



# استفاده از زئولیت کلینوپتیلولیت پوشش داده شده با پلیمر پلی اتیلن ایمین (PEI) به منظور کنترل باکتری یرسینا روکری (*Yersinia ruckeri*) در مخزن پرورش ماهی

مصطفی علیشیری<sup>۱</sup>، علیرضا میرواقفی<sup>۲\*</sup>، کامران رضایی توابع<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی 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: ۱۳۹۹/۰۷/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۳۰

## چکیده

امروزه به دلیل استفاده بی‌رویه از مواد ضد باکتریایی، برخی از گونه‌های باکتریایی نسبت به آنها مقاوم شده‌اند، به همین دلیل استفاده از موثر به منظور مهار باکتری‌ها ضروری است. بیماری یرسینیوزیس یکی از بیماری‌های مهم در گونه‌های مختلف آبزیان است که در آبزیان آلوده به باکتری یرسینیا روکری پدیدار می‌شود. در دهه اخیر رویکرد جدیدی برای کنترل پاتوژن در پرورش آبزیان با استفاده از پلیمرهای مصنوعی با خاصیت ضد باکتری ایجاد شده است، یکی از این پلیمرهای مصنوعی پلی اتیلن ایمین (PEI) است که بسیاری از مطالعات خواص ضد میکروبی آن را گزارش می‌دهند. هدف از انجام این پژوهش پوشش سطحی زئولیت به‌منظور استفاده در سیستم فیلتراسیون آب مخازن نگهداری آبزیان بود. در این پژوهش زئولیت کلینوپتیلولیت با دو غلظت I و II استفاده شد، که برای پوشش سطح زئولیت با غلظت I به ازای هر ۱۵g زئولیت فعال شده ۳۰ml تولوئن با ۱ml از EPO و ۱ml از PEI و برای پوشش سطح زئولیت‌ها با غلظت II به ازای هر ۱۵g زئولیت فعال شده ۳۰ml تولوئن با ۲ml از EPO و ۱ml از PEI با هم ترکیب و تحت حرارت همزده شد تا عامل مورد نظر ایجاد شود و در مرحله بعد روی زئولیت مورد نظر انتقال داده شد. سپس توانایی آن جهت حذف باکتری یرسینیا روکری در غالب آزمون حداقل غلظت کشندگی (MBC) در غلظت‌های  $10^1 \times 1/8$  تا  $10^4 \times 1/8$  CFU/ml و همچنین آزمون منطقه مهار رشد در غلظت باکتریایی  $10^4 \times 1/8$  برای هر دو غلظت I و II زئولیت پوشش داده شده برای وزن‌های مختلف زئولیت انجام شد. نتایج پژوهش نشان داد زئولیت پوشش داده شده با دو غلظت I و II پلیمر PEI توانایی بالقوه‌ای در حذف باکتری یرسینیا روکری در غلظت‌های  $10^2 \times 1/8$  تا  $10^1 \times 1/8$  CFU/ml دارد. به طوری که در غلظت باکتریایی  $10^1$  CFU/ml برای  $10^2 \times 1/8$  برای زئولیت پوشش داده شده با دو غلظت I و II به ترتیب ۵۴ و ۷۰ درصد بار باکتریایی کاهش پیدا کرد. همچنین قطر هاله عدم رشد با افزایش وزن زئولیت افزایش یافت، به این ترتیب قطر هاله عدم رشد برای ۰/۰۵g زئولیت با غلظت I و II به ترتیب برابر ۱۰/۷ و ۱۱/۳ و برای وزن ۰/۱g ترتیب برابر ۱۵/۲۳، ۱۵/۸۸ و ۱۸/۷۵ mm برابر ۱۹/۱۱ بود. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت زئولیت پوشش داده شده با پلیمر PEI به عنوان یک بستر ضدباکتریایی به خوبی این خاصیت را در غلظت باکتریایی  $10^2$  CFU/ml از خود بروز می‌دهد.

واژگان کلیدی: زئولیت، اصلاح زئولیت، یرسینا روکری، پلی اتیلن ایمین، آنتی بیوتیک.



# Using the Polyethylenimine Polymer (PEI) -Coated Zeolite (Clinoptilolite) to control *Yersinia ruckeri* in fish tank

Mostafa Alishiri<sup>1</sup>, Alireza Mirvaghefi<sup>2\*</sup>, Kamran Rezaei Tavabe<sup>3</sup>

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

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

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

Received: 20-Aug-2019      Accepted: 18-Sep-2020

## Abstract

Nowadays, due to the overuse of antibacterial substances, some strains of bacteria showed a resistance to them. Hence, it is necessary to use new effective methods to control diseases caused by these strains. Yersiniosis that occur in some aquatic species, is caused by *Yersinia ruckeri*, a Gram-negative rod-shaped enterobacterium. In recent decade, a new approach developed to control pathogen using synthetic polymers with antibacterial properties, one of this synthetic polymer is Polyethyleneimine (PEI) that many studies reported its antimicrobial properties in aquaculture activities. Thus, the purpose of this study was to control *Yersinia ruckeri* by impregnating the zeolite with Polyethyleneimine and install it as an antibacterial filter in the fish tank. In this study, clinoptilolite zeolites with two concentrations were used, the first sheet(I) containing 15g of zeolite activated by 30 ml of toluene and then added it 1ml of EPO and 1ml of PEI, for the second sheet(II), the same procedure was run, but 2ml of EPO and 2ml of PEI were used, after that both sheets stirred under heat to give the desired agent and then transferred to the zeolite to produce the substrates treatments as two kinds of filters. Then ability of two anti-bacterial substrates tested to remove *Yersinia ruckeri* in the presence of the minimum bactericidal concentration (MBC). The growth inhibition zone also tested at concentrations of  $1.8 \times 10^8$  to  $1.8 \times 10^1$  CFU/ml<sup>-1</sup> and  $1.8 \times 10^4$  CFU/ml<sup>-1</sup>. The results showed that zeolite coated with two concentrations of PEI polymer have the potential to remove *Yersinia ruckeri* at  $1.8 \times 10^3$  to  $1.8 \times 10^1$  CFU/ ml<sup>-1</sup>. The bacterial concentration decreased by 54% and 70% at the bacterial concentration of  $1.8 \times 10^3$  CFU/ml-1 for zeolite coated with concentrations of I and II, respectively. Also, the growth zone diameter positively correlated with zeolite weight, the growth zone diameter for 0.05g zeolite by concentration I and II were 10.7,11.3 mm, and for 0.1 g were 15.23, 15.88 mm and for 0.15g were 18.75, 19.11 mm respectively. Finally, it was concluded that the PEI polymer-impregnated zeolite, as an antibacterial substrate, exhibits its best appliance at the bacterial concentration of  $1.8 \times 10^3$  CFU/ ml<sup>-1</sup>.

**Key words:** Zeolite, *Yersina Rukeri*, Polyethyleneimine (PEI), antimicrobial properties, antibiotic.

## ۱. مقدمه

امروزه از ضدعفونی کننده‌های بسیاری مانند مالاشیت گرین، فرمالین، سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم برای کنترل بار باکتریایی آب در آبی‌پروری استفاده می‌شود (Moshtaghi et al., 2014). همچنین به دلیل استفاده بی‌رویه و طولانی مدت از این مواد ضدباکتریایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها حضور این مواد در محیط زیست و به دنبال آن مقاوم شدن برخی از گونه‌های باکتری به خصوص باکتری‌های گرم منفی یک معضل اساسی محسوب می‌شود (Matyar et al., 2004). بنابراین استفاده از موادی جایگزین و موثر به منظور مهار باکتری‌ها در محیط آب ضروری به نظر می‌رسد (Rai et al., 2009). باکتری یرسینیا روکری (*Yersinia ruckeri*) عامل بیماری یرسینیوزیس که اولین بار در سال ۱۹۶۶ میلادی با جداسازی از قزل‌آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) گزارش شده (Ross et al., 1966) جز خانواده آنتروباکتریاسه بوده که به شکل کوکوباسیل‌های گرم منفی، میله‌ای، فاقد اسپور، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت می‌باشد و یکی از عوامل مهم بیماری‌زا در گونه‌های مختلف آبزیان و بخصوص آزاد ماهیان است که ایجاد بیماری باکتریایی دهان قرمز<sup>۲</sup> می‌نماید (Akhlaghi and Sharif Yazdi, 2008). این بیماری در همه سنین رخ می‌دهد و معمولاً شیوع بیماری در موارد استرس‌زا از جمله کیفیت پایین آب پرورش و جابه‌جایی آبزیان، افزایش می‌یابد و قادر است از طریق آب منتقل شود (Gregory and Timothy, 2005). پلی اتیلن ایمین<sup>۳</sup> (PEI) یک پلیمر مصنوعی با فرمول شیمیایی  $(C_2H_5N)_n$  متشکل از تعداد زیادی گروه‌های جانبی  $NH_2$  می‌باشد (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 زنجیره پلیمر، تراکم زنجیره پلیمری و طول زنجیره‌های جانبی بستگی دارد (John et al., 2011). در پژوهش‌های گذشته خاصیت

ضد میکروبی این پلیمر برای دو باکتری *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* به اثبات رسیده است (Milovic et al., 2005). 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 ژئولیت است. این ماده از نظر ساختاری به صورت  $SiO_4$  چهار وجهی بوده که در آن یون  $Al^{3+}$  جانشین یون  $Si^{4+}$  شده است (Silapajarn et al., 2006). و به دلیل ویژگی‌های ساختاری برای منظورهای مختلفی از جمله به عنوان کاتالیزور تعویض کننده یونی و غربال ملکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ahmed et al., 1998). و در بخش‌های متعددی شامل آکواریوم‌ها، مخازن نگهداری ماهی، سیستم‌های مدار بسته پرورشی و کانتینرهای حمل و نقل آبزیان کاربرد دارد (Boyd and Tucker, 1998).

این پژوهش با هدف بررسی پوشش سطحی پلیمر پلی اتیلن ایمین (PEI) در سطح ژئولیت طبیعی (کلینوپتیلولیت) و بررسی خاصیت آنتی‌باکتریایی آن علیه باکتری یرسینیا روکری انجام گردید.

## ۲. مواد و روش

### ۲.۱. تهیه مواد مورد نیاز

ژئولیت مورد استفاده در پژوهش از شرکت افرازند تهران تهیه شد که محل استخراج از معادن شهر سمنان می‌باشد. پلی اتیلن ایمین (PEI, MW = 2000) و ماده شیمیایی [۲ و ۳ اپوکسی پروپوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان ۹۸٪] (EPO, 98% purity) از شرکت سیگما آلدریج (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. جهت ته‌نشینی باکتریایی از دستگاه اسپکتوفتومتری مدل (UV/Vis مدل ۲۱۰۰) و سانتریفیوژ مدل (سانتریفیوژ ۶۰۰۰Rpm Centric

<sup>۳</sup>Polyethylene imine

<sup>۲</sup>2,3 Epoxypropoxy propyl trimethoxysilane

<sup>۱</sup>Enterobacteriaceae

<sup>۲</sup>Enteric Redmouth Disease

زئولیت‌ها با دو غلظت از پلیمر PEI پوشش داده شدند. برای پوشش سطح زئولیت‌ها با غلظت I به ازای هر ۱۵g گرم زئولیت فعال شده ۳۰ml تولوئن با ۱ml از ماده شیمیایی [۲ و ۳ اپوکسی پروپوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان ۹۸٪] (EPO, 98% purity) و ۱ml از پلی اتیلن ایمین (PEI, MW = 2000) و برای پوشش سطح زئولیت‌ها با غلظت II به ازای هر ۱۵g گرم زئولیت فعال شده ۳۰ml تولوئن با ۲ml از EPO و ۲ml از PEI با هم ترکیب و به مدت ۳۶ ساعت در دمای  $3 \pm 80^\circ\text{C}$  در جه سانتیگراد در ارلن مبرد به وسیله مگنت مغناطیسی همزده شد تا با تشکیل پیوند کوالانسی بین دو ترکیب EPO و PEI طبق شکل (۱) عامل مورد نظر ایجاد شود. بعد از تشکیل پیوند کوالانسی بین دو ترکیب فوق، ۱۵g زئولیت خشک و فعال شده به ازای هر ۳۰ml میلی لیتر تولوئن درون ارلن مجهز به مبرد ریخته شد و برای ۲۴ ساعت در دمای  $3 \pm 80^\circ\text{C}$  با کمک مگنت همزده شد. این کار باعث می شود دو ماده ترکیب شده EPO و PEI با تشکیل پیوند کوالانسی طبق شکل (۲) به وسیله‌ی گروه OH به سطح زئولیت فعال شده متصل شوند. پس از ۲۴ ساعت زئولیت پوشش داده شده ۳ مرتبه با تولوئن و ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو داده و به مدت ۲ ساعت در  $60^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد خشک شد (Khoobi *et al.*, 2014).

322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000

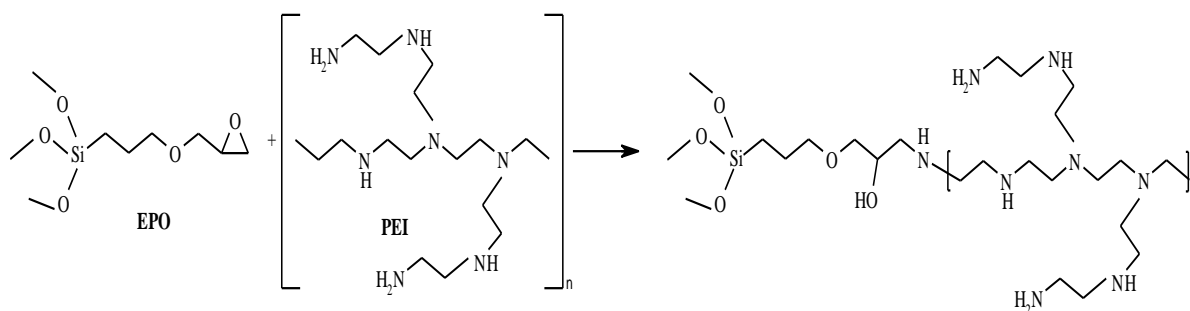
## ۲.۲. پوشش سطحی زئولیت

### ۳.۲. فعال‌سازی سطح زئولیت

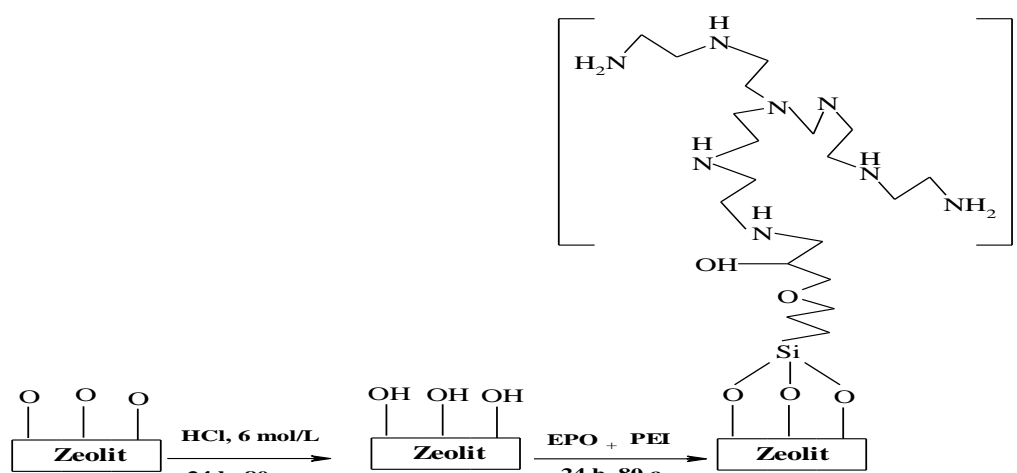
جهت فعال‌سازی سطحی ابتدا زئولیت‌ها به قطعات کوچکتر تبدیل و از دو الک با قطر چشمه ۱ mm و ۰/۹ میلی متر عبور داده شدند تا زئولیت‌هایی با ابعاد ۱ mm تا ۰/۹ جدا شوند. سپس قطعات جدا شده ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو داده شده و به مدت ۲ ساعت در دمای  $60^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد خشک شدند. جهت فعال‌سازی سطح زئولیت (تشکیل پیوندهای OH سطحی)، زئولیت‌های مذکور را درون ارلن مجهز به مبرد ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در اسیدکلریدریک ۶ مولار (HCl  $6\text{mol/L}^{-1}$ ) با دمای  $80^\circ\text{C}$  در جه 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  $60^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد خشک شدند (Johari *et al.*, 2016).

### ۴.۲. پوشش سطح زئولیت با پلیمر پلی اتیلن ایمین

(PEI)



شکل ۱- تشکیل پیوند کوالانسی بین دو ترکیب PEI و EPO



شکل ۲- مراحل فعال سازی و اصلاح ژئولیت با پلیمر پلی اتیلن ایمین

آوردن غلظت مشخصی از بار باکتریایی یرسینا روکری، ۱۰۰ ml از سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد در ارلن استریل ریخته شد و باکتری ته نشین شده در لوله‌های فالكون به آن اضافه گردید تا در طول موج ۶۰۰ nm نانو متر (OD<sub>600nm</sub>) عدد جذب بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ (در این آزمایش ۰/۰۸۸) قرار گیرد، در این عدد جذب غلظت باکتریایی حدوداً  $10^8 \times 1/8$  CFU/ml<sup>-1</sup> خواهد بود (Alishiri, 2017).

۲.۶.۲. ۲. آزمون حداقل غلظت کشندگی (MBC)<sup>۶</sup>  
در این آزمون از لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت TSB استفاده شد. بدین صورت که مقدار ۱ ml از هر کدامیک از غلظت‌های رقیق شده باکتریایی از  $10^8 \times 1/8$  تا  $10^1 \times 1/8$  CFU/ml<sup>-1</sup> به صورت مجزا درون لوله آزمایش حاوی ۹ ml محیط کشت TSB اضافه شد و برای تعیین خاصیت ضدباکتری در غلظت‌های مختلف، ۰/۵g ژئولیت معمولی و هر دو نوع ژئولیت اصلاح شده به صورت مجزا درون هر لوله‌های آزمایش در غلظت‌های باکتریایی متفاوت ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C درجه سانتیگراد در انکوباتور تکان‌دهنده قرار داده شد تا خاصیت آنتی باکتریایی ژئولیت‌ها بهتر مشخص شود. بعد از ۲۴ ساعت از هر یک از لوله‌های آزمایش نمونه برداری و OD<sup>۷</sup> هر کدام از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه

۵.۲. آنالیزهای تایید کننده پوشش پلی اتیلن ایمین آنالیز<sup>۵</sup> EDX: طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس برای بررسی کمی ساختار شیمیایی سطح ژئولیت و هر دو نمونه از ژئولیت پوشش داده شده با غلظت‌های I و II انجام گرفت تا از حضور پلی اتیلن ایمین در سطح ژئولیت اطمینان حاصل شود.

## ۲.۶.۲. بررسی خاصیت ضدباکتریایی

### ۲.۶.۱. کشت و تعیین غلظت باکتری

به منظور کشت باکتری یرسینا روکری ابتدا ۸g گرم از محیط کشت TSB درون ارلن حاوی ۲۰۰ ml میلی لیتر آب مقطر ریخته شد و اتوکلاو (۱۵ دقیقه در ۱۲۱°C) شد. پس از آماده شدن محیط کشت جهت تلقیح، باکتری یرسینا روکری در محیط کشت TSB کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور تکان‌دهنده در دمای ۳۷°C درجه سانتیگراد همزده شد تا غلظت باکتریایی افزایش یابد، بعد از گذشت این مدت زمان محتوی ارلن به لوله‌های فالكون ۱۵ ml انتقال داده شد و به منظور جداسازی و ته نشین کردن باکتری‌ها از محیط کشت، لوله‌های فالكون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ RPM سانتریفیوژ شدند. پس از آن برای جداسازی کامل محیط کشت از باکتری، محیط کشت با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد جایگزین و دوباره به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ RPM سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد برای بدست

<sup>۷</sup> Optical density

<sup>۵</sup> Energy Dispersive X-ray

<sup>۶</sup> Minimum bactericidal concentration

کربن و نیتروژن در سطح هر دو ژئولیت اصلاح شده با غلظت‌های I و II طبق نمودارهای شکل ۳ (b و c) وجود هر دو ترکیب EPO و PEI را تایید می‌نماید. طبق اطلاعات این آنالیز در ژئولیت اصلاح شده با غلظت I و II کربن موجود در سطح ژئولیت نشان دهنده وجود EPO در سطح ژئولیت است که ملکول Si با ماده شیمیایی EPO با ملکول O موجود در سطح ژئولیت واکنش نشان داده و پیوندهای Si-O را بوجود آورده است. برای تشکیل این پیوند سه ملکول O سطحی که در مرحله فعال‌سازی با H پیوند تشکیل داده بودند با از دست دادن H خود با یک ملکول Si طبق شکل (۲) پیوند برقرار می‌کنند. همچنین نیتروژن سطحی در ژئولیت اصلاح شده با غلظت I و II نشان دهنده حضور پلی اتیلن ایمین می‌باشد که طبق شکل (۱) گروه اپوکسی از EPO با آمین PEI واکنش نشان داده و بدین ترتیب طبق شکل (۲) ساختار پلی اتیلن بر روی ژئولیت شکل گرفته است. اما نتایج طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس نشان دهنده ۶۳/۹۶ wt% عنصر Si، ۸/۵۱ wt% عنصر Al و ۱۴/۳ wt% عنصر O برای ژئولیت طبیعی است و در بین سه یون کالر، سدیم و پتاسیم بیشترین مقدار متعلق به عنصر پتاسیم با ۳/۸۹ wt% می‌باشد. اما بعد از اصلاح ژئولیت این درصدها تغییر کرده و برای ژئولیت اصلاح شده با غلظت I و II به ترتیب ۴/۹۵ و ۶/۱۸ wt% عنصر C و ۶/۲۹ و ۷/۵۱ wt% عنصر N وجود دارد. بنابراین با توجه به افزایش غلظت دو برابری EPO و PEI در غلظت II نسبت به غلظت I تنها افزایش ۱/۲۳ wt% در غلظت عنصر C و ۱/۳۳ wt% در غلظت عنصر N در غلظت II را نشان می‌دهد. در نتیجه با افزایش غلظت EPO و PEI احتمال باند شدن این دو ترکیب باهم افزایش یافته و از سوی دیگر با افزایش غلظت EPO، واکنش بین گروه OH سطح ژئولیت با EPO بیشتر شده است و طبق انتظار PEI بیشتری نیز ژئولیت اصلاح شده با غلظت II نسبت به غلظت I در سطح ژئولیت وجود دارد. این افزایش بستگی به وجود گروه OH در سطح که در مرحله فعال‌سازی ژئولیت به وجود می‌آیند دارد. همچنین کاهش هر سه عنصر کالر، سدیم و پتاسیم احتمالاً بدلیل واکنش این عناصر با اسید کلریدریک در مرحله فعال‌سازی ژئولیت می‌باشد.

اسپکتوفتومتری تعیین گردید. جهت مقایسه کدورت ایجاد شده در هر نمونه مقدار OD مربوط به محیط کشت TSB از مقدار OD هر نمونه کم شد تا کدورت مربوط به باکتری‌ها بدست آید (Alishiri, 2017).

### ۳.۶.۳. آزمون منطقه مهار رشد

با تعیین غلظت باکتریایی مشخص، ۱۰ ml از سرم فیزیولوژی با بار باکتریایی  $10^8$  CFU/ml را در لوله های ۱۰ ml آزمایش ریخته و از  $10^8 \times 1/8$  تا  $10^4$  CFU/ml در ۴ لوله آزمایش به صورت متوالی رقیق سازی انجام شد. سپس از غلظت  $10^4$  CFU/ml در  $1/8 \times 10^4$  در ۴ لوله آزمایش به صورت متوالی در پلیت‌های محتوی محیط کشت TSA با روش کشت چمنی کشت داده شد و ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۱۵ g از ژئولیت و هر دو نوع ژئولیت اصلاح شده با غلظت‌های I و II به آرامی بر روی ژل محیط کشت گذاشته و ۲۴ ساعت در دمای  $25^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد نگهداری گردید. بعد از رشد باکتری قطر هاله عدم رشد با استفاده از نرم‌افزار Image J اندازه گیری شد (Alishiri, 2017).

### ۲.۷. تجزیه و تحلیل آماری داده ها

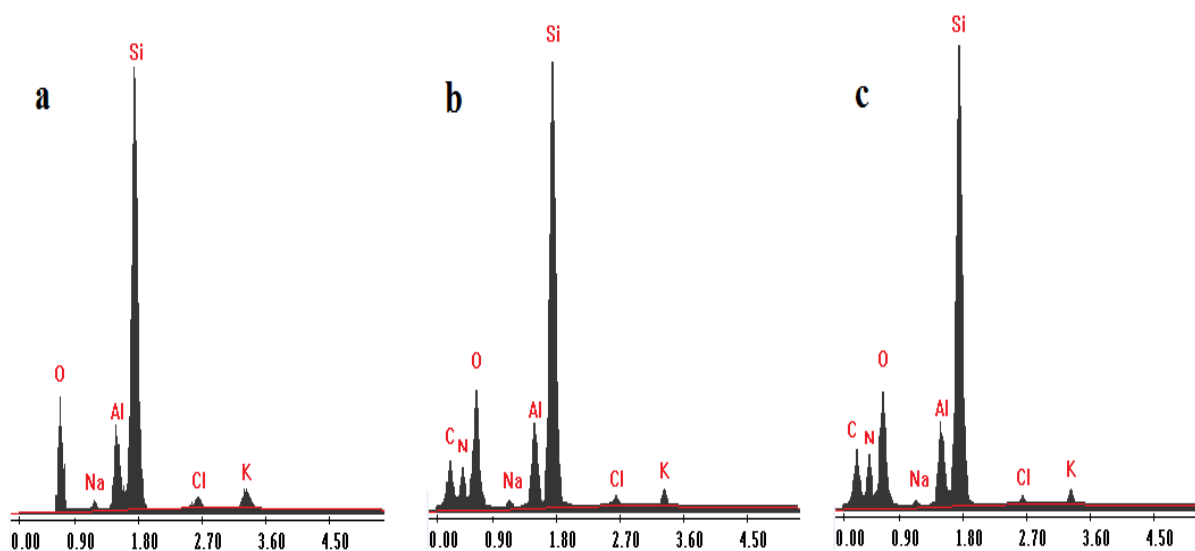
جهت انجام تجزیه آماری داده ها، از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (One way ANOVA) استفاده شد و از آزمون دانکن (Duncan's New Multiple Test) برای تعیین سطح اختلاف معنی دار بودن بین میانگین ها در سطح ۵ درصد استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS-24 جهت تجزیه و تحلیل داده ها و از Excel-2013 جهت رسم نمودار استفاده شد. لازم به ذکر است در کلیه نمودارها و جداول حروف لاتین غیرمشتک در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌هاست ( $P < 0.05$ ). همچنین کلیه آزمایشها در ۳ تکرار انجام و داده‌ها به صورت میانگین گزارش شد.

### ۳. نتایج

#### ۳.۱. تایید پوشش سطح ژئولیت با پلیمر پلی اتیلن

##### ایمین (PEI)

تجزیه طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) از سطح ژئولیت طبیعی نشان داد که هیچ کربن و نیتروژن در سطح ژئولیت طبیعی وجود ندارد (شکل ۳a). اما وجود



شکل ۳- نمودارهای تجزیه طیف سنجی پراش انرژی پروتو ایکس (EDX) از سطح ژئولیت و ژئولیت اصلاح شده، (a) ژئولیت طبیعی (b) ژئولیت اصلاح شده با غلظت I (c) ژئولیت اصلاح شده با غلظت II

همچنین بین ژئولیت‌های اصلاح شده نیز تفاوت معنی‌داری در میزان کاهش رشد باکتریایی وجود دارد بطوریکه در غلظت  $10^1 \times 1/8$  CFU/ml<sup>-1</sup> برای ژئولیت اصلاح شده با غلظت I میزان رشد باکتری نزدیک به صفر بود.

### ۲.۲.۳. آزمون منطقه مهار رشد

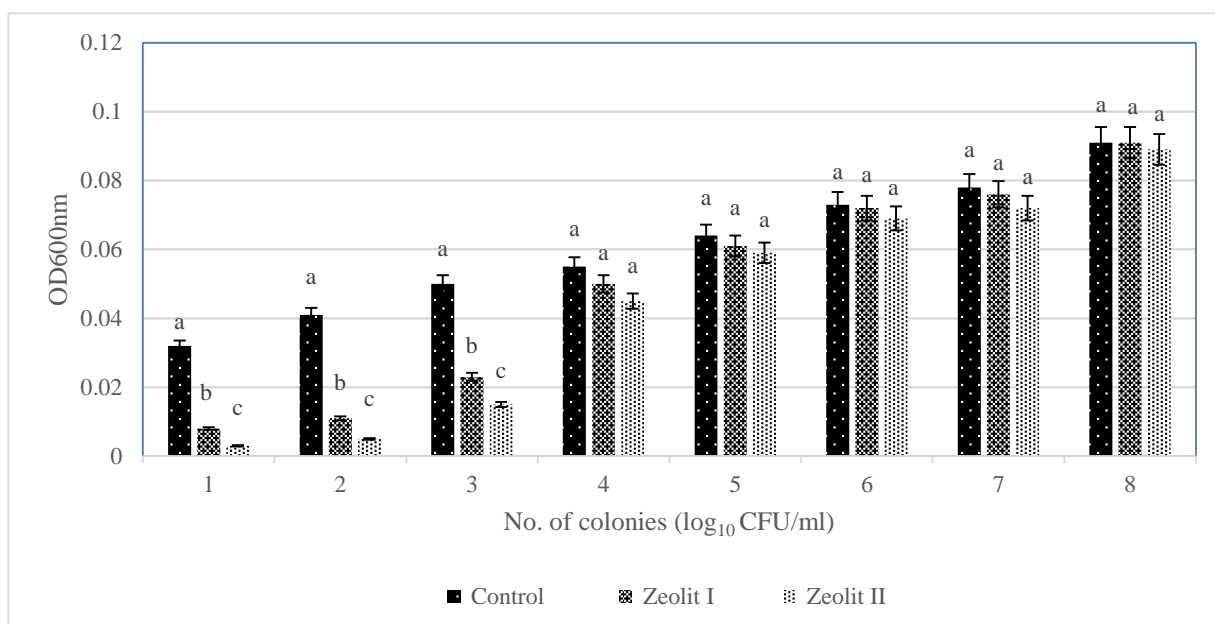
طبق تصویر شکل شماره ۵ و نمودار شکل ۶، قطر هاله عدم رشد برای  $0/05$  گرم ژئولیت اصلاح شده با غلظت I برابر  $10/7$  mm و برای ژئولیت  $0/05$  گرم ژئولیت اصلاح شده با غلظت II برابر  $11/3$  mm است. همچنین این عدد برای وزن  $0/1$  گرم ژئولیت اصلاح شده با غلظت‌های I و II به ترتیب برابر  $15/23$  mm،  $15/88$  mm و برای  $0/15$  گرم برابر  $18/75$  mm و  $19/11$  میلی متر است و همچنین هیچ اختلاف معناداری در بین ژئولیت اصلاح شده با غلظت‌های I و II در وزن‌های مختلف مورد بررسی وجود ندارد.

### ۲.۳. تایید فعالیت ضد باکتریایی ژئولیت پوشش داده شده

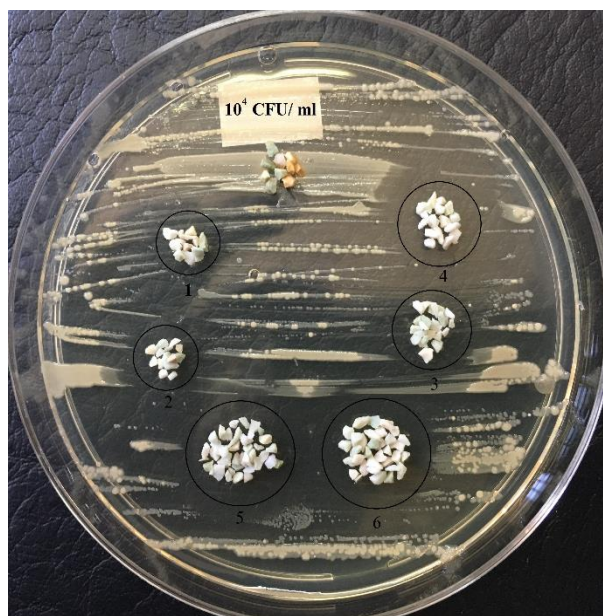
#### ۳.۲.۱. آزمون حداقل غلظت کشندگی (MBC)

بر اساس نتایج بدست آمده طبق نمودار شکل ۴، از غلظت  $10^8 \times 1/8$  تا  $10^6 \times 1/8$  CFU/ml<sup>-1</sup> هیچ اختلافی در رشد باکتریایی در ژئولیت اصلاح شده با غلظت I با تیمار شاهد مشاهده نشده است و برای ژئولیت اصلاح شده با غلظت II هرچند کاهش میزان رشد باکتری در مقایسه با شاهد وجود داشته است اما این کاهش، اختلاف معناداری با نمونه شاهد نداشته است.

همچنین در غلظت‌های  $10^5 \times 1/8$  و  $10^4$  CFU/ml<sup>-1</sup> هر دو ژئولیت اصلاح شده با غلظت‌های I و II کاهش غیرمعناداری در مقایسه با شاهد در رشد باکتری نشان داده اند. اما نتایج این نمودار برای غلظت‌های  $10^3 \times 1/8$  تا  $10^1 \times 1/8$  CFU/ml<sup>-1</sup> متفاوت از غلظت‌های قبلی است بطوریکه در هر سه غلظت، ژئولیت اصلاح شده با غلظت-های I و II با شاهد تفاوت معنی‌داری نشان دادند و

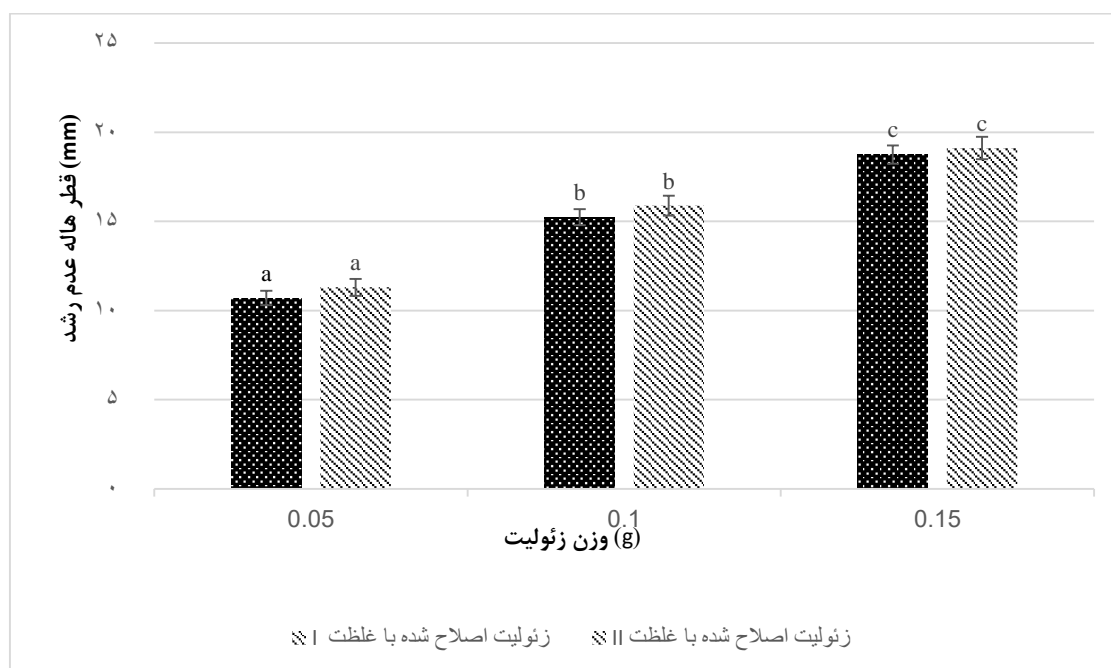


شکل ۴- نمودار میزان بازدارندگی رشد باکتری یرسینیا روکری در نمونه شاهد و غلظت‌های I و II زئولیت اصلاح شده. حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح (P < 0.05) است.



شکل ۵- تصویرآزمون منطقه مهار رشد باکتری *Yersinia ruckeri* برای زئولیت اصلاح شده در  $10^4 \text{ CFU/ml}$ .  
 (۱)  $0.1 \text{ g}$  زئولیت اصلاح شده با غلظت I. (۲)  $0.05 \text{ g}$  زئولیت اصلاح شده با غلظت II. (۳)  $0.1 \text{ g}$  زئولیت اصلاح شده با غلظت I. (۴)  $0.1 \text{ g}$  زئولیت اصلاح شده با غلظت II. (۵)  $0.15 \text{ g}$  زئولیت اصلاح شده با غلظت I. (۶)  $0.15 \text{ g}$  زئولیت اصلاح شده با غلظت II.





شکل ۶- نمودار قطر هاله عدم رشد باکتری *Yersinia ruckeri* بر حسب (mm) برای وزن‌های مختلف. حروف لاتین مشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف غیرمعنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح ( $P < 0.05$ ) است.

#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

و تراکم زنجیره پلیمری بستگی دارد (John et al., 2011). لذا، پلیمرهایی با وزن ملکولی بیشتر احتمالاً توانایی بیشتری در نابودی باکتری‌ها دارند. همچنین دلیل ضدباکتریایی بودن پلیمر PEI احتمالاً می‌تواند به دلیل خاصیت درخت‌سانی، ساختار منظم و پرشاخه، فضاهای خالی مابین شاخه‌ها و ماکرو مولکول بودن پلیمر باشد. این ویژگی‌ها سبب افزایش سطح ویژه نانو دندریمرها می‌شود و با افزایش هر نسل سطح ویژه آن افزایش پیدا می‌کند. بالا بودن سطح ویژه به نانو دندریمرها اجازه فعالیت در سطح بیشتری را می‌دهد و در نتیجه باکتری‌های موجود در محلول را در شاخه‌های میانی و انتهایی خود به دام انداخته و مانع از فعالیت و تولیدمثل باکتری‌ها می‌شود (Izanloo et al., 2015). در پژوهش حاضر از پلی اتیلن ایمین با وزن ملکولی<sup>۸</sup> کم (MW = 2000) که نسبت به

مکانیسم اثر ضدباکتریایی پلیمرهای آمین‌دار مانند پلی اتیلن ایمین به فعل و انفعالات الکترواستاتیکی بین بخش کاتیونی (گروه آمینی) و بخش آنیونی سطح سلول باکتری همراه با اختلال در دیواره سلولی نسبت داده می‌شود (Strydom et al., 2013). این گروه‌های عاملی ( $\text{NH}_2$ ) روی سطوح سلول باکتریایی جذب شده و از طریق دیوار سلولی نفوذ می‌نمایند. سپس به غشای سیتوپلاسمی متصل شده و آن را متلاشی می‌کنند. در این هنگام الکتروولت‌هایی مانند یون‌های پتاسیم و فسفات از باکتری آزاد می‌شوند که در نتیجه به مرگ سلول باکتریایی می‌انجامد. بنابراین، خاصیت ضد میکروبی این دسته از پلیمرها به واسطه اختلال در غشای داخلی و خارجی باکتری‌ها که از طریق گروه‌های انتهایی آمینی صورت می‌گیرد (Izanloo et al., 2014). این خاصیت به شدت به طول

<sup>۸</sup> Molecular mass

شده توسط نانوذرات نقره مطابقت دارد (Sarkheil *et al.*, 2016).

اما در آزمون حداقل غلظت بازدارندگی نشان داده شد که در غلظت باکتریایی  $10^3$  CFU/ml<sup>-1</sup> هر دو ژئولیت اصلاح شده با غلظت‌های متفاوت نسبت به ژئولیت طبیعی اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنتی‌باکتریایی دارند، بدین ترتیب که در OD600nm عدد جذب برای ژئولیت طبیعی ۰/۰۵ و برای ژئولیت پوشش داده شده با دو غلظت I و II به ترتیب ۰/۰۲۳ و ۰/۰۱۵ است که نشان‌دهنده ۵۴ و ۷۰ درصد کاهش بار باکتریایی نسبت به گروه شاهد است. همچنین در غلظت‌های کمتر ژئولیت اصلاح شده با غلظت II می‌تواند بیشترین خاصیت آنتی‌باکتریایی را داشته باشد. اما احتمالاً به دلیل وزن ملکولی کم پلیمر PEI ژئولیت پوشش داده شده در غلظت‌های بالاتر از  $10^3$  CFU/ml<sup>-1</sup> قدرت مهار باکتریایی را ندارد. همچنین نتایج مطالعه (Gholami *et al.*, 2016) با عنوان ارزیابی تاثیر ضدباکتریایی پلیمر پلی‌آمیدوآمین در محیط آبی موید تاثیر زیاد این پلیمر در از بین بردن باکتری گرم مثبت و منفی است. در مطالعه‌ای دیگر اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر پلی‌پروپیلن ایمین نسل دوم نشان داد که غلظت  $500 \mu\text{g/ml}$  میکرو گرم در میلی لیتر از این ماده با تاثیر مهار کنندگی رشد باکتری، قادر است باکتری‌هایی مانند اش‌ریشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس را به‌طور کامل حذف کند. نتایج فوق با نتایج پژوهش کنونی همخوانی دارد (Izanloo *et al.*, 2015). در نهایت پس از جمع‌بندی و مقایسه نتایج پژوهش با سایر پژوهش‌ها می‌توان نتیجه گرفت ژئولیت پوشش داده شده با پلیمر PEI با وزن ملکولی کم می‌تواند به عنوان یک بستر ضدباکتریایی عمل کند و به خوبی در غلظت باکتریایی  $10^3$  CFU/ml<sup>-1</sup> این خاصیت را از

پلی اتیلن‌هایی با وزن بالا، میزان سمیت کمتری در محیط آب دارد استفاده شده است. هرچند این موضوع خاصیت ضد باکتریایی بودن را کمتر نشان می‌دهد، اما با این حال در صورت استفاده از ژئولیت پوشش داده شده با PEI در آب و رهایش احتمالی پلی اتیلن ایمین سمیت کمی برای آبری خواهد داشت. معلق بودن ذرات ضدباکتریایی در محیط آبی می‌تواند موجب خطرات بسیاری از جمله مسمومیت و آسیب بافتی به آبری شود، زیرا این ذرات می‌توانند به بافت‌های مختلف آبری از جمله پوست، آبشش، کبد، کلیه و روده آسیب جدی برسانند و یا باعث برهم خوردن تعادل یونی در سطح آبشش گردد. در همین راستا (Agnihotri *et al.*, 2013) در مطالعه خود از نانوذرات نقره (AgNPs) ثابت شده در یک سطح سیلیس آمین‌دار استفاده کردند و خواص آنتی‌باکتریایی آن را مورد مطالعه قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که تاثیر آنتی‌باکتریایی نانوذرات نقره ثابت شده در یک بستر بیشتر از نانوذرات نقره کلونیدی در آب است.

در پژوهش کنونی پیدایش پیک‌های N و C نسبت به ژئولیت طبیعی در آزمون EDX تایید می‌کند که پلیمر در سطح ژئولیت وجود دارد. اما با وجود اصلاح ژئولیت با غلظت‌های متفاوت و دوبرابری پلیمر بین غلظت‌های I و II اختلاف زیادی در میزان پلیمر ثابت شده در سطح ژئولیت مشاهده نشده است. دلیل این امر را می‌توان به عدم وجود کافی گروه‌های (-OH) فعال در سطح ژئولیت نسبت داد (Alishiri *et al.*, 2017). در آزمایش آنتی‌بیوگرام یا آزمون منطقه مهار رشد روی پتری دیش، بررسی منطقه زیرین ژئولیت‌ها پس از طی شدن زمان انکوباسیون نشان داد که به جز گروه شاهد در بقیه تیمارها باکتری رشد نکرده است که این موضوع با نتایج حاصل از تحقیق پیشین مبنی بر حذف باکتری ویبرو توسط قطعات سیلیس اصلاح

خود بروز می‌دهد.

## تشکر و قدردانی

گروه شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران جهت تامین مواد مورد نیاز پژوهش که ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نماید.

نگارنده بر خود لازم میداند مراتب تشکر صمیمانه را از

## References

## ۵. منابع

- 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(-), 7328-7340.
- Ahmed, S., Chughtai, S., Keane, MA., 1998. The removal of cadmium and lead from aqueous solution by ion exchange with Na Y zeolite. *Separation and purification technology* 13(1),57-64.
- Akhlaghi, M., Sharif Yazdi, H., 2008. Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research Shiraz University* 9(4), 347-352.
- 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).
- Boyd, C. E., Tucker, C. S., 1998. Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer Academic Publishers, Boston, 711 p.
- 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).
- 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. *Arak University Medicin Sciences Journal* 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. *Arak University Medicin Sciences Journal* 18(6),8-16.
- Johari, S.A., Kalbassi, M.R., Soltani, M., Yu, I.J., 2016. Application of nanosilver-coated zeolite as water filter media for fungal disinfection of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Aquaculture. International* 24 (1), 230-338.
- John-Bruce, D., Green, T., Mark A., 2011. Immobilized Antimicrobial Agents: A Critical Perspective. Science against microbial pathogens: *communicating current research and technological advances*. 84-98.
- Khoobi, M., Modiri Delshad, T., Vosooghi, M., Alipour, M., Hamadi, H. 2014. Polyethyleneimine-modified superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: An efficient, reusable and water tolerance nanocatalyst. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 375 (2), 217-226.
- Lin, J., Qiu, S.Y., Lewis, K., Klibanov, A.M., 2002. Bactericidal Properties of Flat Surfaces and Nanoparticles Derivatized with Alkylated Polyethylenimines. *Biotechnology Progress* 18(-) 1082-1086.
- Matyar, F., Dincers, S., Kaya, A., Colak, O., 2004. Prevalence and resistance to antibiotics in Gram negative bacteria isolated from retial fish in Turkey. *Annals of microbiology* 54(-), 151-160.
- Milovic, N.M., Wang, J., Lewis, K., Klibanov, A.M., 2005. Immobilized N-Alkylated Polyethyleneimine Avidly Kills Bacteria by Rupturing Cell Membranes with No Resistance Developed. *Biotechnol. Bioeng* 90(-), 715-722.
- Moshtaghi, B., Khara, H., Pazhand, z., Shenavar, A., Fathollahi, R., 2014. The effects of copper sulfate and potassium permanganate bacterial load of water on the skin and gill Persian sturgeon. *Journal of Oceanography* 19(-),125-130 (In Persian).
- Rai, M., Yada, A., Gade, A., 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advance*. 27(-), 76-83.
- Ross, A.J., Rucker, R.R., Ewing, W.H., 1966. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Microbiology* 12(-), 763-770.
- Sarkheil M, Sourinejad I, Mirbakhsh M, Kordestani, Johari A., 2016. Application of silver nanoparticles immobilized on TEPA-Den-SiO<sub>2</sub> as water filter media for bacterial disinfection in culture of Penaeid shrimp larvae. *Aquacultural Engineering* 74(-), 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 SJ, Rose WE, Otto DP, Liebenberg W, de Villiers M.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. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(-), 475-492.
- Timothy, J.W., Gregory, D.W., 2005. Construction of a virulent, green fluorescent protein tagged *Yersinia ruckeri* and

---

detection in trout tissues after intraperitoneal and immersion challenge. *Diseases of Aquatic Organisms* 67(3), 267-272.