شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲
صفحات ۱۶۴-۱۵۳

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

مصطفی علی‌شیری[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 ارسال: ۱۴۰۰/۰۹/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۳

چکیده

استفاده از موادی مؤثر به‌منظور مهار باکتری‌ها در محیط آبی به‌دلیل استفادهٔ بی‌رویه و طولانی مدت از مواد ضدباکتریایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری به‌نظر 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 به‌منظور استفاده از خاصیت آنتی‌باکتریایی می‌تواند مورد نظر باشد: از جمله این سطوح که کاربرد زیادی در آبزی‌پروری 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 به‌وسیلهٔ 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 باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا و در روز دهم آزمایش به‌ترتیب ۵۰، ۱۲۵، ۱۲۵، ۳۴۸ و ۳۸۰ colony/ ml ۱۰۰ در محیط کشت TSI رشد کرد که نشان‌دهندهٔ کاهش ۶۷/۱ درصد بار باکتریایی در هر دو تیمار اصلاح شده با غلظت I و II پلیمر PEI نسبت به کنترل مثبت است. همچنین میزان بقا پست‌لاروها در تیمار زئولیت اصلاح شده 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 مقایسهٔ 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 آئروموناس‌هیدروفیلا دارد.

واژگان کلیدی: اصلاح زئولیت، آئروموناس‌هیدروفیلا، پلی‌اتیلن ایمین (PEI)

* نویسنده مسئول: علیرضا میرواقفی
Email: avaghefi@ut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 76, No. 1, Spring 2023
pp. 153-164

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

Mostafa Alishiri[1], Alireza Mirvaghfi[2*], Kamran Rezaei Tavabeh[3]

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)

∗ Corresponding author: Alireza Mirvaghfi Email: avaghefi@ut.ac.ir

۱. مقدمه

استفاده بی‌رویه و طولانی مدت از مواد ضدباکتریایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و حضور این مواد در محیط زیست و به‌دنبال آن مقاوم شدن برخی ازگونه‌های باکتری به خصوص باکتری‌های گرم منفی یک مشکل اساسی محسوب می‌شود (Matyar *et al*., 2004). بنابراین استفاده از موادی غیر آنتی‌بیوتیکی و مؤثر به‌منظور مهار باکتری‌ها در محیط آب ضروری به نظر می‌رسد (Rai *et al*., 2009). باکتری آئرومو ناس هیدروفیلا یک باکتری بیماری‌زا هتروتروف، گرم منفی، تاژک‌دار، میله‌ای و متحرک است و به‌طور عمده در مناطقی با آب و هوای گرم یافت می شود. 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، به‌عنوان یک گونهٔ مناسب در تکثیر و پرورش آبزیان مطرح است. امروزه این میگو در بیشتر مناطق جهان تکثیر و پرورش آن توسعه یافته است (New and valenti. 2009). بنابراین، مطالعهٔ کنترل بیماری‌ها در پست‌لارو این گونه که در مراحل اولیه زندگی نیز حساسیت بیشتری به پاتوژن‌ها دارد، حائز اهمیت است.

پلی‌اتیلن ایمین[1] (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 ضدمیکروبی این پلیمر وجود دارد (Lin *et al*., 2002). این خاصیت به ویژگی‌های متعددی مانند بار سطحی، طول و تراکم زنجیرهٔ پلیمری و طول زنجیره های جانبی بستگی دارد (John *et al*., 2011). در پژوهش‌های صورت گرفته خاصیت ضدمیکروبی این پلیمر برای باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* (Milovic *et al*., 2005) و همچنین برای باکتری های *Staphylococcus epidermidis* و *Acinetobacter baumannii* به اثبات رسیده است (Azevedo *et al*., 2014). این پلیمر به‌تنهایی در آب می‌تواند برای آبزیان سمیت ایجاد کند بنابراین ا ستفاده از این پلیمر در سطوح مختلف به‌منظور استفاده از خاصیت آنتی‌باکتریایی آن می‌تواند مورد نظر باشد. از جمله این سطوح که کاربرد زیادی در آبزی‌پروری دارد، زئولیت است که در بخش‌های متعددی شامل آکواریوم‌ها، مخازن نگهداری ماهی، سیستم‌های مداربسته پرورشی و مخازن حمل و نقل آبزیان کاربرد دارد (Boyd and Tucker, 1998). بنابراین این پژوهش، با هدف بررسی پوشش سطحی پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI) در سطح زئولیت طبیعی (کلینوپتیلولیت) به‌عنوان بخشی از سیستم فیلتراسیون آب مخزن نگهداری پست‌لارو میگوی بزرگ آب شیرین (*M. rosenbergii*) به‌اجرا درآمد و خاصیت آنتی‌باکتریایی آن علیه باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا و شاخص رشد و بقا پست‌لارو میگوی بزرگ آب شیرین نیز مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد مورد استفادهٔ پژوهش

زئولیت مورد استفاده در پژوهش از نوع کلینوپتیلولیت بود. پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI, MW= 2000) و ماده شیمیایی [۲و ۳ اپوکسی پروپوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان ۹۸٪][2]، (EPO, 98% purity) از شرکت سیگما آلدریچ (St. Louis, MO, USA) همچنین تولوئن مورد نیاز از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) و محیط کشت TSB و TSA از کمپانی (Quelab, Canada) تهیه گردید. PL_{12} میگوی آب شیرین از مرکز تکثیر قصر

[1] Polyethylene imine
[2] 2,3 Epoxypropoxy propyl trimethoxysilane

شیرین ا ستان کرماز شاه تهیه شد و به کارگاه بهدا شت گروه شیلات پردیس ک شاورزی و منابع طبیعی داز شگاه تهران انتقال داده شـد. در طول حمل و نقل دما به کمک یخ ثابت و در ۲۵±۲°C نگه داشته شد. هچنین برای انجام آزمایش به هر مخزن ۱۰۰ قطعه پستلارو ($PL_{۱۲}$) ا ضافه شد.

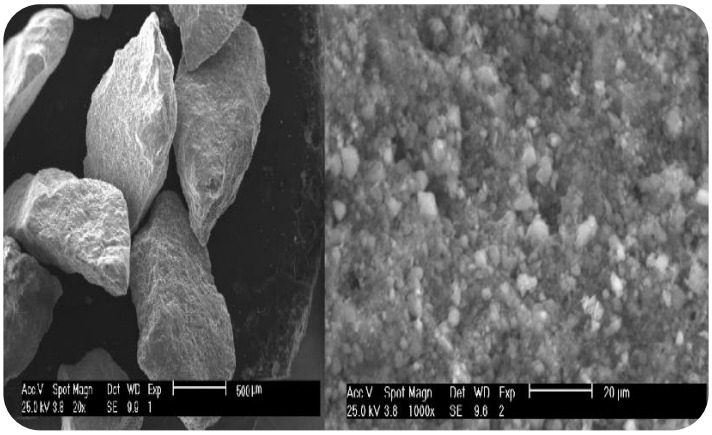
۲.۲. پوشش سطحی زئولیت

۱.۲.۲. فعال‌سازی سطح زئولیت

جهت فعال‌ســازی ســطحی، ابتدا زئولیت‌ها به قطعات کوچکتر تبدیل و از دو الک با قطر چشمهٔ ۰/۹ و ۱ میلی‌متر عبور داده شــدند تا زئولیت‌هایی با ابعاد ۰/۹ تا ۱ میلی‌متر جدا شـوند. سـپس قطعات جدا شـده ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد و به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰°C درجه سانتی‌گراد خشک شدند. جهت فعال سازی سطح زئولیت (تشــکیل پیوندهای OH ســطحی)، زئولیت‌های مذکور را درون ارلن مجهز به مبرد ریخته و به‌مدت ۲۴ ســاعت در اســیدکلریدریک ۶ مولار (HCl 6mol/L) با دمای ۸۰°C درجهٔ سانتی‌گراد (با منبع حرارتی هات پلت) قرار داده شد. پس از آن، زئولیت‌ها ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد و به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰°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. برای پوشــش ســطح زئولیت‌ها با غلظت I به‌ازای هر ۱۵ گرم زئولیت فعال شده ۳۰ میلی‌لیتر تولوئن با ۱ میلی‌لیتر از مادهٔ شیمیایی [۲ و ۳ اپوکسی پروپوکسی پروپیل تری متوکســی ســیلان ۹۸٪] (EPO, 98% purity) و ۱ میلی‌لیتر از پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI, MW= 2000) و برای پوشــش ســطح زئولیت‌ها با غلظت II به‌ازای هر ۱۵ گرم زئولیت فعال شــده ۳۰ میلی‌لیتر تولوئن با ۲ میلی‌لیتر از EPO و ۲ میلی‌لیتر از PEI با هم ترکیب و به‌مدت ۳۶ ساعت در دمای ۸۰±۳°C درجهٔ سانتی‌گراد در ارلن داری مبرد به وسیله مگنت مغناطیسی همزده شد تا با تشکیل پیوند کوالانســی بین دو ترکیب EPO و PEI عامل مورد نظر ایجاد شــود. بعد از تشــکیل پیوندکوالانســی بین دو ترکیب فوق، ۱۵g گرم زئولیت خشک و فعال شده به ازای هر ۳۰ میلی‌لیتر تولوئن درون ارلن مجهز به مبرد ریخته شد و برای ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ °C ۳± درجه سانتی‌گراد با کمک مگنت همزده شــد. این کار باعث می‌شــود دو مادهٔ ترکیب شــده EPO و PEI با تشــکیل پیوند کوالانســی به‌وسیلهٔ 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 ۶۰°C درجه سانتی‌گراد خشک شد (Khoobi *et al.*, 2014). در نهایت از سطح زئولیت ا صلاح شده با ا ستفاده از ت صویر میکروســکوپ الکترونی (SEM) براســاس شــکل ۱، تصویربرداری شد.



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

۳.۲. آلوده‌سازی آب مخازن

جهت آلوده‌سازی آب مخازن (هر مخزن حاوی ۱۰۰ لیتر آب) با باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا به‌ازای هر مخزن (۱۲ مخزن) ۵ میلی‌لیتر آب با بار باکتریایی 10^8 CFU/ml سلول/میلی‌لیتر تهیه و همزمان با انتقال پست‌لاروها به مخازن اضافه گردید. برای تهیهٔ این غلظت باکتریایی از روش تعیین OD به این غلظت باکتریایی خواهیم رسید سپس با ۴ مرتبه رقیق سازی متوالی از ۵ میلی‌لیتر آب با باربا‌کتریایی 10^8 CFU/ml به ۵۰ لیتر آب با بار باکتریایی 10^4 CFU/ml به‌دست می‌آید (Sarkheil *et al.*, 2016).

۴.۲. نمونه‌برداری و تعیین بار باکتریایی آب مخازن

نمونه‌برداری به‌منظور تعین بار باکتریایی آب مخازن، روزانه و به‌مدت ۱۰ روز از تمام مخازن توسط بطری‌های نمونه‌برداری آب، صورت گرفت و ۱۰۰ µl میکرولیتر از نمونهٔ آب هر مخزن به‌طور روزانه در محیط کشت TSA کشت داده شد، سپس در انکوباتور در دمای ۲۵°C درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری و تعدادکلنی‌های رشد کرده شمارش گردید. بدین‌منظور قبل از تعیین بار باکتریایی غلظت‌های متفاوت باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا از غلظت های $1/8\times10^5$ تا $1/8\times10^1$ در محیط کشت TSB کشت داده شد و تعداد کلنی‌های رشد کرده در دمای ۲۵°C بعد از ۲۴ ساعت شمارش گردید و میانگین تعداد کلنی‌ها برای غلظت‌های متفاوت در نظر گرفته شد.

۵.۲. اندازه گیری میزان بقا، وزن و طول پست‌لاروها در طول آزمایش

در روز شروع آزمایش ۱۰۰ قطعه پست‌لارو در هر مخزن وجود داشت که با پودر غذای اکسترود ماهی قزل‌آلا، سفیدهٔ تخم مرغ و دل مرغ چرخ کرده روزانه ۴ مرتبه با فاصلهٔ زمانی ۶ ساعت جهت جلوگیری از هم‌جنس‌خواری تغذیه شدند. جهت اندازه‌گیری طول و وزن پست‌لاروها به‌طور تصادفی از هر واحد آزمایشی ۱۰ قطعه پست‌لارو انتخاب و توسط کولیس دیجیتال طول کل پست‌لاروها (از

۳.۲.۲. آزمایش و تحلیل تأییدکنندهٔ پوشش پلی‌اتیلن‌ایمین

تحلیل FTIR: طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) جهت بررسی ایجاد پیوندهای شیمیایی جدید در مراحل فعال‌سازی و اصلاح زئولیت از این آزمایش استفاده شد. تغییر پیک در طول موج‌های مشخص می‌تواند نشان‌دهندهٔ ایجاد پیوند کوالانسی جدید در ساختار زئولیت باشد.

۴.۲.۲. آماده‌سازی فیلترها، تیماربندی و انتقال پست‌لارو

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 به‌ترتیب 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 به‌ترتیب 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 آئروموناس‌هیدروفیلا)، کنترل مثبت (دارای باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا)، 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 pH=۸±۰/۵۵، EC=۱۳±۸۳۰ µs/cm، TDS=۴۰۰±۲۰mg/l، دورهٔ نوری ۱۲D-۱۲L و دمای آب ۲۷±۱°C تنظیم شد.

ابتدای روستروم تا انتهای تلسون) و با ترازوی حساس وزن خشک پست لاروها پس از ۲۴ ساعت قرارگیری نمونه‌ها در آون با دمای ۱۰۰°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

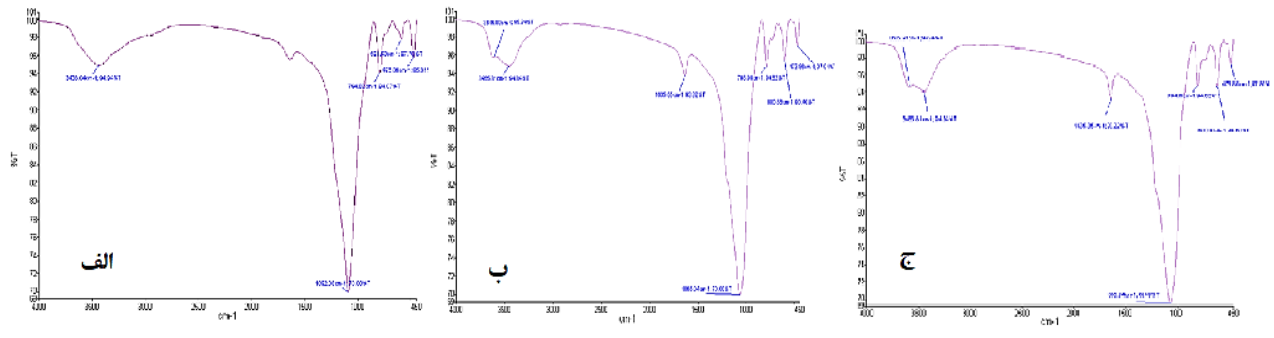
جهت انجام تحلیل آماری از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و گروه‌بندی دانکن براساس شاخص‌های مورد بررسی در سطح خطای ۵ درصد بین تیمارها استفاده شد. همچنین از نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۴ جهت تحلیل داده‌ها و Excel نسخهٔ ۲۰۱۳ جهت رسم نمودار استفاده شد. همچنین کلیهٔ آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام و داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای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

۳. نتایج

۱.۳. تأیید پوشش سطح زئولیت با پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI)

۱.۱.۳. تجزیهٔ FTIR

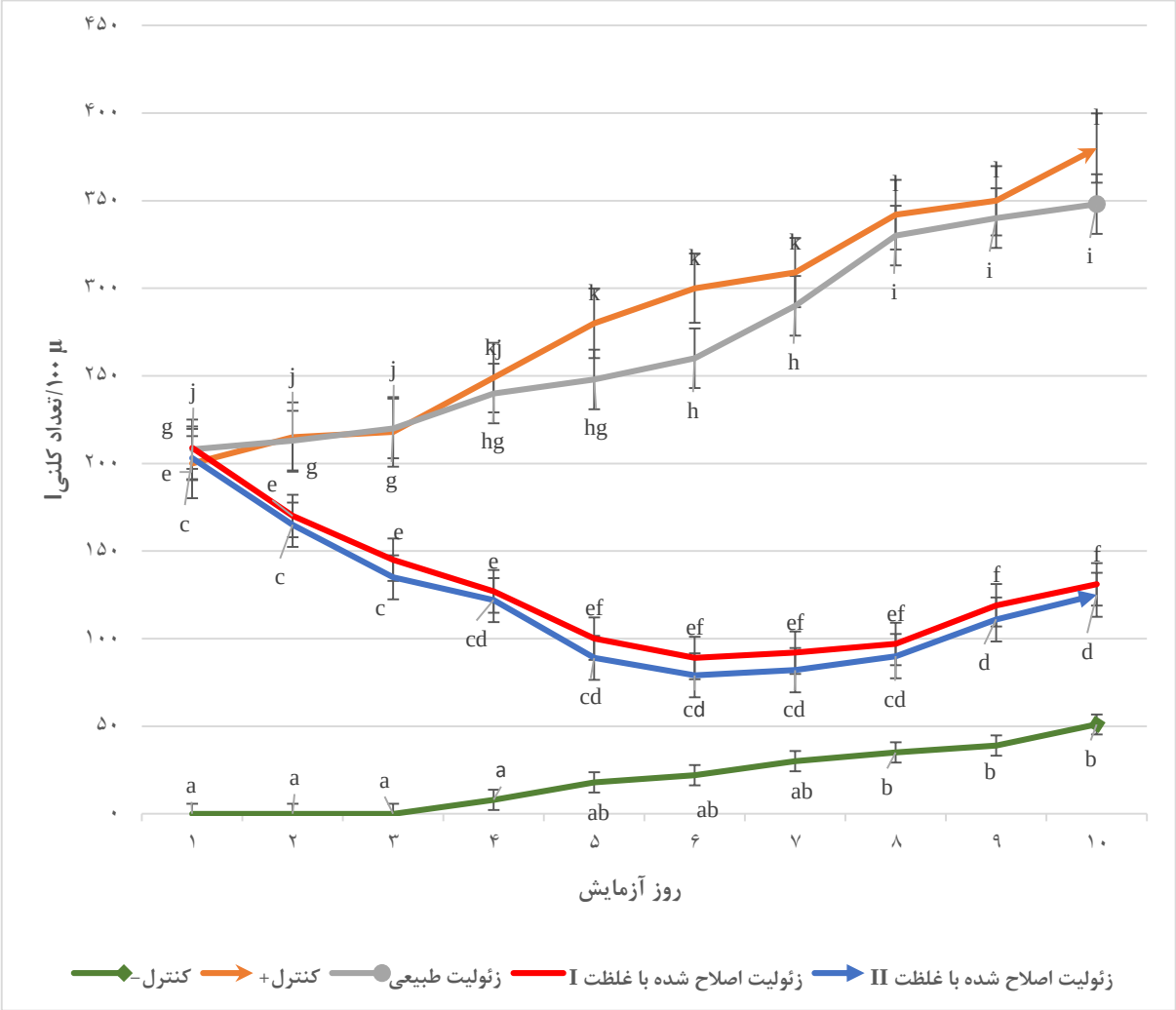
نمودار الف شکل ۲، نشان‌دهندهٔ تجزیهٔ طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز از زئولیت طبیعی است. براساس جدول‌های همبستگی، طیف از زئولیت طبیعی در محدودهٔ عدد موجی cm^{-1} ۳۴۱۶-۳۴۵۶ مربوط به پیوندهای کوالانسی گروه هیدراکسید و O-H است. همچنین پیک طیفی در طول موج cm^{-1} ۱۰۸۲-۱۱۰۲ نشان‌دهندهٔ وجود پیوندهای کوالانسی Si-O-Si است که به‌میزان زیادی در ترکیب زئولیت طبیعی یافت می‌شود. علاوه بر این، پیک موجود در طول موج cm^{-1} ۵۸۹-۵۹۳ نشان‌دهندهٔ وجود Al و پیوندهای Al-O-Al در ترکیب زئولیت طبیعی است (Silapajarn *et al.*, 2006). اما نمودار ب شکل ۲، نشان‌دهندهٔ تجزیهٔ طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز از زئولیت اصلاح‌شده با غلظت I پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین است. در این نمودار تغییراتی نسبت به طیف زئولیت طبیعی وجود دارد. از جمله این تغییرات پیک طیفی در طول موج cm^{-1} ۳۶۰۵-۳۶۲۵ 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 نشان‌دهندهٔ پلیمر PEI در طول موج cm^{-1} ۳۶۱۵-۳۶۳۵ 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.



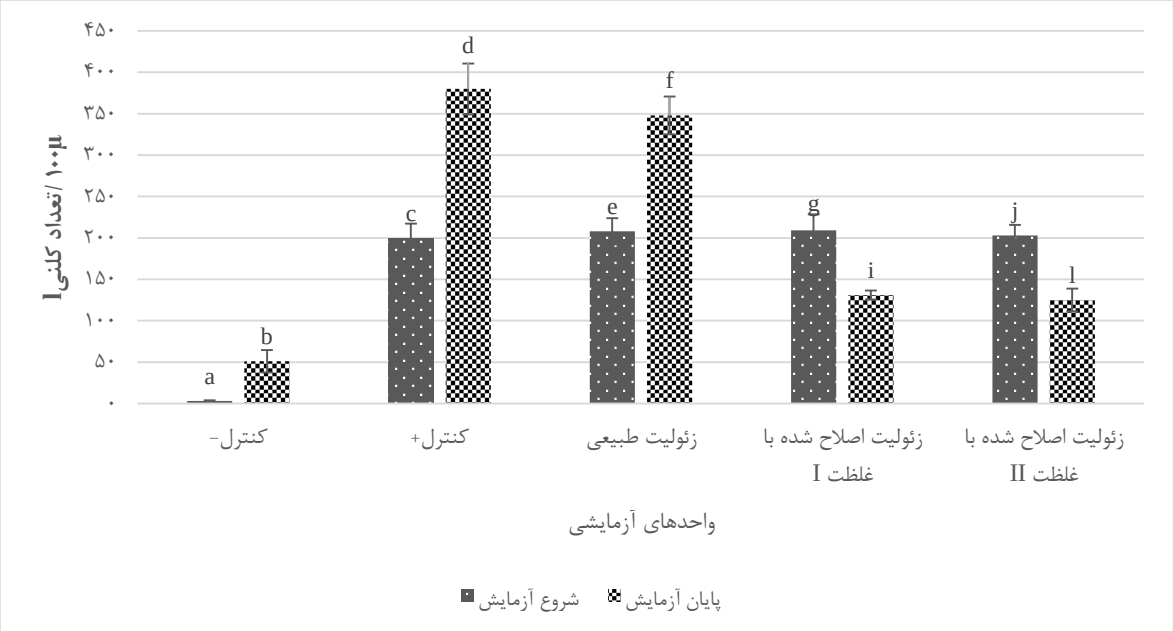
شکل ۳ - نمودار تجزیهٔ طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز از زئولیت طبیعی (الف) و زئولیت اصلاح‌شده با غلظت I (ب) و غلظت II (ج).

۲.۳. تعیین بار باکتریایی آب مخازن در طول دورهٔ آزمایش

نتایج کنترل بار باکتریایی آب در طول دورهٔآزمایش براساس شکل‌های ۲ و ۳ به‌دست آمد. براساس نتایج، در مخازن کنترل منفی (بدون باکتری) تا روز سوم هیچ‌گونه باکتریی در کشت محیط TSA یافت نشد، اما از روز سوم به‌تدریج بار باکتری مخزن افزایش یافت تا در روز دهم به حداکثر میزان خود یعنی ۵۰colony/۱۰۰µl کلونی در میکرولیتر رسید. در مخازن کنترل مثبت (دارای باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا با بارباکتریایی $۱/۸\times۱۰^{۴}$CFU/ ml) نیز افزایش باکتریایی از روز ابتدا تا انتهای دورهٔ آزمایش مشاهده شد، بدین‌ترتیب 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 دورهٔ آزمایش ۳۸۰ کلونی در میکرولیتر شمارش گردید.



شکل ۳- نمودار تعیین بارباکتریایی آب مخازن پرورش پست‌لارو میگوی آب شیرین در طی دورهٔ آزمایش



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

۳.۳. اندازه‌گیری میزان بقا، وزن و طول پست‌لاروها در پایان دوره آزمایش

براســـاس نتایج جدول ۱، میانگین بقا در پایان دورهٔ آزمایش برای گروه کنترل منفی که فاقد هرگونه باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا بود، ۹۵ درصـد بود و با گروه کنترل مثبت و هر ســـه تیمار دارای فیلتر اختلاف معنی‌دار دارد ($P<۰/۰۵$). کمترین میزان بقـا مربوط بـه گروه کنترل مثبت بود که به آن باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا با بار $۱۰^۴$ کلونی در میکرولیتر اضـــافه شـــده و فاقد فیلتر بود، میزان بقا این گروه به‌طور میانگین ٪۷۳ بود و هرچند با تیمـار دارای فیلتر محتوی زئولیـت طبیعی اختلاف معنی‌داری در میزان بقا نداشت ($P>۰/۰۵$). اما با دو تیمار محتوی زئولیت ا صلاح شده دارای اختلاف معنی‌دار ا ست ($P<۰/۰۵$). همچنین میزان بقا برای تیمار دارای فیلتر محتوی زئولیت اصلاح‌شده با غلظت I و II به‌ترتیب به‌طور میانگین ۸۴ و ۸۲ درصد برآورد شد.

در هنگام شـــروع آزمایش میانگین وزن پســـت‌لاروها ۰/۶±۱۲/۳ میلی‌گرم بود. اما براســاس اطلاعات جدول ۱، بعد از ده روز دورهٔ آزمایش پســـت‌لاروها رشـــد کرد و در تمام تیمار ها به‌جز مخازن دارای فیلتر محتوی زئولیت طبیعی وزن پست‌لاروها به بیش از ۶۰ میلی‌گرم ر سیدند و در تیمار دارای فیلتر محتوی زئولیت طبیعی نیز وزن پســـت‌لاروها به‌طور میانگین ۵۸/۴ میلی‌گرم بود. اما از لحاظ افزایش وزن گروه کنترل منفی با تمامی تیمار ها دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P<۰/۰۵$). این درحـالی اســت که هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل مثبت و سه تیمار از لحاظ افزایش وزن وجود ندارد ($P>۰/۰۵$).

نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری طول کل پست‌لاروها نشـــان‌دهندهٔ افزایش طول آن ها در طول دورهٔ ده روزه آزمایش اســـت. طول کل اولیهٔ پســـت‌لاروها ۰/۵۳±۹/۹۷ اندازه‌گیری شد. اما برا ساس نتایج جدول ۱، پس از اتمام دورهٔ آزمایش این مقدار برای گروه کنترل مثبت و منفی و سه گروه تیمار دارای فیلتر، به حدود ۱۴ میلی‌متر ر سید و در این مورد هیچ اختلاف معنی‌داری بین این چهار گروه وجود نداشـــت($P>۰/۰۵$). اما نســـبت به کنترل منفی پست‌لاروها در هر پنج گروه دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($P<۰/۰۵$).

جدول ۱- مقایسهٔ میزان بقا، وزن و طول پست‌لاروهای دو گروه کنترل مثبت و منفی و تیمارها در روز دهم آزمایش

شاخص ها	کنترل منفی	کنترل مثبت	زئولیت طبیعی	زئولیت I	زئولیت 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 نتیجه‌گیری نهایی

نتایج حاصل از بررسی تأثیر فیلترهای اصلاح شده با پلیمر PEI بر روند بارباکتریایی آب مخازن نگهداری PL_{12} میگوی آب شیرین بیانگر کارایی آن در سیستم مداربسته 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، به‌عنوان یک فیلتر ضدباکتریایی برای گونه‌های مختلف باکتریایی تأکید داشته‌اند. در این پژوهش از پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین با وزن ملکولی کم (MW=2000) به‌دلیل 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 به‌دنبال دارد. در همین راستا Agnihotri و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعهٔ خود از نانوذارت نقره (AgNPs) ثابت‌شده در یک سطح سیلیس آمین‌دار استفاده کردند و خواص آنتی‌باکتریایی آن را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مطالعهٔ آن‌ها نشان داد که تأثیر آنتی‌باکتریایی نانوذرات نقرهٔ ثابت‌شده در یک بستر بیشتر از نانوذرات نقرهٔ کلوئیدی در آب است.

خاصیت ضد میکروبی این دسته از پلیمرها به‌واسطهٔ 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 آئروموناس‌هیدروفیلا با پلیمرهای ثابت شده روی زئولیت اصلاح شده با پلیمر PEI فراهم بود به‌همین دلیل، احتمالاً با برخوردهای مکرر باکتری‌ها در چرخش‌های متمادی با بخش‌های آنیونی سطح باکتری و بخش کاتیونی پلیمر (NH_2)، اختلال در دیواره سلولی باکتری ایجاد شده است (Strydom *et al.*, 2013). این گروه‌های عاملی (NH_2) روی سطوح سلول باکتریایی جذب‌شده و از طریق دیوارهٔ سلولی نفوذ می‌نمایند. سپس به غشای سیتوپلاسمی متصل شده و آن را متلاشی می‌کنند. در این هنگام الکترولیت‌هایی مانند یون‌های پتاسیم و فسفات از باکتری آزاد می‌شوند که در نتیجه به مرگ سلول باکتریایی می‌انجامد (John *et al.*, 2011). این خاصیت به‌شدت به طول و تراکم زنجیرهٔ پلیمری بستگی دارد. بنابراین پلیمرهایی با وزن ملکولی بیشتر احتمالاً توانایی بیشتری در نابودی باکتری ها دارند (Izanloo *et al.*, 2015).

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

نحوهٔ کاهش تعداد باکتری ها در مخازن دارای فیلتر

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 اصلاح شده، 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 دورهٔ 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 تجدید شونده است، زیرا هیچ باکتری‌ای در روز نخست به آب این گروه اضافه نشده بود و دلیل ایجاد کلنی در کشت نمونهٔ 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 باکتری های تنظیم‌کنندهٔ چرخهٔ آب) در محیط و نیز تکثیر و ازدیاد باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا 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 به‌واسطهٔ گروهای 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 دناتوره (تغییر ساختار) شدن پروتیین‌های غشایی شده و شروع به سوراخ نمودن فسفولیپید می‌کند. در این مرحله نفوذپذیری بالای غشا 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 به‌دلیل هر دو احتمال افزایش فلور طبیعی پستلاروها به آب و یا احتمال وجود باکتری‌های چرخهٔ آب 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 به‌ترتیب ۱۱ و ۱۳درصد افزایش بقا را برای تیمار دارای فیلتر محتوی زئولیت اصلاح شده با غلظت I و II نسبت به گروه کنترل مثبت داشته باشند.

۵. نتیجه‌گیری نهایی

در نهایت پس از جمع‌بندی و مقایسهٔ 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 کارشناسی‌ارشد دفاع شده در گروه شیلات دانشکدهٔ 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.

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 dendrimeron 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., Klibanov, 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., Klibanov, 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-SiO2aswater filter media for bacterial disinfection in culture of Penaeidshrimp 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.