0/002^{a}$	0 ± 0^{d}
۱۰۰۰	$3\times10^{8}\pm0/002^{a}$	0 ± 0^{d}
۲۰۰۰	$3\times10^{8}\pm0/002^{a}$	0 ± 0^{d}

*میانگین ۳ تکرار با انحراف معیار

حروف کوچک (a,b,...) برای مقایسه میزان رشد باکتری در غلظت‌های مختلف زئولیت نقره می‌باشد.



شکل ۲: قطر ناحیه بازدارنده رشد باکتری** استرپتوکوکوس اینیایی **بر روی محیط کشت ژلوز خوندار در تیمار پودر زئولیت نقره (a)، گروه شاهد (b). علامت ⟷ نشان‌دهنده میزان قطر ناحیه بازدارندگی می‌باشد.

1- Diameter of inhibition zone

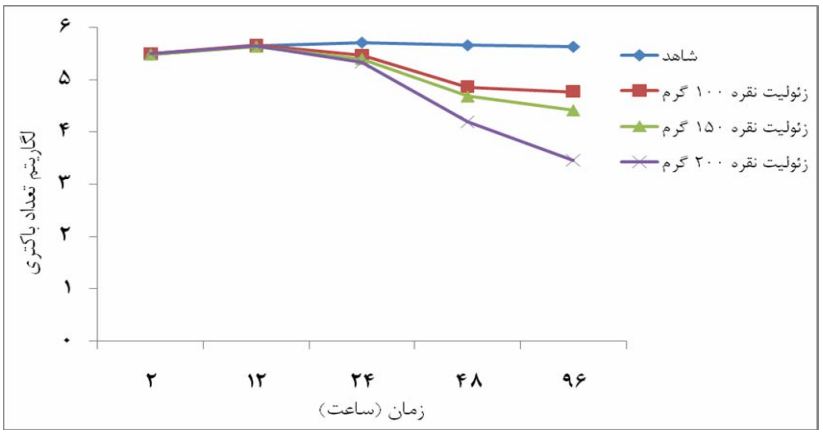
www.SID.ir

Archive of SID

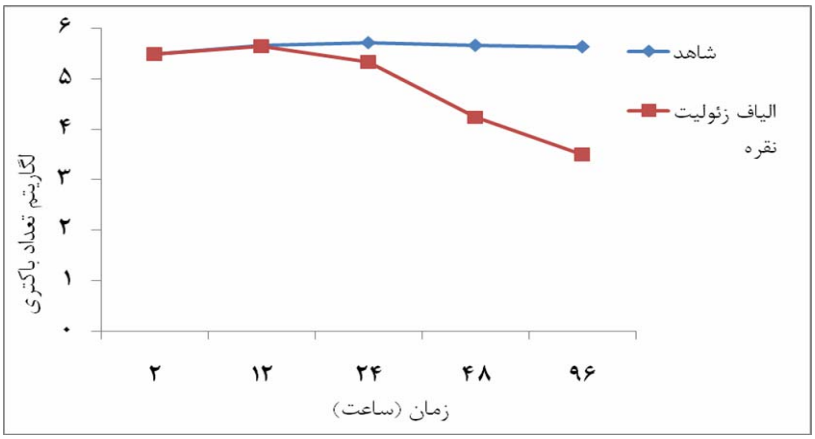
مطالعات In vivo

در شکل ۳ تغییرات تعداد سلول باکتری طی زمان‌های مختلف نمونه‌برداری در تیمارهای محتوی گرانول زئولیت نقره آورده شده است. روند تغییرات تعداد سلول باکتری تا ساعت ۱۲ افزایشی بوده و پس از آن تا انتهای دوره آزمایش به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است ($P<0/05$). مقایسه بین تیمار شاهد و تیمارهای محتوی گرانول زئولیت نقره اختلاف معنی‌داری را در تعداد سلول باکتری در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ نشان داد. نتایج به دست آمده مشخص کرد که تیمار محتوی ۲۰۰ گرم گرانول زئولیت نقره در مقایسه با تیمارهای محتوی ۱۰۰ و ۱۵۰ گرم گرانول زئولیت نقره بالاترین تأثیر را در حذف باکتری از آب داشته است.

نتایج به دست آمده از شمارش باکتری در آب در تیمار الیاف زئولیت نقره نیز مشخص کرد که رشد باکتری در این تیمار از ساعت ۲ تا ساعت ۱۲ روندی افزایشی داشته است. اما پس از آن تا انتهای دوره آزمایش به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است (شکل ۴).



شکل ۳: روند رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در تیمارهای مختلف گرانول زئولیت نقره طی دوره ۹۶ ساعته نمونه برداری.



شکل ۴- روند رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در تیمار الیاف زئولیت نقره در طی دوره ۹۶ ساعته نمونه‌برداری.

www.SID.ir

Archive of SID

تلفات در طول دوره پرورشی تا روز ۱۴ شمارش و ثبت گردید. درصد تلفات در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲: درصد تلفات ناشی از آلوده‌سازی با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در تیمارهای مختلف

تیمارها	درصد تلفات
گروه شاهد (فوم معمولی فاقد زئولیت نقره)	۹۳/۳۳ ± ۶/۶۷^{ab}
گرانول زئولیت نقره ۱۰۰ گرم	۲۷ ± ۴/۳۳^{e}
گرانول زئولیت نقره ۱۵۰ گرم	۲۹/۸ ± ۵/۱۶^{de}
گرانول زئولیت نقره ۲۰۰ گرم	۴۰ ± ۶/۶۶^{d}
الیاف زئولیت نقره	۰ ± ۰^{f}

*میانگین ۳ تکرار با انحراف معیار

حروف کوچک (a,b,...) برای مقایسه تعداد تلفات در تیمارهای مختلف در طول دوره می‌باشد.

بحث

هدف اصلی از انجام تحقیق حاضر بررسی عملکرد فیلترهای محتوی زئولیت نقره در کنترل باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در سیستم پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان بود. مطالعات متعدد بیانگر گسترش بیماری استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل آلای کشور است که تا کنون موجب وارد آمدن خساراتی بر این صنعت گردیده است. از طرفی مطالعات گسترده‌ای در زمینه بررسی خواص ضد میکروبی ترکیبات نقره انجام شده، که همگی بیانگر مؤثر بودن این ترکیبات برای از بین بردن باکتری‌های مختلف است (۱۱ و ۲۱).

مطالعات اندکی وجود دارد که استفاده غیر مستقیم از ترکیبات نقره را جهت کنترل میکروب‌ها به صورت فیلتر برای تصفیه آب آشامیدنی پیشنهاد کرده‌اند. همچنین پژوهشگران زیادی در مطالعات خود بر تأثیرگذاری زئولیت نقره به عنوان یک عامل ضد باکتریایی بر روی گونه‌های باکتریایی مختلف در شرایط آزمایشگاهی تأکید کردند (۵، ۱۲، ۱۴، ۱۷، ۲۲ و ۲۹). لیکن تا به امروز در خصوص تأثیر فیلترهای حاوی ترکیبات نقره بر کنترل عوامل میکروبی در سیستم‌های پرورش آبزیان گزارشی مشاهده نگردیده است. بنابراین در مطالعه حاضر، برای اولین بار به بررسی اثر ضد باکتریایی فیلترهای حاوی زئولیت نقره در یکی از سیستم‌های پرورش آبزیان پرداخته شد.

تناقضات زیادی درباره کارایی ضد میکروبی نقره در مطالعات مختلف وجود دارد. در بعضی از مطالعات بیان شده است که سطوح پایین‌تر نقره فعالیت باکتری کشندگی سریع‌تر دارند (۲۰)؛ در حالی که این دیدگاه با دیگر منابع موجود ممکن است در تناقض باشد (۱۴). برای حل این تناقضات توجه به گونه‌های مختلف یک عامل بیماری‌زا می‌تواند مفید باشد. مطالعات مختلف حاکی از آن است که میزان MIC زئولیت نقره بین گونه‌های مختلف استرپتوکوکوس متفاوت بوده است (۱۴) و مؤید این نکته می‌باشد که گونه‌های مختلف از یک جنس باکتری دارای ویژگی‌های خاص مربوط به خودشان بوده و میزان حساسیت آنها نسبت به عوامل ضد باکتریایی و به خصوص زئولیت نقره در این آزمایش متفاوت می‌باشد (۴ و ۱۰).

بنابر نتایج به دست آمده از شمارش باکتری در آب در تیمارهای زئولیت نقره مشخص شد که رشد باکتری در این تیمارها از ساعت ۲ تا ساعت ۱۲ روندی افزایشی داشته است. احتمالاً این روند افزایشی نشان می‌دهد که باکتری پس از حضور در آب تا ساعت ۱۲ توانسته است توانایی تکثیر و زنده‌مانی خود را حفظ کند. علت احتمالی این موضوع این است که در فاصله زمانی ۱۲ ساعت اولیه پس از تلقیح باکتری به علت عدم رهاسازی و تأثیر مستقیم یون نقره بر سلول‌های باکتریایی، این سلول‌ها قابلیت تکثیر را داشته‌اند؛ اما پس از رهاسازی یون‌های نقره از فیلتر مدیاها و تأثیر بر سلول‌های باکتریایی مانع از تکثیر باکتری شده و حتی موجب مرگ و میر سلول‌ها و در نتیجه کاهش رشد آنها شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

در این مطالعه بررسی نتایج به دست آمده از شمارش باکتری در تیمارهای محتوی گرانول زئولیت نقره نشان داد که با افزایش میزان استفاده از زئولیت نقره مورد استفاده در فیلترها، تأثیر ضد باکتریایی آنها نیز افزایش یافته است. به طوری که فیلترهای محتوی ۲۰۰ گرم گرانول زئولیت نقره نسبت به فیلترهای محتوی ۱۰۰ و ۱۵۰ گرم بالاترین تأثیر را در کاهش باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* داشتند.

نکته قابل توجه در ارتباط با استفاده از گرانول زئولیت نقره در سیستم فیلتراسیون آب، کدر شدن آب پس از ۵-۴ روز استفاده از آن در فیلتر می‌باشد، این عامل کدورت که ناشی از رس موجود در گرانول زئولیت نقره می‌باشد، می‌تواند بر روی آبشش ماهی‌ها و در نتیجه تنفس آنها تأثیر منفی گذاشته و در نهایت باعث افزایش تلفات در ماهی‌ها شود. بررسی تلفات ماهی‌ها در این تیمار نیز بیانگر این نکته بوده و میزان تلفات در تیمار محتوی ۲۰۰ گرم گرانول زئولیت نقره تا انتهای دوره به ۴۰ درصد رسید. بنابراین علی‌رغم کنترل رشد باکتری‌ها، استفاده از گرانول زئولیت نقره در سیستم‌های پرورش آبزیان قابل توصیه نمی‌باشد. الیاف زئولیت نقره در این تحقیق از نظر کاهش میزان باکتری، نتیجه‌ای مشابه با گرانول ۲۰۰ گرم نشان داد و میزان کاهش باکتری در این دو فیلتر از اختلاف معنی‌داری برخوردار نبود. اما در مقایسه با گرانول زئولیت نقره، نکته حائز اهمیت عدم کدر شدن آب در نتیجه استفاده از این الیاف در فیلترهای تصفیه آب می‌باشد. همچنین میزان تلفات در این تیمار در طول دوره ۱۴ روزه آزمایش صفر بود. در حالی که در تیمار شاهد بیش از ۹۰٪ ماهی‌ها تلف شدند. کشت کلیه و طحال ماهی‌ها در تیمارهای محتوی زئولیت نقره در انتهای دوره آزمایش نشان داد که باکتری نتوانسته است بدن ماهی‌های سالم را آلوده کند؛ در حالی که در تیمار شاهد رشد پرگنه‌های باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در کشت کلیه و طحال آنها، حاکی از آلوده شدن ماهی‌ها با باکتری مذکور بود. در نتیجه استفاده از الیاف زئولیت نقره در سیستم فیلتراسیون آب پرورش بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان نتیجه خیلی بهتری نسبت به گرانول زئولیت نقره داشته است.

محققین مختلف تلاش کرده‌اند که نحوه اثر نقره بر باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها را شرح دهند، اما هنوز مکانیسم واقعی عملکرد نقره بر میکروب‌ها به خوبی شناخته نشده است؛ به طور کلی اعتقاد بر این است که مکانیسم احتمالی عملکرد نقره فلزی و یون نقره، بر اساس ایجاد تغییر در شکل و ساختار سلول باکتری‌ها است. بر اساس مطالعات انجام شده عناصر سنگین از طریق اتصال به گروه‌های سولفیدریل (SH-) آنزیم‌های تنفسی، با پروتئین‌ها واکنش می‌دهند و منجر به غیر فعال شدن آنها می‌شوند (۹ و ۲۳). همچنین یون نقره می‌تواند بر ملکول DNA تأثیر گذاشته و باعث اختلال در فرآیند رونویسی DNA شود (۹، ۱۷، ۱۹ و ۲۳).

از دیگر نکات قابل بحث در این مطالعه استفاده غیر مستقیم از زئولیت نقره بود، که به دلیل اثرات سوء شناخته شده ترکیبات نقره بر آبزیان و محیط زیست، در این مطالعه با استفاده از فیلترهای حاوی این مواد سعی گردید که به صورت غیر مستقیم از خاصیت ضد میکروارگانیسمی آنها استفاده شود. اگرچه تعیین میزان رهایش نقره از فیلترها جزء اهداف بررسی حاضر نبوده است، ولی مطمئناً می‌تواند به عنوان عاملی تعیین کننده و تصمیم‌ساز در رابطه با استفاده یا عدم استفاده از ترکیبات نقره در بحث بهداشت و بیماری‌های آبزیان مورد توجه قرار گیرد. بنابراین لازم است که طراحی و ساخت فیلترها و ادوات محتوی ترکیبات نقره به گونه‌ای صورت گیرد که دارای حداقل رهایش به محیط باشند.

در جمع‌بندی نهایی مطالب مذکور مؤید آن می‌باشد که استفاده از زئولیت نقره در فیلترهای تصفیه آب پرورشی می‌تواند منجر به کاهش معنی‌دار باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در آب و جلوگیری از بروز بیماری در ماهی قزل آلای رنگین کمان شود. با توجه به نتایج حاصله از این تحقیق مشخص شد که استفاده از زئولیت نقره به صورت

www.SID.ir

Archive of SID

الیاف در مقایسه با گرانول کارایی بالاتری برای استفاده در سیستم فیلتراسیون آب به منظور کنترل باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* خواهد داشت. این تحقیق می‌تواند به عنوان مطالعه‌ای پایه در راستای استفاده از روشی جدید در کنترل باکتری‌های موجود در سیستم‌های پرورشی آبزیان مؤثر باشد و توسعه این گونه فیلترها می‌تواند به عدم استفاده از داروهای شیمیایی در کنترل بیماری‌های عفونی آبزیان در آینده منجر گردد.

منابع

۱- اخلاقی مصطفی و کشاورز محترم (۱۳۸۱). وقوع استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل آلای استان فارس. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره سوم، شماره ۲، صفحات ۱۸۹-۱۸۳.

۲- سلطانی محمد (۱۳۸۰). بیماری‌های آزاد ماهیان. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ۴۴۴.

3- Austin B., Austin D.A., (2007). Bacterial fish pathogens. Disease in farmed and wild fish. Ellis Harwood, chichester. PP 56-63, 284-287.

4- Brett D.W. (2006). A discussion of silver as an antimicrobial agent: alleviating the confusion. Ostomy Wound Management, (52): 34-41.

5- Bright K.R., Gebra C.P. and Rusin P.A. (2002). Rapid reduction of *Staphylococcus aureus* populations on stainless steel surfaces by zeolite ceramic coatings containing silver and zinc ions. Journal of Hospital Infection, (52): 307-309.

6- Cerri G., Gennaro M., Bonferoni M.C. and Caramella C. (2004). Zeolites in biomedical application: Zn-exchanged clinoptilolite-rich rock as active carrier for antibiotics in anti-acne topical therapy. Applied Clay Science, (27): 141-150.

7- Cho K.H., Park J.E., Osaka T. and Park S.G. (2005). The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochemical Acta, 51: 956- 960.

8- FAO (2008). The state of world fisheries and aquaculture. Rome, Italy. pp 14-17.

9- Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomedical Materials Research, 52: 662–668.

10- Findik D., Tuncer I., Mahmuriye M. and Atademir S. (2002). Nosocomial fungal infections in a teaching hospital in Turkey, identification of the pathogens and their antifungal susceptibility patterns. Turkish Journal of Medical Sciences, 32(1): 35-38.

11- Gong P., Li H., He X., Wang K., Hu J., Tan W. and et al. (2007). Preparation and antibacterial activity of Fe_3O_4 Ag nanoparticles. Nanotechnology, 18: 604–611.

12- Inoue Y., Hoshino M., Takahashi H., Noguchi T., Murata T., Kanzaki Y. and et al. (2002). Bactericidal activity of Ag-zeolite by reactive oxygen species under aerated conditions. Journal of Inorganic Biochemistry, 92: 37-42.

13- Jain P. and Pradeep T. (2005). Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. Biotechnology and Bioengineering, 90: 59–63.

14- Kawahara K., Tsuruda K., Morishita M. and Uchida M. (2000). Antibacterial effect of silver–zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions Dental Materials, 16: 452-455.

15- Kususda R. and Salati F. (1999). *Entrococcus seriolicida* and *streptococcus iniae*. In: (eds.P.T.K. Woo and D.W. Bruno) Fish diseases and disorders: viral, bacterial and fungal infections, CAB International, pp 455-471.

16- Lara H.H., Ayala-Nunez N.V., Turrent L.C.I. and Padilla C.R. (2009). Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26: 615-621.

17- Matsumura Y., Yoshikata K., Kunisaki S. and Tsuchido T. (2003). Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate, Applied and Invironmental Microbiology. 69: 4278-4281.

18- Metes A., Kovacevic D., Vujevic D. and Papic S. (2004). The role of zeolites in wastewater treatment of printing inks, Water Research, 38: 3373-81.

19- Monteiro D.R., Gorup L.F., Takamiya A.S., Ruvollo-Filho A.C., Camargo E.R. and Barbosa D.B. (2009). The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. International Journal of Antimicrobial Agents, 34: 103-110.

www.SID.ir

Archive of SID

20- Ovington L.G. (2001). The role of silver technology in wound healing, part 2: why is nanocrystalline silver superior? Wounds, 13: 5–10

21- Rai M., Yadav A. and Gade A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances, 27: 76- 83.

22- Rivera-Garza M., Olguin M.T., Garcia-Sosa I., Alcantara D. and Rodriguez-Fuentes G. (2000). Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material. Microporous and Mesoporous Materials, 39: 431-444.

23- Sanpui P., Murugadoss A., Prasad P.V.D., Ghosh S.S. and Chattopadhyay A. (2008). The antibacterial properties of a novel chitosan–Ag-nanoparticle composite. International Journal of Food Microbiology, 124: 142-146.

24- Sharma Y.K., Yngard R.A. and Lin Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. Adv. Colloid Interface Science, 145: 83-96.

25- Singh M., Singh Sh., Prasad S. and Gambhir I.S. (2008). Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 3: 115-122.

26- Soltani M., Jamshidi Sh. and Sharifpour I. (2005). Streptococcosis caused by Streptococcus iniaie in farmed rainbow trout (*O. mykiss*) in Iran: biophysical characteristic and pathogenesis. Bulletin European Association Fish pathologists, (25): 95-107.

27- Soltani M., Ghodratnema M., Ahari H, Ebrahimzadeh Mousavi H.A., Atee M., Dastmalchi F. and et al. (2009). The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish pathogens, *streptococcus iniae*, *lactococcus garvieae*, *yersinia ruckeri* and *aeromonas hydrophila*. International Journal of Veterinary Research, 3: 137-142.

28- Soltani M., Nikbakht G., Ebrahimzadeh Moussavi H.A. and Ahmadzadeh N. (2008). Epizootic outbreak of lactococcosis caused by *lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bulletin of European Association of Fish Pathologists 28: 209-214.

29- Top A. and Ülkü S. (2004). Silver, zinc, and copper exchange in a Na-clinoptilolite and resulting effect on antibacterial activity. Applied Clay Science, 27: 13– 19.

30- Uchida M. (1995). Antimicrobial zeolite and its application. Chemical Industries, 46: 48–54.

31- Uchida M., Maru N., Furuhata M., Fujino A., Muramoto S., Ishibashi A. and et al. (1992). Anti-bacterial zeolite balloon catheter and its potential for urinary tract infection control. Acta Urologica Japonica, 38: 973– 978.

32- Widiastuti N., Wu H., Ang M. and Zhang D.K. (2008). the potential application of natural zeolite for greywater treatment. Desalination, 218: 271-280.

33- Wright G.D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Advanced Drug Delivery Reviews, 57: 1451-70.

34- Xiubin H. and Zhanbin H. (2001). Zeolite application for enhancing water infiltration and retention in loess soil. Resources, Conservation and Recycling, 34: 45-52.

www.SID.ir