مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۱، ۷۱-۶۳
Original Article
Journal of Veterinary Research. 70,1:63-71, 2015

کاربرد فوم‌های پلی اورتان محتوی زئولیت نقره در سیستم فیلتراسیون آب پرورش بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به منظور کنترل عفونت ناشی از استرپتوکوکوس اینیایی

اطهرالسادات شهیم[1] محمد رضا کلباسی[1*] مهدی سلطانی[2] سید علی جوهری[3]

۱) گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور - ایران
۲) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۳) گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه کردستان، سنندج - ایران

(دریافت مقاله: ۱۴ آذر ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۶ بهمن ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: زئولیتی که حاوی یون‌های نقره باشد می‌تواند در ترکیب با انواع پلیمرهای مصنوعی فعالیت ضدباکتریایی از خود نشان دهد. **هدف:** هدف از انجام تحقیق حاضر استفاده غیر مستقیم از زئولیت نقره در کنترل عفونت ناشی از باکتری استرپتوکوکوس اینیایی می‌باشد که در سال‌های اخیر در برخی از مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان ایران ایجاد بیماری نموده است. **روش کار:** در این راستا از فوم‌های پلی اورتان ترکیب یافته با زئولیت نقره (به میزان ۱۰ و ۲۰٪) در سیستم فیلتراسیون نیمه مدار بسته پرورش بچه ماهی قزل‌آلا استفاده شد. پس از اضافه کردن باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به آب به میزان 10^5 Cell/mL، کارایی فیلترهای مذکور در مهار این باکتری از طریق سنجش بار باکتریایی آب، بررسی علائم بالینی بیماری و باکشت از اندام‌های کلیه و طحال و وضعیت آلودگی بافت‌ها ارزیابی گردید. **نتایج:** نتایج آزمایشات آنتی بیوگرام و آلوده‌سازی آب با باکتری مذکور نشان داد که فیلترهای محتوی ترکیبات نقره توانستند به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بار باکتریایی آب را تا میزان 10^2 کاهش دهند ($p<0/05$). از بین فیلترهای مذکور فیلتر حاوی ۱۰٪ زئولیت نقره از کارائی بالاتری برخوردار بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج به دست‌آمده مؤید آن است که زئولیت نقره در ترکیب با فوم‌های پلی اورتان می‌تواند از پتانسیل کافی در کاهش حدت بیماریزایی و مهار بیماری عفونی ناشی از باکتری مذکور در سیستم نیمه مدار بسته ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برخوردار باشد. توسعه این فیلترها می‌تواند به عدم استفاده از داروهای شیمیایی در کنترل بیماریهای عفونی آبزیان منجر گردد.

واژه‌های کلیدی: فوم پلی اورتان، قزل‌آلای رنگین‌کمان، زئولیت نقره، استرپتوکوکوزیس

مقدمه

با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهان، تقاضا برای محصولات غذایی و از جمله آبزیان بیشتر شده است و به نظر می‌رسد که در آینده سهم زیادی از این تقاضا از طریق آبزی پروری تأمین شود. در این خصوص پرورش ماهیان سردابی و بویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از جایگاه خاصی برخوردار بوده و در سال‌های اخیر در کشور ما توجه فراوانی به آن شده و بخش اصلی آبزی پروری را به خود اختصاص داده است. تجربه کشورهای موفق در امر آبزی پروری نشان داده است که سرمایه گذاری در امر بهداشت آبزیان لازمه توسعه پایدار در این صنعت است و بی توجهی به آن، این صنعت را با چالش‌های جدی در آینده مواجه خواهد کرد.

تاکنون انواع متعددی از داروهای ضد باکتریایی شناسایی و جهت کنترل بیماریهای عفونی مورد استفاده قرار گرفته‌اند، اما به دلیل استفاده بی رویه و طولانی مدت از این مواد، بسیاری از سویه‌های باکتری به آنها مقاوم شده‌اند. با توجه به گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک‌ها و محدودیت استفاده از آنها به دلیل باقی مانده‌های دارویی استفاده از مواد یا شیوه‌های جایگزین دیگری که بتواند بر مهار باکتری‌ها مؤثر واقع شود ضروری است (۱۸).

نقره از جمله ترکیبات غیرآلی است که از زمان‌های بسیار دور به صورت فلزی و نیز یونی (نیترات نقره) در درمان سوختگی‌ها، زخم‌ها و برخی عفونت‌های باکتریایی مورد توجه بوده است. پس از ظهور آنتی بیوتیک‌ها خاصیت ضد میکروبی نقره کمتر مورد توجه بوده، ولی پس از محدودیت استفاده از آنتی بیوتیک‌ها توجه دوباره‌ای به آن شده است (۱۸). مطالعات مختلف انجام شده در خصوص تأثیر فلز و یون نقره بر باکتری‌ها مؤید آن است که این ترکیبات می‌توانند بر غیر فعال کردن باکتری‌ها مؤثر باشند (۴).

زئولیت‌ها جامدات بلورین با منافذ ریزی هستند که روزنه‌ها، حفره‌ها و کانال‌هایی به ابعاد ۳ تا ۱۰ آنگستروم دارند (۲۷). زئولیت در حقیقت آلومینوسیلیکات سدیم آبدار است و به علت خواص فیزیکی و شیمیایی بی نظیرشان مثل خاصیت جذب گازها، جذب عوامل سمی و جا به جائی یونی، به عنوان فیلترهای تصفیه آب به کار می‌روند (۱۳،۲۹).

ترکیب نقره با زئولیت به نام زئولیت نقره می‌باشد. زئولیت کشش قوی نسبت به یون نقره نشان می‌دهد و می‌تواند از طریق الکترواستاتیکی تا نزدیک به ۴۰٪ وزنی، یون نقره را در ساختار خود محصور نماید (۲۷). زئولیت نقره، می‌تواند در ترکیب با انواع رزین‌ها و پلیمرهای مصنوعی فعالیت ضد باکتری و ضد قارچی از خود نشان دهد (۲۷،۲۸) در حال حاضر مطالعات متعدد مؤید قابلیت استفاده از زئولیت نقره در مصارف بهداشتی

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۱۲۲-۶۲۵۳۱۰۱ نمابر: ۰۱۲۲-۶۲۵۳۴۹۹ Email: kalbassi_m@modares.ac.ir

و پزشکی می‌باشند (۶،۱۲،۱۴).

یکی ازمعضلاتی که به تازگی گریبان‌گیر صنعت آبزی پروری کشور شده است، شیوع بیماریهای واگیردار در مزارع پرورشی آبزیان است. از این دسته می توان به بیماری استرپتوکوکوزیس اشاره کرد که در سال‌های اخیر تلفاتی را در مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی استان‌هایی همچون فارس و مازندران ایجاد کرده است (۲۳).

باکتری استرپتوکوکوس از انواع ماهیان آب شیرین و شور جداسازی شده است و انتقال آن به صورت افقی و تماس مستقیم با ماهی مبتلا یاغذای آلوده صورت می‌گیرد (۲۰). مطالعات متعددی درخصوص بیماریزایی، شناسایی و همه‌گیر شناسی این بیماری از مزارع تکثیر و پرورش قزل‌آلای کشور انجام گرفته است که از آن جمله می توان به مطالعات Akhlaghi و Keshavarz در سال ۲۰۰۲، Soltani و همکاران در سال ۲۰۰۹، Soltani و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Soltani و همکاران در سال ۲۰۰۸، اشاره نمود. حاصل این مطالعات بیانگر حضور این بیماری در مزارع قزل‌آلای کشور و امکان همه گیری آن در آینده می‌باشد. به‌علاوه در این مطالعات گونه عمده درگیر در بروز بیماری استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل‌آلای ایران استرپتوکوکوس اینیایی شناسایی و معرفی شده است (۲۴).

علایم کلینیکی قابل مشاهده در این بیماری شامل شنای عمودی، تیرگی پوست، بیرون زدگی یک یا دو طرفه، کدورت قرنیه، خونریزی در داخل یا اطراف کره چشم، سرپوش آبششی، قاعده باله‌ها، مقعد، قلب یا در نقاط دیگر بدن و بیرون زدگی مخرج می‌باشد (۲۲). در بررسی‌های کالبدگشایی ممکن است مایعات خون آلود در محوطه شکمی دیده شود. طحال بزرگ و قرمز رنگ، کبد رنگ پریده، تورم و آماس در اطراف قلب و کلیه نیز دیده می‌شود (۲۲،۲۳). محیط کشت اختصاصی باکتری استرپتوکوس اینیایی ژلوز خوندار می‌باشد (۲۳).

با توجه به توانایی زئولیت نقره در قرارگیری بر روی فوم‌های پلی اورتان، در این بررسی از فوم‌های حاوی زئولیت نقره در کنترل عفونت ناشی از باکتری استرپتوکوکوس اینیایی استفاده شد.

با توجه به موارد فوق الذکر و با عنایت به احتمال شیوع این بیماری در ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان، در این بررسی کارائی زئولیت نقره در ترکیب با فوم‌های پلی اورتان به‌عنوان یک فیلتر تصفیه کننده آب و به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک‌ها در مهار این بیماری، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

خصوصیات مواد مورد استفاده: زئولیت نقره مورد استفاده نوع AJ10N با نام تجاری زئومیک بود که از شرکت ژاپنی Nagoya - Sinanen تهیه گردید. بر اساس اطلاعات این شرکت، ماده مذکور محتوی ۲/۵٪ وزنی یون نقره است که به‌طور الکترواستاتیک در ۸۴٪ وزنی زئولیت نوع A محصور شده و علاوه بر آن محتوی ۱۳/۵٪ وزنی فلز روی نیز می‌باشد. متوسط ابعاد زئولیت در این محصول ۲/۵μL میس باشد. مواد اولیه سازنده فوم پلی اورتان مورد استفاده پُلی اُل و ایزوسیانات بود (۵).

درجه سختی این فوم‌ها بسته به نسبت پُلی اُل به ایزوسیانات متفاوت خواهد بود. به طوری که هر چه نسبت ایزوسیانات به پُلی اُل بیشتر باشد، ساختار فوم‌های حاصله سخت تر می‌گردد (۵). در این مطالعه از آنجا که نیاز به تولید فوم‌هایی با قابلیت مناسب عبور آب در فیلترهای تصفیه آب بود، پس از ترکیب نسبت‌های مختلف این دو ماده، نسبت ۴ به ۱ پُلی اُل به ایزوسیانات بهترین حالت جهت عبور آب از فوم‌ها در داخل فیلترهای تصفیه آب شناخته شد. سپس پودر زئولیت نقره به مقدار ۱۰ و ۲۰٪ وزن خشک فوم نهایی با پُلی اُل مخلوط و سپس ایزوسیانات به آن اضافه گردید تا فوم‌های مذکور در قالب‌های استوانه‌ای شکل مورد نظر شکل نهایی خود را به دست آورند. فوم‌ها پس از شکل‌گیری و خشک شدن، شسته و در دمای محیط خشک گردیدند (۵).

سپس فوم‌های مورد نظر در فیلترهای تصفیه آب آکواریوم (BOYU sp2500) با دبی ثابت ۲۳L/min جایگزین شدند و پلی استر موجود در محفظه این فیلترها خارج گردید. از فوم بدون زئولیت نقره نیز به عنوان گروه شاهد استفاده شد و هر تیمار در سه تکرار آزمایش گردید.

جهت حصول اطمینان از نحوه مناسب توزیع زئولیت نقره در فوم‌های مختلف، آزمایش XRD (Spectrometer PW2404, Netherland Philips,) جهت بررسی ایجاد پیوند بین ذرات نقره و ملکول‌های سازنده پلی اورتان آزمایش FT-IR (Shimatzu, 8400S, Japan) و به منظور مشاهده ساختار فوم‌های تولید شده و مشاهده ذرات زئولیت نقره بر روی آنها، از تصویر برداری توسط میکروسکوپ الکترونی SEM (Holland Philips, XL30,) استفاده گردید.

استوک خالص باکتری استرپتوکوکوس اینیایی از گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید؛ که از تلفات ماهیان قزل‌آلا مزارع کشور جداسازی و شناسایی گردیده بود (۲۴). برای تهیه سوسپانسیون باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به میزان لازم از پرگنه‌های باکتری روی محیط ژلوز خون برداشته و به داخل یک لوله آزمایش محتوی بافر نمکی فسفات (NaCl ۷/۲g، Na2HPO4 ۱/۴۸g، KH2PO4 ۰/۴۳g در ۱L آب مقطر) اضافه و پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی غلظت باکتری‌ها با محلول مک فارلند ۱ (۰/۱ mL BaCl2 ۱٪، ۹/۹ mL H2SO4 ۱٪) مقایسه گردید تا تعداد 3×10^{8} Cell/mL باکتری در سوسپانسیون مورد نظر وجود داشته باشد.

به منظور بررسی خاصیت ضد باکتریایی فوم‌های مورد مطالعه از دو روش آزمایشگاهی، آزمایش آنتی بیوگرام روی پتری دیش و آزمایش آنتی بیوگرام داخل لوله به همراه روش تجربی Flow Test (چالش با باکتری) استفاده شد.

روش‌های in vitro جهت آزمایش خاصیت ضد میکروبی فوم‌های

تولیدی آزمایش آنتی بیوگرام روی پتری دیش برای انجام این آزمایش ۱۰µL از سوسپانسیون باکتری استرپتوکوکوس اینیایی با تراکم 10^{8} Cell/mL داخل لوله آزمایش محتوی ۱۰mL آب مقطر استریل ریخته شد تا 10^{5} سلول در لوله وجود داشته باشد سپس میزان ۱۰µL از سوسپانسیون باکتری (حاوی 10^{5} Cell/mL) به محیط ژلوز خون دار تلقیح و کشت سطحی انجام شد. سپس قطعه‌ای به ابعاد ۲×۲ Cm از فوم‌های محتوی زئولیت نقره در وسط پتری دیش‌ها قرار داده شد و بعد از ۲۴h نگهداری در انکوباتور، تعداد سلول‌های باکتری در منطقه زیر فوم شمارش گردید (۸).

آزمایش آنتی بیوگرام داخل لوله: برای انجام این آزمایش ۱۰µL از سوسپانسیون باکتری استرپتوکوکوس اینیایی با تراکم 10^{8} Cell/mL داخل لوله‌های آزمایش محتوی ۱۰mL آب مقطر استریل ریخته شد تا در هر لوله 10^{5} سلول باکتری حضور داشته باشد. سپس به هر لوله یک تکه به ابعاد ۱×۹×۵/ Cm از فوم‌های مختلف محتوی زئولیت نقره و به عنوان شاهد هم در یک لوله آزمایش کاملاً مشابه یک تکه هم اندازه فوم پلی اورتان معمولی قرار داده شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه فوم‌ها برداشته شده و در لوله‌ای تمیز و خالی فشرده شد تا آب آلوده از آن خارج گردد. سپس با رقت‌های 10^{-1}، 10^{-3} و 10^{-5} رقیق سازی شد و از هر رقت میزان ۱۰µL بر روی محیط کشت ژلوز خوندار کشت داده شده و پس از ۲۴h انکوباسیون در دمای ۳۰°C تعداد پرگنه‌های رشد کرده مورد بررسی قرار گرفت (۸).

روش In vivo یا چالش با باکتری: تحقیق حاضر بر روی ۱۳۵ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (با میانگین وزن g ۲۰-۱۵) در کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان واقع در دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انجام پذیرفت در این خصوص از آکواریوم‌هایی با ابعاد ۴۰ Cm × ۴۰ × ۸۰ و دمای آب ۱°C ±۱۶ استفاده گردید. میزان سختی کل ۳/۶mg/L ±۱۵۰، NH^{4+} ۰/۰۱±۰/۰۱، S^{2-} ۰/۰۰، Mg^{2+} ۱/۱۵±۳۹، Cl^{-} ۰/۲±۲/۴، Na^{+} ۰/۱۱±۱۳/۸، K^{+} ۰/۱±۳/۹ مشخص گردید. در هر یک از آکواریوم‌ها تعداد ۱۵ عدد بچه ماهی قرار داده شد.

به منظور بررسی عملکرد فیلترهای مورد تحقیق در مواجهه و کنترل باکتری در محیط آبی ابتدا لازم بود که آب آکواریوم‌ها با غلظت معینی از باکتری استرپتوکوکوس اینیایی آلوده سازی گردد. بدین منظور باکتری‌های تازه کشت داده شده در محلول بافر نمکی فسفات رقیق شده و غلظت آنها با محلول شماره یک مک فارلند (معادل 10^{8}×۳ Cell/mL) تنظیم گردید. به منظور آلوده سازی آب هر آکواریوم، از ۲۶mL سوسپانسیون مذکور استفاده گردید تا در هر میلی لیتر از آب آکواریوم‌ها غلظت 10^{5} Cell/mL از باکتری مورد نظر وجود داشته باشد.

نمونه برداری از آب آکواریوم‌ها در زمان‌های ۲، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از آلوده سازی آب با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی انجام شد. جهت انجام نمونه برداری، در هر یک از ساعت‌های مذکور از شیشه‌های ۵۰mL تیره که برای هر آکواریوم به صورت مجزا اختصاص داده شده بودند، استفاده گردید. بلافاصله پس از نمونه‌برداری نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شدند. برای شروع کشت از نمونه‌های آب ابتدا رقیق سازی متوالی انجام شد. پس از پایان رقیق سازی ۱۰µL از رقت‌های 10^{-1}، 10^{-3} و 10^{-5} بر روی محیط کشت ژلوز خون دار اضافه شد و به روش کشت سطحی اقدام شد. این کار برای هر یک از نمونه‌ها به طور جداگانه و در ۳ تکرار انجام شد. در انتها پتری دیش‌های کشت داده شده به انکوباتور در دمای ۳۰°C و به مدت ۲۴h منتقل شد. تمامی این مراحل در ساعت‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ پس از آلوده سازی نیز انجام شد. پس از طی شدن زمان انکوباسیون پرگنه‌های رشد کرده بر روی محیط کشت شمارش و ثبت گردید. پس از آخرین مرحله نمونه برداری در ساعت ۹۶، جهت ادامه بررسی رفتار ماهی‌ها مطالعه تا روز ۱۴ ادامه یافت.

بررسی آماری: اطلاعات داده‌های مذکور در نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ تهیه شد. ابتدا نرمالیتی داده‌های حاصل از این تحقیق با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف پردازش گردید. پردازش آماری نتایج حاصله توسط نرم افزار SPSS ۱۳/۲، با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با از آزمون دانکن انجام پذیرفت. مقایسه میانگین‌ها در سطح ۹۵٪ ($p<0/05$) انجام شد.

نتایج

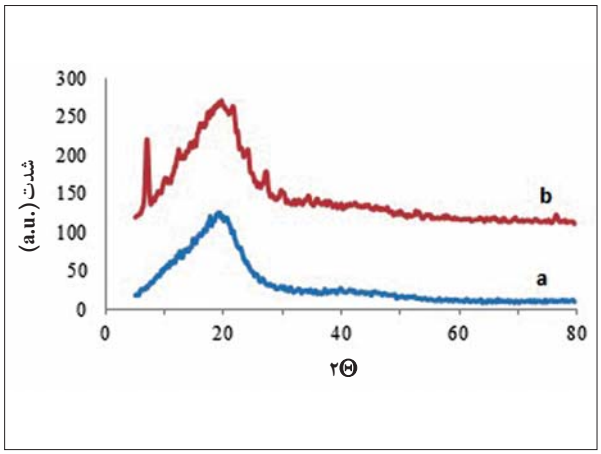
آزمایشات تأیید پوشش نقره: الگوی XRD به دست آمده از نمونه فوم پلی اورتان محتوی زئولیت نقره ساختار کریستاله نقره را در این ترکیب تأیید کرد (نمودار ۱). ساختار این ترکیب به صورت Silver Aluminum Silicate Hydr و با فرمول شیمیایی Ag66.31Si96Al96.90384H27 شناسایی گردید.

طیف FTIR نمونه‌های حاوی زئولیت نقره در مقایسه با گروه شاهد در نمودار ۲ نشان داده شده است.

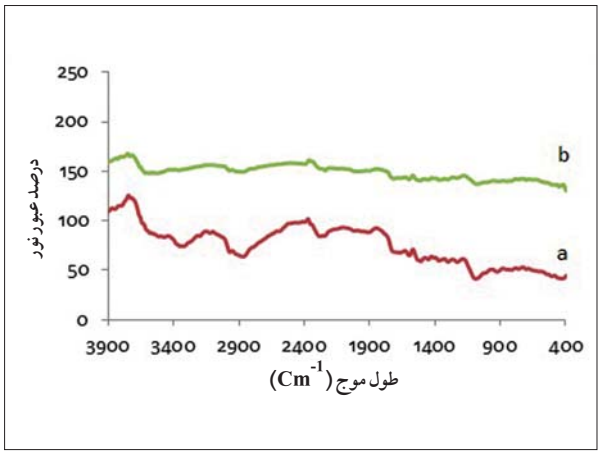
تصاویر تهیه شده از تیمارهای پلی اورتان حاوی زئولیت نقره بوسیله میکروسکوپ الکترونی SEM ثابت کردند که این بسترها به طور کامل توسط زئولیت نقره پوشش داده شده‌اند. مقایسه تصاویر تهیه شده از تیمارهای شاهد و تیمارهای محتوی ترکیبات نقره، وجود ترکیبات مذکور را مورد تأیید قرار دادند (تصویر ۱،۲).

در آزمایش آنتی بیوگرام روی پتری دیش بعد از کشت دادن باکتری بر روی پتری دیش‌های حاوی محیط کشت و طی شدن زمان ۲۴h انکوباسیون، قطعات فوم از پتری دیش‌ها برداشته شد و پرگنه‌های رشد یافته در زیر فوم‌ها شمارش و با نمونه شاهد مقایسه شد. در همه نمونه‌ها به جز نمونه شاهد هیچ پرگنه باکتری در زیر فوم‌ها رشد نکرده بود.

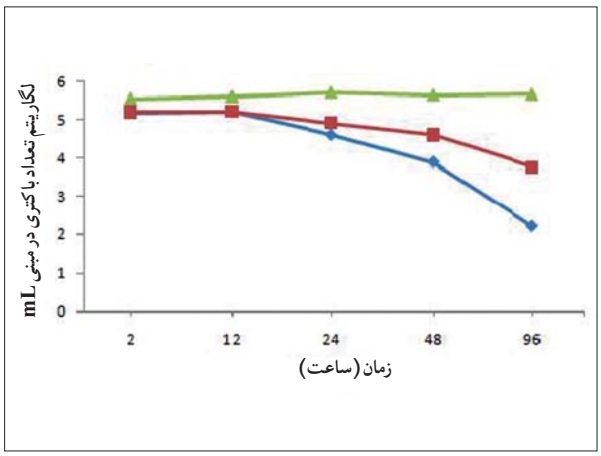
نمونه‌های کشت داده شده از آزمایش آنتی بیوگرام داخل لوله پس از گذراندن زمان انکوباسیون مورد بررسی و شمارش قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاکی از حذف کامل تعداد باکتری‌ها توسط فوم‌های مورد مطالعه در طی زمان مورد نظر بود.



نمودار ۱. الگوی XRD فوم پلی اورتان شاهد (a) و فوم پلی اورتان حاوی زئولیت نقره (b). الگوی XRD به‌دست آمده ساختار کریستاله نقره را در این ترکیب تأیید نمود که ساختار آن به صورت Aluminum Silicate Hydr می‌باشد.



نمودار ۲. طیف FTIR حاصل از فوم پلی اورتان شاهد (a)، فوم پلی اورتان حاوی زئولیت نقره (b). تغییر در پیک‌های ۳۳۵۰(NH)، ۱۶۹۰(CO) و ۲۲۰۰(NCO) مؤید ترکیب نقره با پیوندهای آلی سازنده فوم پلی اورتان می‌باشد.



نمودار ۳. نمودار تعداد باکتری در زمان‌های مختلف نمونه برداری در فوم حاوی ۱۰٪ و ۲۰٪ زئولیت نقره و تیمار شاهد. فوم پلی اورتان حاولی ۲۰٪ زئولیت نقره
فوم پلی اورتان حاولی ۱۰٪ زئولیت نقره
فوم پلی اوتان شاهد

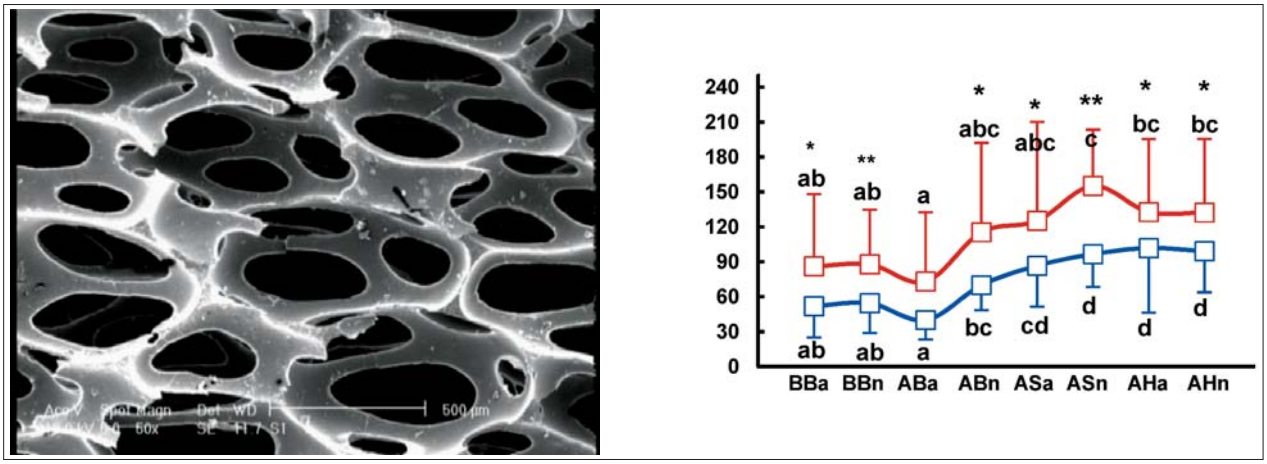
روند تغییرات تعداد باکتری با استفاده از فیلترهای حاوی زئولیت نقره در نمودار ۳ نشان داده شده است. همانگونه که مشخص است فیلترها پس از ۲۴h توانسته‌اند باکتری را به طور معنی‌داری کاهش دهند. در حالی که در گروه شاهد روند افزایشی در تعداد باکتری‌ها در طی ساعت‌های نمونه‌برداری به خوبی مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه دو درصد مختلف این تیمار بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین فوم‌های حاوی ۱۰٪ و ۲۰٪ زئولیت نقره در حذف باکتری مورد مطالعه است. با توجه به اعداد به‌دست آمده و مشخص شدن معنی‌دار بودن تفاوت اثر این دو فیلتر، این‌گونه می‌توان نتیجه گرفت که بین این دو درصد، فوم پلی اورتان حاوی ۱۰٪ زئولیت نقره بالاترین تأثیر را در حذف باکتری داشته است.

تلفات در طول دوره پرورشی تا روز ۱۴ شمارش و ثبت گردید. درصد تلفات در فوم پلی اورتان حاوی ۱۰٪ زئولیت نقره، ۲۰٪ زئولیت نقره و فوم پلی اورتان ساده (شاهد) به ترتیب معادل ۰/۰۱b±۶/۶۶٪، ۰/۰۲b±۱۱٪ و ۰/۰۱a±۱۸۰٪ بود. در گروه شاهد (فوم‌های پلی اورتان فاقد ترکیبات نقره) ۸۰٪ ماهی‌ها تا روز ۱۴ تلف شدند و از همان روزهای اولیه کشت طحال و کلیه ماهی‌های تلف شده حاکی از آلوده بودن آنها به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی بود و علائم بیماری از جمله خونریزی در پایه باله‌ها و تیرگی رنگ بدن در این گروه از روز ۵ قابل مشاهده بود (تصویر ۳).

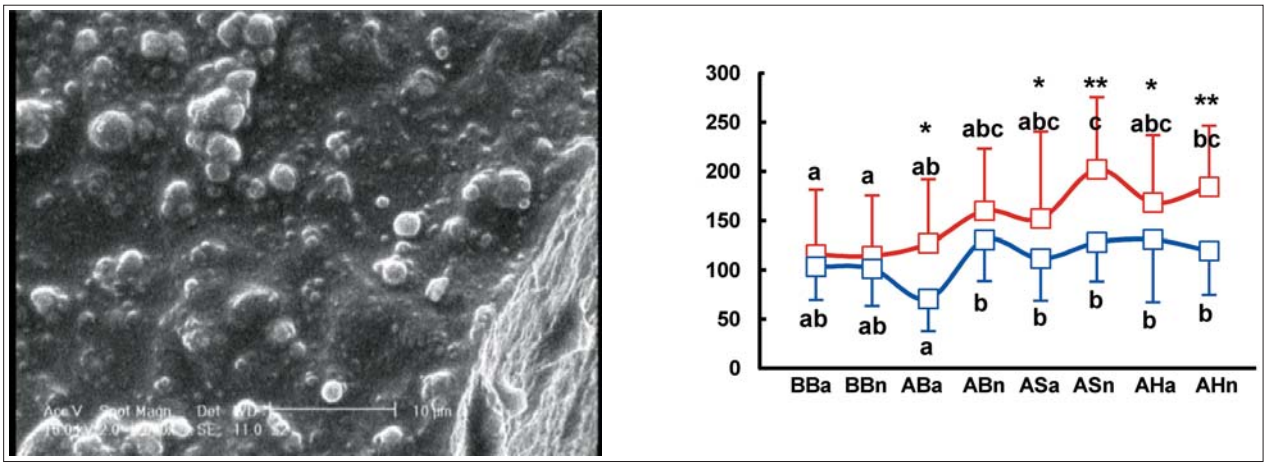
اما در تیمارهای زئولیت نقره تلفات اندک بود و هیچ گونه علائم بیماری در طول دوره مشاهده نشد و نیز کشت باکتری که در طول دوره از طحال و کلیه ماهی‌های تلف شده انجام شده بود، هیچ‌گونه آلودگی به باکتری استرپتوکوکوس نشان نداد.

بحث

مطالعات اخیر بیانگر گسترش بیماری استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل‌آلای کشور است که تاکنون موجب وارد آمدن خساراتی بر این صنعت گردیده است (۲۴). از طرفی مطالعات گسترده‌ای در زمینه بررسی خواص ضد میکروبی ترکیبات نقره انجام شده، که همگی بیانگر مؤثر بودن این ترکیبات بر از بین بردن باکتری‌های مختلف است. نتایج حاصل از این مطالعات حاکی از کمتر بودن تأثیر این ترکیبات بر باکتری‌های گرم مثبت، به دلیل ضخیم تر بودن لایه پپتیدوگلوکان دیواره سلولی، نسبت به باکتری‌های گرم منفی بوده است (۱۵،۱۸). در این راستا اکثر مطالعات انجام‌شده به‌صورت آزمایشگاهی بوده و اندک بررسی بر روی جانوران زنده (in vivo) نیز اثر فیلترهای حاوی ترکیبات نقره را بر حذف باکتری‌های آب آشامیدنی مورد بررسی قرار داده‌اند، که همگی این مطالعات حاکی از مؤثر بودن این فیلترها در حذف باکتری‌های آب آشامیدنی بوده است. بنابراین در مطالعه حاضر، برای اولین بار به بررسی اثر ضد باکتریایی فیلترهای حاوی ترکیب زئولیت نقره در یکی از سیستم‌های پرورش آبزیان پرداخته شد.



تصویر ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM از فوم پلی اورتان شاهد (فاقد زئولیت نقره). بزرگنمایی تصویر سمت راست ۵۰۰۰ برابر و بزرگنمایی تصویر سمت چپ ۵۰ برابر می‌باشد.



تصویر ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM از فوم پلی اورتان حاوی زئولیت نقره. بزرگنمایی تصویر سمت راست ۷۵۰۰ برابر و بزرگنمایی تصویر سمت چپ ۲۰۰۰ برابر می‌باشد.

تصویر ۳. تیره‌شدن رنگ بدن در ماهی بیمار.

در تحقیق حاضر جهت اطمینان از نحوه و میزان حضور ترکیبات زئولیت نقره، مطالعات تکمیلی متعددی شامل آزمایشات XRD، FTIR و تصویربرداری توسط میکروسکوپ الکترونی (SEM) صورت پذیرفت که نتایج به دست آمده از مطالعات مذکور با یکدیگر همخوانی کامل داشته و همگی مؤید حضور ترکیبات نقره در فوم‌های مورد مطالعه بودند.

در پیوندهای آلی سازنده فوم پلی اورتان، ترکیبات نقره می‌توانند با N موجود در پیوند NH و همچنین O موجود در پیوند NCO و CO واکنش دهند و موجب تغییر در پیک‌های FTIR گردند (۱۷). با توجه به نتایج حاصل از روش FTIR و همانگونه که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود پیک‌های ۳۳۵۰ (NH)، ۱۶۹۰ (CO) و ۲۲۰۰ (NCO) در تیمارهای حاوی ترکیبات نقره حذف شده است. این تغییر در مقایسه با طیف تیمار شاهد به خوبی قابل مشاهده است که علت را می‌توان به برقراری پیوند با ترکیبات نقره نسبت داد.

بررسی فوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM نشان داد که ساختمان فوم پلی اورتان متخلخل و پر حفره می‌باشد. با مقایسه تصاویر گرفته شده، حضور زئولیت نقره در فوم‌های محتوی این مواد در مقایسه با فوم‌های شاهد (فاقد ترکیبات نقره) به خوبی قابل مشاهده است. همچنین تصاویر مذکور موید پوشش و توزیع مناسب ترکیبات نقره بر روی فوم‌ها می‌باشد.

جدول ۱. بررسی میزان تلفات در تیمارهای مختلف.

نوع فیلترمدیا	درصد تلفات
فوم پلی اورتان حاوی ۱۰٪ زئولیت نقره	٪۶/۶۶±۰/۰۱[b]
فوم پلی اورتان حاوی ۲۰٪ زئولیت نقره	٪۱۱±۰/۰۲[b]
فوم پلی اورتان ساده (شاهد)	٪۸۰±۰/۰۱[a]

عملکرد فیلترمدیاها در شرایط In vitro: در آزمایش آنتی بیوگرام روی پتری دیش، بررسی منطقه زیر فوم‌ها 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 Jain و Pradeep در سال ۲۰۰۵ مبنی بر حذف کامل باکتری‌ها توسط فوم‌های مورد مطالعه در شرایط in vitro مطابقت دارد. نتایج حاصل از آزمایش آنتی بیوگرام داخل لوله نیز مشخص کرد که اگرچه در شرایط in vivo در آکواریوم‌ها، تعداد باکتری ـ علیرغم کاهش مشهود ـ توسط فیلترهای محتوی ترکیبات نقره به صفر نرسید، اما در شرایط in vitro در لوله‌های آزمایش، همان فوم‌ها توانستند باکتری را در زمانی کوتاه و به‌طور کامل حذف نمایند. عدم جریان آب حاوی باکتری در شرایط آزمایشگاه، بالا بودن نسبت حجم فیلترمدیا به حجم آب، و در نتیجه تماس بیشتر فوم‌ها با آب آلوده در این شرایط، احتمالا از عوامل کارایی بالاتر این فوم‌ها در شرایط in vitro می‌باشند. از طرفی در شرایط in vivo به دلیل حضور ماهی و در نتیجه دفع مواد آلی از بدن آن (شامل مدفوع، موکوس و سایر ترشحات) میزان ترکیبات آلی و بویژه کربن آلی محلول (DOC) در آب افزایش می‌یابد. این مواد با دو عملکرد متفاوت می‌توانند میزان باکتری را در آب افزایش دهند: اولاً خود این مواد به عنوان ماده مغذی برای باکتری‌ها بوده و نیز بستری مناسب را برای رشد آنها فراهم می‌آورند؛ ثانیاً ثابت شده است که مواد آلی و کربن آلی محلول از طریق ایجاد پیوند با ترکیبات نقره، خواص واکنشی آنها را کاهش داده و حتی غیرفعال می‌نمایند (۲).

عملکرد فیلترمدیاها در شرایط In vivo: نتایج حاصل از تأثیر فیلترها بر روند کاهشی میزان باکتری‌های آب در طول دوره آزمایش‌های in vivo، در محیط ماهی دار آکواریوم‌ها، حاکی از کارائی آنها در سیستم‌های نیمه مدار بسته پرورش ماهی قزل‌آلا می‌باشد. محققان مختلفی نظیر Kawahara و همکاران ۲۰۰۰، Rivera-Garza ۲۰۰۰، Bright و همکاران ۲۰۰۲، Inoue و همکاران ۲۰۰۲، Matsumura و همکاران ۲۰۰۳، Top و Ulku ۲۰۰۴، در مطالعات خود بر تأثیرگذاری زئولیت نقره به عنوان یک عامل ضدباکتریایی بر گونه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی تأکید کردند. اما مطالعه‌ای در زمینه استفاده از زئولیت نقره در سیستم فیلتراسیون آب، جهت کاهش بار باکتریایی وجود ندارد.

در مطالعات مربوط به آب آشامیدنی در ترکیبات دیگر نقره اظهار می‌گردد که تعداد باکتری‌ها در طول دوره در اثر فیلتراسیون به صفر رسیده است، اما در مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار در تراکم باکتری در حدی بوده که از بروز بیماری و علائم مربوط به آن کاملاً جلوگیری کرد، اما تعداد باکتری‌ها به صفر نرسید. مطالعات انجام شده از جنبه‌های مختلفی با مطالعه حاضر متفاوت هستند که خود می‌تواند دلیلی بر تفاوت نتایج به دست آمده باشد؛ که از آن جمله می‌توان به متفاوت بودن نوع بستر یا فیلتر مدیا، حضور موجود زنده (ماهی) و در نتیجه مواد آلی در این تحقیق، تفاوت در دما و شرایط آزمایش (به‌ویژه خصوصیات شیمیایی آب)، تفاوت در اندازه و نوع ترکیبات نقره و تفاوت در دبی آب مورد استفاده اشاره کرد.

یکی از نکات قابل توجه در اکثر مطالعاتی که بر روی آب آشامیدنی و ترکیبات دیگر نقره صورت گرفته است، کم بودن دبی آب مورد استفاده نسبت به تحقیق حاضر است. به طور مثال در مطالعه Jain و Pradeep در سال ۲۰۰۵ دبی آب مورد استفاده ۰/۵L/min ذکر شده است، Lv و همکاران در سال ۲۰۰۹ از دبی ۰/۰۱L استفاده کردند و در مطالعه Nagarajan و Jaiprakashnarain در سال ۲۰۰۹ دبی آب ۰/۵L/min ذکر شده است این در حالی است که در بررسی حاضر از فیلترهای با دبی ثابت ۲۳L/min استفاده شد و از آنجا که در این فیلترها نسبت به سایر مطالعات دبی آب نسبت به حجم فیلترمدیا بسیار بالاتر بوده احتمالاً می‌تواند موجب کاهش زمان تماس آب با فیلترمدیا و در نتیجه تأثیر کمتر ترکیبات نقره استفاده شده در فیلتر، بر آب گردد.

در کلیه فیلترها در ساعت ۱۲ نمونه‌برداری، نسبت به ساعت قبل، افزایش غیر معنی‌داری در تعداد باکتری‌ها مشاهده شد. طبق گزارش Rosa-Gomez و همکاران در سال ۲۰۰۷ رها شدن یون‌های نقره با گذشت زمان عبور آب، افزایش می‌یابد و در این مطالعه نیز شاید پس از ساعت ۱۲ میزان یون‌های رها شده، به میزان کشنده برای باکتری‌ها نزدیک شده است.

فیلتر حاوی ۱۰٪ زئولیت نقره پس از ساعت ۱۲ توانست تعداد باکتری‌ها را به طور معنی‌داری کاهش دهد. از بین تمام فیلترهای مورد بررسی، این فیلتر در تمام ساعات نمونه برداری بیشترین تأثیر را در حذف باکتری نشان داده است. در نهایت این فیلتر توانست در ساعت ۹۶، تعداد باکتری را از 10^5 به 10^2 کاهش دهد. فیلتر حاوی ۲۰٪ زئولیت نقره، باکتری را پس از ساعت ۱۲ به طور معنی‌داری کاهش داد و پس از آن نیز تا آخرین ساعت نمونه برداری روند کاهشی به طور معنی‌داری ادامه یافت. نتایج حاصل از مقایسه فیلتر حاوی ۱۰ و ۲۰٪ زئولیت نقره حاکی از معنی‌دار بودن تفاوت بین آنها است و با توجه به اعداد به دست آمده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که فیلترمدیای حاوی ۱۰٪ زئولیت نقره نسبت به فیلترمدیای حاوی ۲۰٪ زئولیت نقره تأثیر بالاتری در حذف و کنترل رشد باکتری داشته است. نکته قابل توجه در این رابطه سخت‌تر شدن ساختار فیلترمدیای حاوی ۲۰٪ زئولیت نقره و کوچک شدن منافذ آن در مقایسه با فیلترمدیای حاوی ۱۰٪ زئولیت نقره، به علت بالا بودن درصد زئولیت نقره در آن است، که عبور آب از فیلتر را دچار مشکل کرده و در نتیجه از کارایی فیلتر کاسته است.

تعداد اندک تلفات در ماهی‌های تحت تیمار با ترکیبات نقره و عدم بروز

علائم بیماری و نیز عاری بودن طحال و کلیه آنها از باکتری، حاکی از تأثیر مثبت فیلترهای حاوی ترکیبات نقره بر کنترل این بیماری است. می توان این‌گونه احتمال داد که در تیمارهای محتوی ترکیبات نقره، باکتری‌ها توانائی بیماریزایی را در حضور نقره از دست داده‌اند (۱۰)، در حالی که در گروه‌های شاهد، ۸۰٪ تلفات مشاهده شد و مشاهده علائم بیماری و حضور باکتری در طحال و کلیه بیانگر بیمار شدن ماهیان در این گروه بود. نکته مهم در این مطالعه استفاده غیر مستقیم از زئولیت نقره بود؛ که به دلیل اثرات سوء شناخته شده استفاده مستقیم ترکیبات نقره بر آبزیان و محیط زیست، در این مطالعه با استفاده از فیلترهای حاوی این مواد سعی گردید که به صورت غیر مستقیم از خاصیت ضد میکروارگانیسمی آنها استفاده شود.

نتایج نهایی موید آن است که استفاده از زئولیت نقره در ترکیب با فوم‌های پلی اورتان به‌عنوان بستر یک فیلتر تصفیه اب، از پتانسیل کافی در کاهش حدت بیماریزایی عفونی ناشی از باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در سیستم نیمه مدار بسته پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برخوردار بوده و به نظر می‌رسد این تحقیق می‌تواند به عنوان مطالعه‌ای پایه در راستای استفاده از روشی جدید در کنترل باکتری‌های موجود در سیستم‌های پرورش آبزیان مورد توجه قرار گیرد و توسعه این‌گونه فیلترها می‌تواند به عدم استفاده از داروهای شیمیایی در کنترل بیماریهای آبزیان منجر گردد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری کلیه عزیزانی که در اجرای این تحقیق فعالیت مؤثری داشته‌اند، تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Akhlaghi, M., Keshavarz, M. (2002) Occurrence of streptococcosis in trout farms in Fars, Iran. Iran J Vet Res. 3: 183-189.
2. Brett, D.W. (2006) A discussion of silver as an antimicrobial agent: alleviating the confusion. Ostomy Wound Manage. 52: 34-41.
3. Bright, K.R., Gebra, C.P., Rusin, P.A. (2002) Rapid reduction of *Staphylococcus aureus* populations on stainless steel surfaces by zeolite ceramic coatings containing silver and Zinc ions. J Hosp Infect. 52: 307-309.
4. Cho, K.H., Park, J.E., Osaka, T., Park, S.G. (2005) The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochem Acta. 51: 956- 960.
5. Gooch, J.W. (2007) Encyclopedic Dictionary of Polymers. Springer Science. New York, USA.
6. Hotta, M., Nakajima, H., Yamamoto, K., Aono, M. (1998) Antibacterial temporary filling materials: The effect of adding various ratios of Ag-Zn-zeolite. J Oral Rehabil. 25: 485-489.
7. 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. J Inorg Biochem. 92: 37-42.
8. Jain, P., Pradeep, T. (2005) Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. Biotechnol Bioeng. 90: 59-63.
9. Kawahara, K., Tsuruda, K., Morishita, M., Uchida, M. (2000) Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. Dent Mater. 16: 452- 455.
10. Lv, Y., Liu, H., Wang, Z., Liu, S., Hao, L., Sang, Y., Liu, D., Wang, J., Boughton, R.I. (2009) Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment. J Memb Sci. 331: 50-56.
11. Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S., Tsuchido, T. (2003) Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. Appl Environ Microbiol. 69: 4278-4281.
12. Matsuura, T., Abe, Y., Sato, K., Okamoto, K., Ueshige, M., Akagawa, Y. (1997) Prolonged anti-microbial effect of tissue conditioners containing silver zeolite. J Dent. 25: 373-377.
13. Metes, A., Kovacevic, D., Vujevic, D., Papic, S. (2004) The role of zeolites in wastewater treatment of printing inks. Water Res. 38: 3373-3381.
14. Morishita, M., Miyagi, M., Yamasaki ,Y., Tsuruda, K., Kawahara, K., Iwamoto, Y. (1998) Pilot study on the effect of mouthrinse containing silver-zeolite on plaque formation. J Clin Dent. 9: 94-96.
15. Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Ramirez, J.T. (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 16: 2346-2353.

16. Nagarajan, B., Jaiprakashnarian, G.B. (2009) Design and application of nanosilver based POU appliances for disinfection of drinking water. Indian J Sci Technol. 2: 5-8.
17. Phong, N.T.P., Thanh, N.V.K., Phoung, P.H. (2009) Fabrication of antibacterial water filter by coating silver nanoparticles on flexible polyurethane foams. J phys Conf Ser. 187: 1-8.
18. Rai, M., Yada, A., Gade, A. (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv. 27: 76-83.
19. 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 Mesoporous Mater. 39: 431-444.
20. Roberts, R.J. (2001) Fish Pathology. (3rd ed.) Bailliere Tindal London. London, UK.
21. Rosa-Gomez, L.D.L., Olguin, M.T., Alcantara, A. (2007) Bactericides of coliform microorganisms from wastewater using silver-clinoptilolite rich tuffs. Appl Clay Sci. 40: 45-53.
22. Soltani, M. (2002) Salmonid Diseases. (1st ed.) Tehran University Press. Tehran, Iran.
23. Soltani, M., Fadai fard, F., Sharif pour, A., Zargar, A. (2009) Experimental pathology of the *Streptococcus* sp. in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iran Sci Fish J. 17: 81-87.
24. Soltani, M., Jamshidi, S., Sharifpour, I. (2005) Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran: Biophysical characteristics and pathogenesis. Bull Eur Ass Fish Pathol. 25: 95-106.
25. Soltani, M., Nikbakht, G., Ebrahimzadeh Moussavi, H.A., Ahmadzadeh, N. (2008) Epizootic outbreak of lactococcosis caused by *lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 28: 209-214.
26. Top, A., Ülkü, S. (2004) Silver, zinc, and copper exchange in a Na-clinoptilolite and resulting effect on antibacterial activity. Appl Clay Sci. 27: 13-19.
27. Uchida, M. (1995) Antimicrobial zeolite and its application. Chem Ind. 46: 48-54.
28. Uchida, M., Maru, N., Furuhata, M., Fujino, A., Muramoto, S., Ishibashi, A., Koshiba, K., Shiba, T., Kikuchi, T. (1992) Anti-bacterial zeolite balloon catheter and its potential for urinary tract infection control. Acta Urol Jpn (Hinyokika Kiyo). 38: 973-978.
29. Widlastuti, N., Wu, H., Ang, M., Zhang, D.K. (2008) The potential application of natural zeolite for greywater treatment. Desalination. 218: 271-280.

Application of polyurethane foam containing silver zeolite (Zeomic) in water filtration system to control the infection caused by *Streptococcus iniae* in rainbow

Shahim, A.A.[1], Kalbassi, M.R.[1*], Soltani, M.[2], Johari, S.A.[3]

[1]*Department of Aquaculture, Faculty of Marine Sciences University of Tarbiat Modares, Noor-Iran*

[2]*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran-Iran*

[3]*Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources University of Kurdistan, Sanandaj-Iran*

(Received 10 December 2014, Accepted 26 January 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Zeolites containing silver ion, in combination with synthetic fibers, show antibacterial activity. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to use silver zeolite indirectly as antimicrobial agents to control *Streptococcus iniae* infection which recently has caused disease in some of rainbow trout farms in Iran. **METHODES:** In this context polyurethane foams containing silver zeolite (10 and 20%) were used in water filtration of semi circulation culture system of rainbow trout fry. After addition of *Streptococcus iniae* (10^5 Cell/ml) to water in culture systems, the filters were evaluated for efficacy in inhibiting bacteria through measuring bacterial loading in water, monitoring disease symptom and culture of bacteria from kidney and spleen. **RESULTS:** The results indicated that filters containing silver compounds could significantly reduce load of bacteria from the water to 102 ($p<0.05$) compared to the control. Filter with 10% silver zeolite had higher efficiency among others. **CONCLUSIONS:** According to the results of this study, it seems that silver zeolite in combination with polyurethane foams has the sufficient potential to control bacterial infection and disease prevention in semi circulation system of Rainbow trout. Development of these filters and their application in control of aquatic animal diseases can result in reduction of using chemical drugs.

Key words: polyurethane foam, rainbow trout, silver zeolite, streptococcosis

Figure Legends and Table Captions

Graph 1. XRD pattern of control polyurethane foam (a), polyurethane foam containing silver zeolite (b) which confirmed crystalline structure (Hydrated Aluminum Silicate) of silver.

Graph 2. FT-IR spectra of control polyurethane foam (a), polyurethane foam containing silver zeolite (b). The observed changes in 3350 (NH), 1690 (CO) and 2200 (NCO) are due to interaction between silver and organic bonds of polyurethane foam.

Graph 3. Colony count of *Streptococcus iniae* (grown up on blood agar plate) after using polyurethane foams containing 10, 20% SZ and control polyurethane foam.

Figure 1. SEM photographs of control polyurethane foam. (Magnification of the right is ×5000 and left is ×50).

Figure 2. SEM photographs of polyurethane foam containing silver zeolite. (Magnification of the right is ×7500 and left is ×2000).

Figure 3. Body darkness in dead fish.

***Corresponding author's email: kalbassi_m@modares.ac.ir Tel: 0122-6253101, Fax: 0122-6253499**