



ارزیابی عملکرد فیلتر ضدباکتریایی Zeolite-PEI در مخازن پرورش پست لارو میگوی بزرگ آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*)

مصطفی علی شیری^۱، علیرضا میرواقفی^{۲*}، کامران رضایی توابع^۳

۱. دانش آموخته دکتری، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۳

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۹/۰۸

چکیده

استفاده از موادی مؤثر به منظور مهار باکتری‌ها در محیط آبی به دلیل استفاده بی‌رویه و طولانی مدت از مواد ضدباکتریایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری به نظر می‌رسد. پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI) یک پلیمر مصنوعی با خاصیت ضدباکتریایی و با فرمول شیمیایی $(C_2H_5N)_n$ شامل تعداد زیادی گروه‌های جانبی NH_2 است و استفاده از این پلیمر در سطوح مختلف به منظور استفاده از خاصیت آنتی‌باکتریایی می‌تواند مورد نظر باشد: از جمله این سطوح که کاربرد زیادی در آبی‌پروری دارد، زئولیت است. در این پژوهش، زئولیت با دو غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر پلیمر PEI پوشش داده شد و پس از تأیید به‌وسیله آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، درون فیلترها قرار داده شد و با سنجش بار باکتریایی آب مخازن و همچنین تأثیر بر بازماندگی و رشد پست‌لاروها، عملکرد فیلترها مشخص شد. نتایج نشان داد که کنترل منفی، تیمار زئولیت اصلاح‌شده با غلظت I، تیمار زئولیت اصلاح‌شده با غلظت II پلیمر PEI، تیمار زئولیت طبیعی و کنترل مثبت در بار باکتریایی 10^4 CFU/ml آئروموناس هیدروفیلا و در روز دهم آزمایش به ترتیب ۵۰، ۱۲۵، ۱۲۵، ۳۴۸ و ۳۸۰ colony/ml در محیط کشت TSI رشد کرد که نشان‌دهنده کاهش ۶۷/۱ درصد بار باکتریایی در هر دو تیمار اصلاح‌شده با غلظت I و II پلیمر PEI نسبت به کنترل مثبت است. همچنین میزان بقا پست‌لاروها در تیمار زئولیت اصلاح‌شده با غلظت I و II نسبت به کنترل منفی افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$). هر چند در سنجش وزن خشک و طول پست‌لاروها هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها دیده نشد ($P > 0.05$). در نهایت پس از جمع‌بندی و مقایسه نتایج این پژوهش با سایر پژوهش‌ها می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از زئولیت پوشش داده شده با پلیمر PEI در سیستم فیلتراسیون مخازن پرورش پست لارو میگوی بزرگ آب شیرین تأثیر بالقوه‌ای در کاهش بارباکتریایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا دارد.

واژگان کلیدی: اصلاح زئولیت، آئروموناس هیدروفیلا، پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI)



Performance of Zeolite-PEI antibacterial filter in breeding tanks of Giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*

Mostafa Alishiri¹, Alireza Mirvaghti^{2*}, Kamran Rezaei Tavabeh³

1. Ph. D Graduate., Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: 29-Nov-2021

Accepted: 4-Dec-2022

Abstract

Use of effective substances to inhibit bacteria in the aquatic environment due to indiscriminate and long-term use of antibacterial substances such as antibiotics seems to be necessary. Polyethyleneimine (PEI) is a synthetic polymer with antibacterial properties and chemical formula $(C_2H_5N)_n$ which consists of many side groups of NH_2 , the use of this polymer due to its antibacterial property in binding with different substrates can be considered. Among these substrates that are widely used in aquaculture is Zeolite. In this study, zeolite was coated with PEI polymer with two concentrations of 1 and 2 mg/l and after confirmation by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis is placed inside the filters. The function of the filters was determined by measuring the bacterial load of the water, survival and growth of post larvae. The results showed that negative control, treatment of zeolite modified with concentration I, treatment of zeolite modified with concentration II of PEI polymer, treatment of natural zeolite and positive control at 10^4 CFU/ml *Aeromonas hydrophila* bacteria on the 10 days of the experiment were grew 50, 125, 125, 348 and 380 colony/100 ml in TSI medium, which shows a decrease of 67.1% of the bacterial load in both modified treatments with concentrations I and II of PEI polymer compared to the positive control. Also, the survival rate of postlarvae showed a significant increase in the treatment of modified zeolite with concentration I and II compared to the negative control ($P < 0.05$). However, there was no significant difference between treatments in dry weight and length ($P > 0.05$). Finally, after summarizing and comparing the results of this study with others, it can be concluded that the use of zeolite modified with PEI polymer in the filtration system of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larval rearing tanks has a potential effect on bacterial reduction of *Aeromonas hydrophila* bacteria.

Keywords: Zeolite modification, *Aeromonas hydrophila*, Polyethylene imine (PEI)

۱. مقدمه

بستگی دارد (John et al., 2011). در پژوهش‌های صورت گرفته خاصیت ضد میکروبی این پلیمر برای باکتری‌های *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* (Milovic et al., 2005) و همچنین برای باکتری‌های *Acinetobacter baumannii* و *Staphylococcus epidermidis* به اثبات رسیده است (Azevedo et al., 2014). این پلیمر به تنهایی در آب می‌تواند برای آبیان سمیت ایجاد کند بنابراین استفاده از این پلیمر در سطوح مختلف به منظور استفاده از خاصیت آنتی‌باکتریایی آن می‌تواند مورد نظر باشد. از جمله این سطوح که کاربرد زیادی در آبی‌پروری دارد، زئولیت است که در بخش‌های متعددی شامل آکواریوم‌ها، مخازن نگهداری ماهی، سیستم‌های مدار بسته پرورشی و مخازن حمل و نقل آبیان کاربرد دارد (Boyd and Tucker, 1998). بنابراین این پژوهش، با هدف بررسی پوشش سطحی پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI) در سطح زئولیت طبیعی (کلینوپتیلولیت) به عنوان بخشی از سیستم فیلتراسیون آب مخزن نگهداری پست‌لارو میگوی بزرگ آب شیرین (*M. rosenbergii*) به اجرا درآمد و خاصیت آنتی‌باکتریایی آن علیه باکتری ائروموناس هیدروفیلا و شاخص رشد و بقا پست‌لارو میگوی بزرگ آب شیرین نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. مواد مورد استفاده پژوهش

زئولیت مورد استفاده در پژوهش از نوع کلینوپتیلولیت بود. پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI, MW= 2000) و ماده شیمیایی [۲ و ۳ اپوکسی پروپوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان ۹۸٪]،^۱ (EPO, 98% purity) از شرکت سیگما آلد ریچ (St. Louis, MO, USA) همچنین تولوئن مورد نیاز از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) و محیط کشت TSA و TSA از کمپانی (Quelab, Canada) تهیه گردید. PL₁₂ میگوی آب شیرین از مرکز تکثیر قصر

استفاده بی‌رویه و طولانی مدت از مواد ضدباکتریایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و حضور این مواد در محیط زیست و به دنبال آن مقاوم شدن برخی از گونه‌های باکتری به خصوص باکتری‌های گرم منفی یک مشکل اساسی محسوب می‌شود (Matyar et al., 2004). بنابراین استفاده از موادی غیر آنتی‌بیوتیکی و مؤثر به منظور مهار باکتری‌ها در محیط آب ضروری به نظر می‌رسد (Rai et al., 2009). باکتری ائروموناس هیدروفیلا یک باکتری بیماری‌زا هتروتروف، گرم منفی، تاژک‌دار، میله‌ای و متحرک است و به طور عمده در مناطقی با آب و هوای گرم یافت می‌شود. این باکتری در آب‌های شیرین و لب شور و در محیط‌های هوازی و غیرهوازی قادر به زندگی است و از طریق آب نیز منتقل می‌شود (Adanir and Turutoglu, 2007).

میگوی بزرگ آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) با توجه به رشد سریع، قابلیت تکثیر در مراکز تکثیر مصنوعی، قابلیت پرورش در سیستم‌های مختلف پرورشی، بازارپسندی مطلوب و سازگاری به شرایط مختلف محیطی، به عنوان یک گونه مناسب در تکثیر و پرورش آبیان مطرح است. امروزه این میگو در بیشتر مناطق جهان تکثیر و پرورش آن توسعه یافته است (New and valenti, 2009). بنابراین، مطالعه کنترل بیماری‌ها در پست‌لارو این گونه که در مراحل اولیه زندگی نیز حساسیت بیشتری به پاتوژن‌ها دارد، حائز اهمیت است.

پلی‌اتیلن‌ایمین^۱ (PEI) یک پلیمر مصنوعی با فرمول شیمیایی $(C_2H_5N)_n$ متشکل از تعداد زیادی گروه‌های جانبی NH_2 است (Timofeeva and Kleshcheva, 2011). گزارش‌های متعددی مبنی بر دارا بودن خاصیت ضد میکروبی این پلیمر وجود دارد (Lin et al., 2002). این خاصیت به ویژگی‌های متعددی مانند بار سطحی، طول و تراکم زنجیره پلیمری و طول زنجیره‌های جانبی

¹ Polyethylene imine

² 2,3 Epoxypropoxy propyl trimethoxysilane

برای پوشش سطح زئولیت‌ها با غلظت I به‌ازای هر ۱۵ گرم زئولیت فعال شده ۳۰ میلی‌لیتر تولوئن با ۱ میلی‌لیتر از ماده شیمیایی [۲] و ۳ اپوکسی پروپوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان ۹۸٪] (EPO, 98% purity) و ۱ میلی‌لیتر از پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI, MW= 2000) و برای پوشش سطح زئولیت‌ها با غلظت II به‌ازای هر ۱۵ گرم زئولیت فعال شده ۳۰ میلی‌لیتر تولوئن با ۲ میلی‌لیتر از EPO و ۲ میلی‌لیتر از PEI با هم ترکیب و به مدت ۳۶ ساعت در دمای $80 \pm 3^\circ\text{C}$ درجه سانتی‌گراد در ارلن داری مبرد به وسیله مگنت مغناطیسی همزده شد تا با تشکیل پیوند کوالانسی بین دو ترکیب EPO و PEI عامل مورد نظر ایجاد شود. بعد از تشکیل پیوند کوالانسی بین دو ترکیب فوق، ۱۵g گرم زئولیت خشک و فعال شده به‌ازای هر ۳۰ میلی‌لیتر تولوئن درون ارلن مجهز به مبرد ریخته شد و برای ۲۴ ساعت در دمای $80 \pm 3^\circ\text{C}$ درجه سانتی‌گراد با کمک مگنت همزده شد. این کار باعث می‌شود دو ماده ترکیب شده EPO و PEI با تشکیل پیوند کوالانسی به‌وسیله گروه OH به سطح زئولیت فعال متصل شوند. پس از ۲۴ ساعت زئولیت پوشش داده شده ۳ مرتبه با تولوئن و ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو و به مدت ۲ ساعت در 60°C درجه سانتی‌گراد خشک شد (Khoobi et al., 2014). در نهایت از سطح زئولیت اصلاح شده با استفاده از تصویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) براساس شکل ۱، تصویربرداری شد.

شیرین استان کرمان‌شاه تهیه شد و به کارگاه بهداشت گروه شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انتقال داده شد. در طول حمل و نقل دما به کمک یخ ثابت و در $25 \pm 2^\circ\text{C}$ نگه داشته شد. همچنین برای انجام آزمایش به هر مخزن ۱۰۰ قطعه پست‌لارو (PL_{۱۲}) اضافه شد.

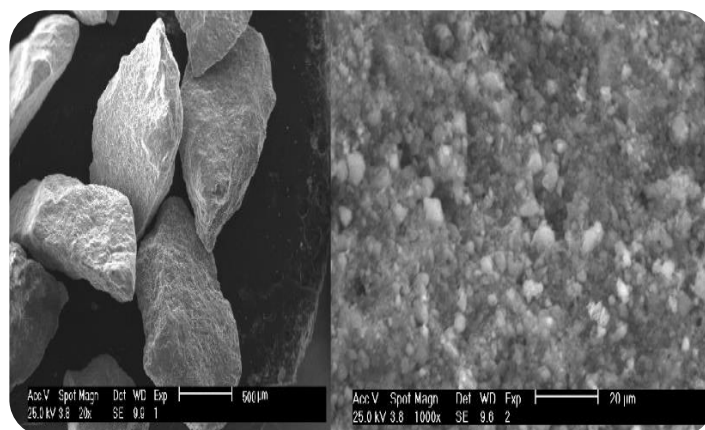
۲.۲. پوشش سطحی زئولیت

۱.۲.۲. فعال‌سازی سطح زئولیت

جهت فعال‌سازی سطحی، ابتدا زئولیت‌ها به قطعات کوچکتر تبدیل و از دو الک با قطر چشمه ۰/۹ و ۱ میلی‌متر عبور داده شدند تا زئولیت‌هایی با ابعاد ۰/۹ تا ۱ میلی‌متر جدا شوند. سپس قطعات جدا شده ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای 60°C درجه سانتی‌گراد خشک شدند. جهت فعال‌سازی سطح زئولیت (تشکیل پیوندهای OH سطحی)، زئولیت‌های مذکور را درون ارلن مجهز به مبرد ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در اسیدکلریدریک ۶ مولار (HCl 6mol/L) با دمای 80°C درجه سانتی‌گراد (با منبع حرارتی هات پلت) قرار داده شد. پس از آن، زئولیت‌ها ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای 60°C درجه سانتی‌گراد خشک شدند (Alishiri, 2017).

۲.۲.۲. پوشش سطح زئولیت با پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI)

زئولیت‌ها با دو غلظت از پلیمر PEI پوشش داده شدند.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی رویشی از دانه‌ها و سطح زئولیت اصلاح شده

۳.۲.۲. آزمایش و تحلیل تأییدکننده پوشش

پلی اتیلن ایمین

تحلیل FTIR: طیفسنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) جهت بررسی ایجاد پیوندهای شیمیایی جدید در مراحل فعال سازی و اصلاح زئولیت از این آزمایش استفاده شد. تغییر پیک در طول موج های مشخص می تواند نشان دهنده ایجاد پیوند کوالانسی جدید در ساختار زئولیت باشد.

۴.۲.۲. آماده سازی فیلترها، تیمار بندی و انتقال

پست لارو

برای انجام این پژوهش سه نوع فیلتر استفاده شد که نوع اول حاوی ۳۰۰ گرم زئولیت طبیعی با دو لایه اسفنج بود. نوع دوم حاوی سه لایه زئولیت و چهار لایه اسفنج بود که به ترتیب ۱۵۰ گرم زئولیت طبیعی، ۱۰۰ گرم زئولیت اصلاح شده با غلظت I و مجدداً ۱۵۰ گرم زئولیت طبیعی بود. همچنین نوع سوم این فیلترها حاوی سه لایه زئولیت و چهار لایه اسفنج بود که به ترتیب ۱۵۰ گرم زئولیت طبیعی، ۱۰۰ گرم زئولیت اصلاح شده با غلظت II و مجدداً ۱۵۰ گرم زئولیت طبیعی بود. سپس فیلترها درون مخازن نصب شد و سرعت جریان آب توسط پمپ آب ۰/۲ لیتر در دقیقه تنظیم شد. همچنین برای انجام این آزمایش از ۱۵ مخزن ۱۰۰ لیتری در ۵ تیمار و ۳ تکرار شامل کنترل منفی (بدون باکتری آئروموناس هیدروفیلا)، کنترل مثبت (دارای باکتری آئروموناس هیدروفیلا)، تیمار فیلتر زئولیت طبیعی، تیمار فیلتر اصلاح شده با غلظت I و تیمار فیلتر اصلاح شده با غلظت II استفاده شد. در این پژوهش جهت تأمین آب مخازن از آب شهری هوادهی و کلرزدایی شده استفاده گردید. همچنین در شروع آزمایش $EC=13 \pm 830 \mu s/cm$, $pH=8 \pm 0.55$, $TDS=400 \pm 20 mg/l$ ، دوره نوری ۱۲D-۱۲L و دمای آب $27 \pm 1^\circ C$ تنظیم شد.

۳.۲. آلوده سازی آب مخازن

جهت آلوده سازی آب مخازن (هر مخزن حاوی ۱۰۰ لیتر آب) با باکتری آئروموناس هیدروفیلا به ازای هر مخزن (۱۲ مخزن) ۵ میلی لیتر آب با بار باکتریایی $10^8 CFU/ml$ سلول/میلی لیتر تهیه و همزمان با انتقال پست لاروها به مخازن اضافه گردید. برای تهیه این غلظت باکتریایی از روش تعیین OD به این غلظت باکتریایی خواهیم رسید سپس با ۴ مرتبه رقیق سازی متوالی از ۵ میلی لیتر آب با بار باکتریایی $10^8 CFU/ml$ به ۵۰ لیتر آب با بار باکتریایی $10^4 CFU/ml$ به دست می آید (Sarkheil et al., 2016).

۴.۲. نمونه برداری و تعیین بار باکتریایی آب مخازن

نمونه برداری به منظور تعیین بار باکتریایی آب مخازن، روزانه و به مدت ۱۰ روز از تمام مخازن توسط بطری های نمونه برداری آب، صورت گرفت و $100 \mu l$ میکرولیتر از نمونه آب هر مخزن به طور روزانه در محیط کشت TSA کشت داده شد، سپس در انکوباتور در دمای $25^\circ C$ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و تعداد کلنی های رشد کرده شمارش گردید. بدین منظور قبل از تعیین بار باکتریایی غلظت های متفاوت باکتری آئروموناس هیدروفیلا از غلظت های 10^5 تا 10^1 در محیط کشت TSB کشت داده شد و تعداد کلنی های رشد کرده در دمای $25^\circ C$ بعد از ۲۴ ساعت شمارش گردید و میانگین تعداد کلنی ها برای غلظت های متفاوت در نظر گرفته شد.

۵.۲. اندازه گیری میزان بقا، وزن و طول

پست لاروها در طول آزمایش

در روز شروع آزمایش ۱۰۰ قطعه پست لارو در هر مخزن وجود داشت که با پودر غذای اکستروود ماهی قزل آلا، سفیده تخم مرغ و دل مرغ چرخ کرده روزانه ۴ مرتبه با فاصله زمانی ۶ ساعت جهت جلوگیری از هم جنس خواری تغذیه شدند. جهت اندازه گیری طول و وزن پست لاروها به طور تصادفی از هر واحد آزمایشی ۱۰ قطعه پست لارو انتخاب و توسط کولیس دیجیتال طول کل پست لاروها (از

تبدیل فوریه مادون قرمز از زئولیت طبیعی است. براساس جدول‌های همبستگی، طیف از زئولیت طبیعی در محدوده عدد موجی $3456-3416 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به پیوندهای کوالانسی گروه هیدراکسید و O-H است. همچنین پیک طیفی در طول موج $1082-1102 \text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده وجود پیوندهای کوالانسی Si-O-Si است که به میزان زیادی در ترکیب زئولیت طبیعی یافت می‌شود. علاوه بر این، پیک موجود در طول موج $589-593 \text{ cm}^{-1}$ نشان‌دهنده وجود Al و پیوندهای Al-O-Al در ترکیب زئولیت طبیعی است (Silapajarn *et al.*, 2006). اما نمودار ب شکل ۲، نشان‌دهنده تجزیه طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز از زئولیت اصلاح‌شده با غلظت I پلیمر پلی اتیلن‌ایمین است. در این نمودار تغییراتی نسبت به طیف زئولیت طبیعی وجود دارد. از جمله این تغییرات پیک طیفی در طول موج $3625-3605 \text{ cm}^{-1}$ است که می‌تواند بیانگر حضور N-H در سطح زئولیت باشد و این پیک تأیید می‌نماید که پلیمر PEI در سطح زئولیت اصلاح‌شده با غلظت I وجود دارد. همچنین نمودار ج شکل ۲، مربوط به طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز از زئولیت اصلاح‌شده با غلظت II است. در این نمودار، پیک نشان‌دهنده پلیمر PEI در طول موج $3635-3615 \text{ cm}^{-1}$ با درصد عبور نور ۹۴/۲۴ درصد نسبت به درصد عبور نور در زئولیت اصلاح‌شده با غلظت I که ۹۵/۸۴ درصد است و بیانگر این است که پیوندهای N-H بیشتری در سطح زئولیت اصلاح‌شده با غلظت II وجود دارد.

ابتدای روستروم تا انتهای تلسون) و با ترازوی حساس وزن خشک پست لاروها پس از ۲۴ ساعت قرارگیری نمونه‌ها در آون با دمای 100°C اندازه‌گیری شد. در پایان آزمایش (روز دهم) نیز دوباره از هر مخزن به‌طور تصادفی از هر واحد آزمایشی ۱۰ قطعه پست‌لارو انتخاب و اندازه‌گیری‌های فوق انجام شد. پس از اتمام آزمایش نیز تعداد پست‌لاروها شمارش شد تا میزان بقا در طول انجام آزمایش مشخص گردد (Sarkheil *et al.*, 2016).

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت انجام تحلیل آماری از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و گروه‌بندی دانکن براساس شاخص‌های مورد بررسی در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارها استفاده شد. همچنین از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ جهت تحلیل داده‌ها و Excel نسخه ۲۰۱۳ جهت رسم نمودار استفاده شد. همچنین کلیه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام و داده‌ها به‌صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شد.

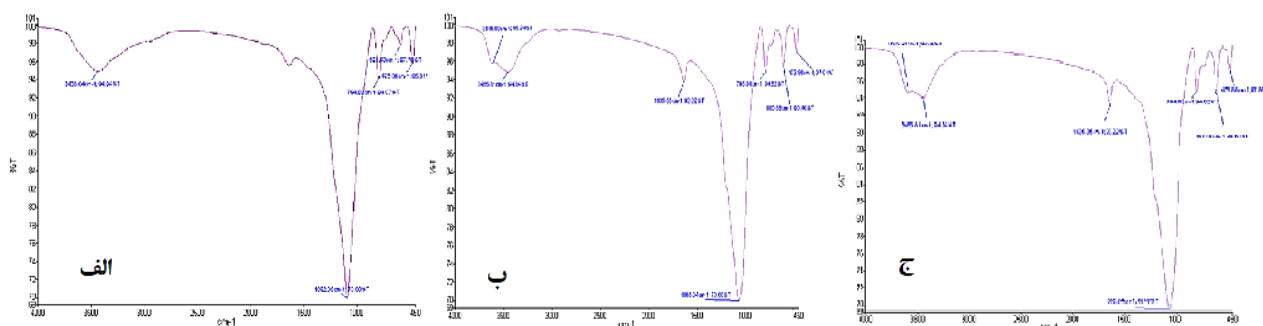
۳. نتایج

۱.۳. تأیید پوشش سطح زئولیت با پلیمر

پلی اتیلن‌ایمین (PEI)

۱.۱.۳. تجزیه FTIR

نمودار الف شکل ۲، نشان‌دهنده تجزیه طیف سنجی



شکل ۳ - نمودار تجزیه طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز از زئولیت طبیعی (الف) و زئولیت اصلاح‌شده با غلظت I (ب) و غلظت II (ج).

میکرولیتر رسید. در مخازن کنترل مثبت (دارای باکتری آروموناس هیدروفیلا با بارباکتریایی 10^4CFU/ml) نیز افزایش باکتریایی از روز ابتدا تا انتهای دوره آزمایش مشاهده شد، بدین ترتیب در روز ابتدای آزمایش در حدود ۲۰۰ کلونی در میکرولیتر براساس باکتری کشت داده شده در محیط کشت TSA و با افزایش تدریجی در انتهای دوره آزمایش ۳۸۰ کلونی در میکرولیتر شمارش گردید.

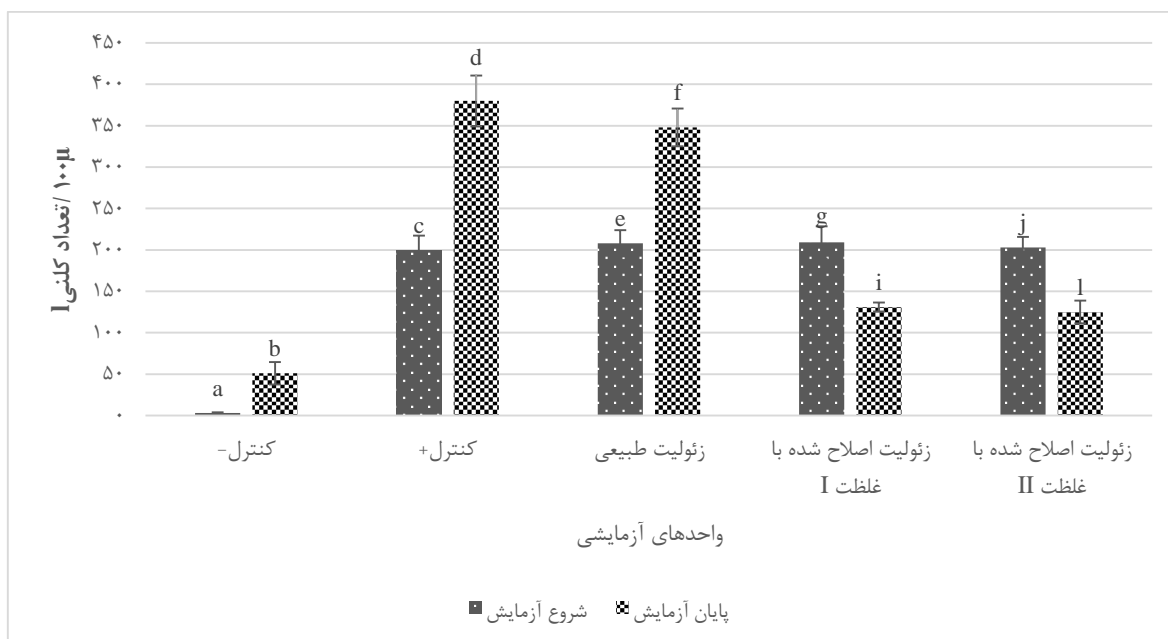
۲.۳. تعیین بار باکتریایی آب مخازن در طول

دوره آزمایش

نتایج کنترل بار باکتریایی آب در طول دوره آزمایش براساس شکل‌های ۲ و ۳ به دست آمد. براساس نتایج، در مخازن کنترل منفی (بدون باکتری) تا روز سوم هیچ‌گونه باکتری در کشت محیط TSA یافت نشد، اما از روز سوم به تدریج بار باکتری مخزن افزایش یافت تا در روز دهم به حداکثر میزان خود یعنی $50 \text{colony}/100 \mu\text{l}$ کلونی در



شکل ۳- نمودار تعیین بارباکتریایی آب مخازن پرورش پست لارو میگوی آب شیرین در طی دوره آزمایش



شکل ۴- نمودار مقایسه بارباکتریایی کل در ابتدا و انتهای آزمایش برای واحدهای آزمایشی مختلف (حروف متفاوت در نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار درون گروه‌ها است.)

بعد از ده روز دوره آزمایش پست‌لاروها رشد کرد و در تمام تیمارها به جز مخازن دارای فیلتر محتوی زئولیت طبیعی وزن پست‌لاروها به بیش از ۶۰ میلی‌گرم رسیدند و در تیمار دارای فیلتر محتوی زئولیت طبیعی نیز وزن پست‌لاروها به‌طور میانگین ۵۸/۴ میلی‌گرم بود. اما از لحاظ افزایش وزن گروه کنترل منفی با تمامی تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P < 0/05$). این درحالی است که هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل مثبت و سه تیمار از لحاظ افزایش وزن وجود ندارد ($P > 0/05$). نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری طول کل پست‌لاروها نشان‌دهنده افزایش طول آن‌ها در طول دوره ده روزه آزمایش است. طول کل اولیه پست‌لاروها $9/97 \pm 0/53$ و اندازه‌گیری شد. اما براساس نتایج جدول ۱، پس از اتمام دوره آزمایش این مقدار برای گروه کنترل مثبت و منفی و سه گروه تیمار دارای فیلتر، به حدود ۱۴ میلی‌متر رسید و در این مورد هیچ اختلاف معنی‌داری بین این چهار گروه وجود نداشت ($P > 0/05$). اما نسبت به کنترل منفی پست‌لاروها در هر پنج گروه دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($P < 0/05$).

۳.۳. اندازه‌گیری میزان بقا، وزن و طول پست‌لاروها

در پایان دوره آزمایش

براساس نتایج جدول ۱، میانگین بقا در پایان دوره آزمایش برای گروه کنترل منفی که فاقد هرگونه باکتری آئروموناس هیدروفیلا بود، ۹۵ درصد بود و با گروه کنترل مثبت و هر سه تیمار دارای فیلتر اختلاف معنی‌دار دارد ($P < 0/05$). کمترین میزان بقا مربوط به گروه کنترل مثبت بود که به آن باکتری آئروموناس هیدروفیلا با بار کلونی 10^4 در میکرولیتر اضافه شده و فاقد فیلتر بود، میزان بقا این گروه به‌طور میانگین ۷۳٪ بود و هرچند با تیمار دارای فیلتر محتوی زئولیت طبیعی اختلاف معنی‌داری در میزان بقا نداشت ($P > 0/05$). اما با دو تیمار محتوی زئولیت اصلاح شده دارای اختلاف معنی‌دار است ($P < 0/05$). همچنین میزان بقا برای تیمار دارای فیلتر محتوی زئولیت اصلاح شده با غلظت I و II به ترتیب به‌طور میانگین ۸۴ و ۸۲ درصد برآورد شد.

در هنگام شروع آزمایش میانگین وزن پست‌لاروها $12/3 \pm 0/6$ میلی‌گرم بود. اما براساس اطلاعات جدول ۱،

جدول ۱- مقایسه میزان بقا، وزن و طول پست لاروهای دو گروه کنترل مثبت و منفی و تیمارها در روز دهم آزمایش

شاخص ها	کنترل منفی	کنترل مثبت	ژئولیت طبیعی	ژئولیت I	ژئولیت II
بازماندگی (%)	۹۵±۵ ^a	۷۳±۷ ^b	۷۵±۵ ^{b,c}	۸۴±۳ ^c	۸۲±۱ ^c
وزن خشک (mg)	۴۳/۹۲±۰/۹۸ ^a	۶۴/۵۷±۶/۵۹ ^b	۵۸/۴±۴/۲۸ ^b	۶۲/۳۸±۵/۳۵ ^b	۶۰/۴۷±۵/۹۷ ^b
طول پست لارو (mm)	۱۲/۴۱±۰/۱۹ ^a	۱۴/۴۶±۱/۲۹ ^b	۱۳/۷۸±۱/۳۲ ^b	۱۴/۲۱±۱/۸۹ ^b	۱۴/۰۵±۲/۰۲ ^b

۴. بحث و نتیجه گیری نهایی

نتایج حاصل از بررسی تأثیر فیلترهای اصلاح شده با پلیمر PEI بر روند بار باکتریایی آب مخازن نگهداری PL12 میگوی آب شیرین بیانگر کارایی آن در سیستم مدار بسته است. محققان زیادی (Rivera-Garza, 2000; Bright et al., 2002; Inoue et al., 2002; Sarkheil et al., 2016) مطالعات خود بر تأثیرگذاری این نوع فیلترها به همراه نانوذرات نقره، به عنوان یک فیلتر ضدباکتریایی برای گونه های مختلف باکتریایی تأکید داشته اند. در این پژوهش از پلیمر پلی اتیلن ایمین با وزن ملکولی کم (MW=2000) به دلیل میزان سمیت کمتر در پی رهایش احتمالی این پلیمر در محیط آب استفاده شده است. معلق بودن ذرات ضدباکتریایی در محیط آبی خطرات بسیاری از جمله مسمومیت و آسیب بافتی به آبزیان را به دنبال دارد. در همین راستا Agnihotri و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه خود از نانوذرات نقره (AgNPs) ثابت شده در یک سطح سیلیس آمین دار استفاده کردند و خواص آنتی باکتریایی آن را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مطالعه آن ها نشان داد که تأثیر آنتی باکتریایی نانوذرات نقره ثابت شده در یک بستر بیشتر از نانوذرات نقره کلوئیدی در آب است.

خاصیت ضد میکروبی این دسته از پلیمرها به واسطه اختلال در غشای داخلی و خارجی باکتریها صورت می گیرد (Izanloo et al., 2014). در این پژوهش با توجه به گردش آرام آب با دبی ۰/۲ لیتر در دقیقه، مدت زمان مناسبی جهت برخورد باکتریهای آئروموناس هیدروفیلا با پلیمرهای ثابت شده روی ژئولیت اصلاح شده با پلیمر PEI فراهم بود به همین دلیل، احتمالاً با برخوردهای مکرر

باکتریها در چرخش های متمادی با بخش های آنیونی سطح باکتری و بخش کاتیونی پلیمر (NH₂)، اختلال در دیواره سلولی باکتری ایجاد شده است (Strydom et al., 2013). این گروه های عاملی (NH₂) روی سطوح سلول باکتریایی جذب شده و از طریق دیواره سلولی نفوذ می نمایند. سپس به غشای سیتوپلاسمی متصل شده و آن را متلاشی می کنند. در این هنگام الکترولیت هایی مانند یون های پتاسیم و فسفات از باکتری آزاد می شوند که در نتیجه به مرگ سلول باکتریایی می انجامد (John et al., 2011). این خاصیت به شدت به طول و تراکم زنجیره پلیمری بستگی دارد. بنابراین پلیمرهایی با وزن ملکولی بیشتر احتمالاً توانایی بیشتری در نابودی باکتریها دارند (Izanloo et al., 2015).

در بیشتر مطالعات مربوط به کنترل بار باکتریایی آب بیان شده که تعداد باکتریها در طول دوره، اثر فیلتراسیون و یا در مدت زمان کمتر از ۲۴ ساعت به صفر رسیده است (Green and Mark, 2013)، در مطالعه حاضر هرچند کاهش بار باکتریایی در طول ۱۰ روز دوره نگهداری پست لاروها مشاهده شد، اما تعداد باکتری به صفر نرسید. مطالعه حاضر از جهات مختلفی متفاوت با سایر مطالعات است و علت متفاوت بودن این نتایج را می توان به متنوع بودن بستر فیلتر، حضور موجود زنده و در نتیجه وجود مواد آلی در این تحقیق که می تواند به تکثیر و رشد باکتری کمک کند، نسبت داد. تفاوت در میزان بستر اصلاح شده نیز به عنوان عامل اصلی ضد باکتریایی و اختلاف در میزان پلیمر استفاده شده نیز از عوامل دیگر این تفاوتهاست.

نحوه کاهش تعداد باکتریها در مخازن دارای فیلتر

باعث نشت یون‌های پتاسیم می‌شود. اگر غلظت دندریمر افزایش یابد، ساختار غشایی بی‌ثبات‌تر و در نهایت منجر به مرگ باکتری می‌شود (Gholami et al., 2016). اما افزایش بار باکتریایی از روز ششم در این دو تیمار می‌تواند به دلیل هر دو احتمال افزایش فلور طبیعی پست‌لاروها به آب و یا احتمال وجود باکتری‌های چرخه‌آب باشد. هر چند بار باکتریایی آب در دو تیمار دارای زئولیت اصلاح‌شده کاهش یافت، اما میزان بقای پست‌لاروها (با وجود اینکه افزایش میزان بقا را نشان داد) تفاوت معنی‌داری با تیمار دارای فیلتر محتوی زئولیت طبیعی نداشت. اما نسبت به گروه کنترل مثبت میزان بقای بیشتر و معنی‌داری از خود نشان داد. بنابراین می‌توان به این نتیجه رسید که فیلترهای محتوی زئولیت اصلاح‌شده باعث افزایش میزان بقا در مدت زمان انجام آزمایش خواهد شد و می‌تواند به ترتیب ۱۱ و ۱۳ درصد افزایش بقا را برای تیمار دارای فیلتر محتوی زئولیت اصلاح‌شده با غلظت I و II نسبت به گروه کنترل مثبت داشته باشند.

۵. نتیجه‌گیری نهایی

در نهایت پس از جمع‌بندی و مقایسه نتایج پژوهش حاضر با سایر مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که زئولیت پوشش داده‌شده با پلیمر PEI با وزن ملکولی کم، به‌عنوان یک بستر ضدباکتریایی، به‌خوبی در غلظت باکتریایی 10^4 سلول در میلی‌لیتر این خاصیت را از خود بروز می‌دهد.

۶. تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد دفاع شده در گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران استخراج شده است. نگارنده بر خود لازم می‌داند مراتب سپاس و تشکر صمیمانه خود را از اساتید راهنما، مشاور و داوران پایان‌نامه که ما را در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش یاری نمودند و گروه شیلات به‌جهت فراهم کردن امکانات پژوهش، ابراز دارد.

محتوی زئولیت اصلاح‌شده با غلظت‌های I و II مشابه هم بود. علت این امر وجود تقریباً برابر پلیمر در هر دو غلظت اصلاحی زئولیت بود. ولی همانطور که نتایج نشان داد برای هر دو تیمار دارای فیلتر محتوی زئولیت اصلاح‌شده، بارباکتریایی آب تا روز ششم کاهش یافت و بعد از آن تا روز دهم افزایش تدریجی بار باکتریایی مشهود بود. همچنین برای گروه کنترل منفی که هیچ‌گونه باکتری تا روز سوم در کشت نمونه آب آن مشاهده نشد، از روز چهارم تا انتهای دوره آزمایش روند افزایش بارباکتریایی آب مشاهده شد. اما برای گروه کنترل مثبت و تیمار دارای فیلتر محتوی زئولیت طبیعی نیز روند افزایش باکتری مشابه بود. دلیل این افزایش بار باکتریایی برای گروه کنترل منفی از روز سوم احتمالاً حضور باکتری‌های فلور طبیعی پست‌لاروها و یا باکتری‌های موجود در آب تجدیدشونده است، زیرا هیچ باکتری‌ای در روز نخست به آب این گروه اضافه نشده بود و دلیل ایجاد کلنی در کشت نمونه آب این گروه می‌تواند به یکی از این احتمال ذکر شده ربط داده شود. اما افزایش بار باکتریایی از روز نخست برای گروه کنترل مثبت و تیمار دارای فیلتر محتوی زئولیت طبیعی را نیز می‌توانیم به اضافه شدن باکتری‌های جدید (فلور طبیعی میگو و باکتری‌های تنظیم‌کننده چرخه آب) در محیط و نیز تکثیر و ازدیاد باکتری آئروموناس هیدروفیلا در محیط آب دانست، زیرا از روز نخست شرایط ایده‌آل با ورود مواد آلی ناشی از تغذیه و دفع پست‌لاروها به آب برای باکتری‌ها مهیا بود. اما کاهش بار باکتریایی در هر دو تیمار دارای فیلتر محتوی زئولیت اصلاح‌شده به‌واسطه گروه‌های جانبی آمین پلیمر PEI بود، زیرا هنگامی که پلیمر به یک محلول باکتریایی وارد می‌گردد، جانشین یون‌های دو ظرفیتی سطحی باکتری‌ها مانند کلسیم و منیزیم می‌شود، سپس به غشاهای فسفولیپیدی دارای بار منفی متصل و باعث تغییر اندک در نفوذپذیری غشا می‌گردد (John et al., 2011). غلظت بالاتر پلیمر منجر به دناتور (تغییر ساختار) شدن پروتئین‌های غشایی شده و شروع به سوراخ نمودن فسفولیپید می‌کند. در این مرحله نفوذپذیری بالای غشا

۷. منابع

References

- Adanir, D., Turutoglu, H., 2007. Isolation and antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* in a carp (*Cyprinus carpio*) hatchery farm. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 51(1), 361-364.
- Agnihotri, S., Mukherji, S., Mukherji, S., 2013. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. *Nanoscale* 5(4), 7328-7340.
- Alishiri, M., 2017. Application of modified zeolite with polyethylenimine Polymer and use against *Aeromonas hydrophila* in water filtration system of tank in freshwater post larvae prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) under transportation stress. M.Sc. thesis. Fish culture and fisheries group. University of Tehran. Iran. 101 p. (In Persian)
- Azevedo, P., Ramalho, A., Silva, R., Teixeira-Santos, C., Pina-Vaz1, A.G., 2014. Polyethyleneimine and polyethyleneimine-based nanoparticles: novel bacterial and yeast biofilm inhibitors. *Journal of Medical Microbiology* 63(2), 1167-1173.
- Boyd, E., Tucker, S., 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. *Kluwer Academic Publishers*, Boston. 711 p.
- Bright, K., Gebra, C., Rusin, P., 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(3), 302-309.
- Gholami, M., Nazari, Sh., Farzadzika, M., Majideh, Gh., Alizadeh, S., 2016. Activation of antibacterial effect of Polyamidoamine nano dendrimer in aquatic environment. *Journal Faculty of Medicine* 74(3), 159-167. (In Persian)
- Green, T., Mark A., 2011. Immobilized Antimicrobial Agents: A Critical Perspective. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. pp. 84-98.
- Inoue, Y., Hoshino, M., Takahashi, H., Noguchi, T., Murata, T., Kanzaki, Y., Hamashima, H., Sasatsu, M., 2002. Bactericidal activity of Ag-zeolite mediated by reactive oxygen species under aerated conditions. *Journal of Inorganic Biochemistry* 92(3), 37-42.
- Izanloo, H., Ahmadi Jebelli, M., Nazari, S., Safavi, N., Tashayoe, HR., Majidi, G., 2014. Studying the antibacterial effect of polyamidoamine dendrimer on some of the gram-negative and gram-positive bacteria. *Journal of Arak University of Medical Sciences* 17(9), 1-10.
- Izanloo, H., Nazari, S., Ahmadi Jebelli, M., Alizadeh, M., 2015. Studying the Polypropylenimine-G2 (PPI-G2) Dendrimer Performance in Removal of *Escherichia coli*, *Proteus Mirabilis*, *Bacillus Subtilis* and *Staphylococcus Aureus* from Aqueous Solution. *Journal of Arak University of Medical Sciences* 18(6), 8-16.
- John, G., Thomas, R., Roberts, P., 2015. Highly Crosslinked Polyethylene in Total Hip Arthroplasty Decreases Long-term Wear: A Double-blind Randomized Trial. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 473(4), 432-438.
- Khoobi, M., Motevalizadeh, F., Asadgol, Z., Forootanfar, H., Shafiee, A., Faramarzi, M., 2014. Polyethyleneimine-modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for lipase immobilization: Characterization and application. *Materials Chemistry and Physics* 149(2), 77-86.
- Lin, J., Qiu, S.Y., Lewis, K., Klivanov, A.M., 2002. Bactericidal Properties of Flat Surfaces and Nanoparticles Derivatized with Alkylated Polyethylenimines. *Biotechnology Progress* 18(2), 1082-1086.
- Matyar, F., Dincers, S., Kaya, A., Colak, O., 2004. Prevalence and resistance to antibiotics in Gram negative bacteria isolated from retail fish in Turkey. *Annals of Microbiology* 54(3), 151-160.

- Milovic, N.M., Wang, J., Lewis, K., Klivanov, A.M., 2005. Immobilized N-Alkylated Polyethylenimine Avidly Kills Bacteria by Rupturing Cell Membranes with No Resistance Developed. *Biotechnology and Bioengineering* 90(4), 715-722.
- Rai, M., Yada, A., Gade, A., 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27(1), 76-83.
- Rivera-Garza, M., Olguin, M.T., Garcia-Sosa, I., Alcantara, D., Rodriguez-Fuentes, G., 2000. Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material. *Microporous and Mesoporous Materials* 39(6), 431-444.
- Sarkheil, M., Sourinejad, I., Mirbakhsh, M., Kordestani, D., Johari, A., 2016. Application of silver nanoparticles immobilized on TEPA-Den-SiO₂ as water filter media for bacterial disinfection in culture of Penaeid shrimp larvae. *Aquacultural Engineering* 74(1), 17-29.
- Silapajarn, O., Silapajarn, K. and Boyd, C., 2006. Evaluation of zeolite products used for aquaculture in Thailand. *Journal of the World Aquaculture Society* 37 (1), 136_138.
- Strydom, S., Rose, W., Otto, D., Liebenberg, W., Villiers, M., 2013. Poly (amidoamine) dendrimer-mediated synthesis and stabilization of silver sulfonamide nanoparticles with increased antibacterial activity. *Nanomedicine* 9(1), 85-93.
- Timofeeva, L., Kleshcheva, N., 2011. Antimicrobial Polymers: Mechanism of Action, Factors of Activity, and Applications. *Microbial Biotechnology* 89(4), 475-492.
- Zendehdel, M., Solimannejad, M., 2013. Interaction between NaY Zeolite and boric Acid, a preliminary computational study. *Chemistry of Solid Materials* 1(2), 57-63.