بررسی اثر ضد باکتریایی کیتوزان حاوی اکسید نقره و بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی در مقابل یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) جدا شده از ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

ظهیر شکوه سلجوقی[1*]، امیدوار فرهادیان[1]، نوید رمضانیان[2]، معصومه مهربان سنگ‌آتش[3]

*zoheirsaljoghi@gmail.com

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایرا
۲-گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳- گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، جهاددانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹٦ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹٦

چکیده

در این تحقیق اثرات ضد باکتریایی بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی و کیتوزان حاوی اکسید نقره بر باکتری یماریزای یرسینیا راکری در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند. جهت ساخت ترکیبات ضد میکروبی از رس بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی تترادسیل تری متیل آمونیوم بروماید (Tetradecyltrimethylammonium bromide) و کیتوزان اصلاح شده اکسید نقره استفاده گردید. مطالعات طیف سنجی پراش اشعه ایکس (XRD) و طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) در زمینه تعیین ساختار مشخص نمود که تغییراتی در طی اصلاح در ساختار سطحی و لایه ای بنتونیت و همچنین کمپوزیت کیتوزان حاوی اکسید نقره در شبکه پلیمری کیتوزان حاصل گردید. در این مطالعه اثر ضد باکتریایی دو نوع ترکیب ضد میکروبی بر باکتری گرم منفی یرسینیا راکری در شرایط آزمایشگاهی با دو روش انتشار دیسک (دیسک دیفیوژن) و رقیق سازی در لوله (مایکرو دایلوشن) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. برای تعیین قدرت ضد میکروبی (MIC و MBC) از روش مایکرو دایلوشن و شمارش کلونی در محیط کشت آگار استفاده گردید. نتایج روش دیسکی نشان داد که این ترکیبات دارای خاصیت ضد باکتریایی بودند. قطر هاله عدم رشد کیتوزان حاوی اکسید نقره و بنتونیت اصلاح شده به ترتیب ۵/۶۳±۰/۵۳ و ۱/۲±۰/۱۶ میلی متر بود. غلظت باکتری کشی (MBC) کیتوزان حاوی اکسید نقره در مقابل باکتری *Yersinia ruckeri*، ۲۸/۵۷ میلی گرم بر لیتر در مدت زمان ۱۰ دقیقه و برای ترکیب معدنی رس اصلاح شده، ۴۲/۸۵ میلی گرم بر لیتر در مدت زمان ۱۰ دقیقه مشاهده گردید. غلظت بازدارندگی (MIC) کیتوزان حاوی اکسید نقره و رس اصلاح شده، ۱۴/۲۸ میلی گرم بر لیتر در ۱۰ دقیقه بود. نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیبات اصلاح شده بنتونیتی و کیتوزان حاوی اکسید نقره دارای اثرات ضد میکروبی قوی بوده و قابلیت حذف عوامل بیماری زا را در شرایط آزمایشگاهی داشته و در مقایسه با یکدیگر اثر باکتری کشی کیتوزان حاوی اکسید نقره قوی تر از اثر باکتری کشی رس بنتونیت اصلاح شده بود.

لغات کلیدی: بنتونیت، سورفکتانت کاتیونی، کیتوزان، یرسینیا راکری، خاصیت ضد میکروبی

*نویسنده مسئول

مقدمه

یرسینیا راکری عامل یرسینیوزیس یکی از بیماریهای حاد با زیانهای اقتصادی بالا در صنعت پرورش آزاد ماهیان به ویژه قزل آلای رنگین کمان است (Tobback *et al*., 2009, 2007). این باکتری که متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است. باکتری یرسینیا راکری (*Yersinia ruckeri*) سالانه پس از بیماری استرپتوکوکوزیس موجب بروز خسارات هنگفتی به صنعت آبزی پروری در ایران می شود (Soltani *et al*., 1999; Soltani *et al*., 2014). تا کنون دو بیوتیپ از این باکتری شناسایی شده است (Bestor *et al*., 2010). به نظر می رسد خانواده آزادماهیان به خصوص قزل آلای رنگین کمان از حساس ترین گونه ها به این بیماری است (Furones *et al*., 1993). در بسیاری موارد بیماری به صورت سیستمیک بروز یافته و علائمی همچون خونریزی در قاعده باله ها، بزرگ شدن طحال، اگزوفتالمی و ... مشاهده شود (Tobback *et al*., 2007). بیماری یرسینیوز در ایران اولین بار در سال ۱۹۹۹ از مزارع قزل آلای رنگین کمان کشور گزارش شد (Soltani *et al*., 1999; Soltani *et al*., 2014). روشهای درمانی متنوعی جهت کنترل و درمان این بیماری در ایران و جهان گزارش گردیده است (Turker *et al*., 2009; Tukmechi *et al*., 2010). ترکیبات رسی در صنایع مختلف از جمله تصفیه آب و فاضلاب در آبزی پروری مورد استفاده قرار می گیرند(شکوه سلجوقی و همکاران، ۱۳۹۱). استفاده از ترکیبات ضد میکروبی بر پایه ترکیبات معدنی در سالهای اخیر در حذف عوامل بیماریزای انسانی مرسوم شده است (Ozdemir *et al*., 2013). ترکیبات ضد میکروبی بر پایه کیتوزان هم به صورت بسیار محدود در آبزی پروری مورد استفاده قرار گرفته اند (Dananjaya *et al*., 2016). از ترکیبات ضد میکروبی بر پایه کیتوزان در حذف عوامل میکروبی غیر آبزی گزارشاتی وجود دارد (Akmaz *et al*., 2013; Haldorai and Shim, 2013). در زمینه استفاده از ترکیبات رسی اصلاح شده به منظور حذف عوامل میکروبی آبزیان تا کنون گزارشی مشاهده نگردیده است. در این تحقیق سعی بر آن است با استفاده از ترکیبات با خاصیت ضد میکروبی (سورفکتانت کاتیونی تترادسیل تری متیل آمونیوم بروماید و اکسید نقره) بر پایه ترکیبات معدنی رس بنتونیت و ترکیب آلی کیتوزان اقدام به ساخت ترکیبات آنتی باکتریال به منظور حذف عامل بیماریزای دهان قرمز یرسینیایی نمود.

مواد و روش کار

تهیه بنتونیت اصلاح شده توسط سورفکتانت (Surfactant Modified Bentonite, SMB)

رس‌های اصلاح شده توسط کلرید سدیم با نسبت ۴ گرم رس به محلول سورفکتانت ۰/۰۱ مولار در ۳۰۰ دور در دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت هم زده شد. سپس رس حاصله صاف شد و با آب مقطر چندین بار شسته و سپس ارگانوبنتونیت حاصله را در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد خشک کرده و با الک ASTM به اندازه ذرات ۰/۸ تا ۱/۲ میلی متر تهیه شدند (روش اصلاح شده شکوه سلجوقی و همکاران، ۱۳۹۱).

تهیه کمپوزیت های کیتوزان حاوی اکسید نقره: به منظور تهیه کمپوزیت های با خاصیت ضد میکروبی، ۴ گرم کیتوزان در ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال یک دهم نرمال حل شده و به مدت یک شبانه روز هم زده شد. این عمل تا رسیدن پی اچ محلول به میزان ۴/۶ تا ۴/۸ ادامه داشت. اکسید نقره به میزان ۲۰ میلی گرم به محلول افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. سپس سود یک مولار به صورت قطره قطره به آن اضاف شد. ترکیب حاصله را در دمای آزمایشگاه به مدت شش ساعت همزده شد و سپس با آب مقطر تا رسیدن به پی اچ خنثی شستشو داده شد (Li *et al*., 2008).

آزمون منطقه مهار رشد (روش دیسکی): برای انجام آزمایش اندازه گیری منطقه مهار رشد باکتری از روش پورپلیت عمقی استفاده شد. در ادامه از استوک لیوفیلیزه باکتری یرسینیا راکری (استوک لیوفیلیزه باکتری از دانشگاه ارومیه تهیه شد) با تلقیح در لوله محیط استریل مولر هینتون براث و گرمخانه گذاری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، کشت شبانه تهیه شد. سپس از این کشت شبانه، سوسپانسیون

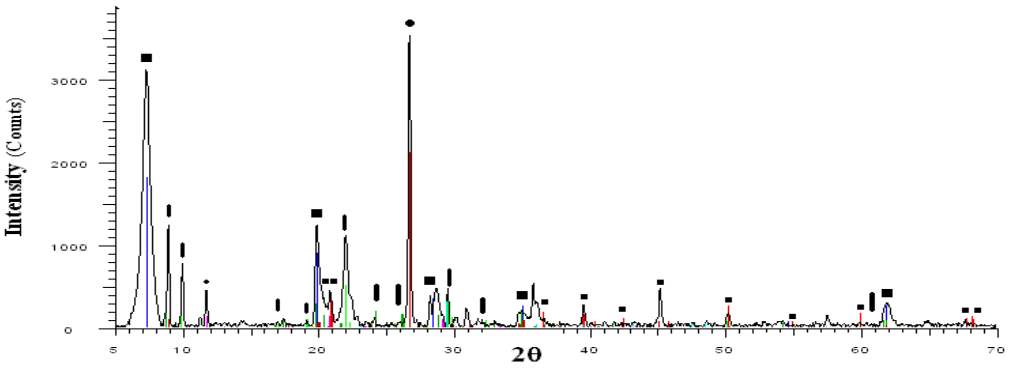
میکروبی معادل نیم مک فارلند ($1/5\times10^8$ CFU/ml) به هر پلیت حاوی آگار سرد شده (با دمای ۵۰-۴۵ درجه سانتی گراد) سوسپانسیون میکروبی فوق افزوده شد. قبل از بستن کامل ژل از هر کدام از ترکیبات اصلاح شده ضد میکربی (بنتونیت اصلاح شده و کیتوزان حاوی اکسید نقره) به همراه کنترل شاهد (بنتونیت طبیعی و کیتوزان خام) به اندازه ۰/۲ گرم با سه تکرار و با فاصله در هر پلیت قرار داده شد. عدم تشکیل هاله شفاف در اطراف نمونه شاهد بیانگر انجام صحیح فرایند روی ترکیبات مورد آزمایش است (Lv *et al*., 2009).

تست لوله آزمایش: در آزمایش تست لوله آزمایش طبق دستورالعمل NCCLS سال ۲۰۰۳ استفاده شد. به منظور بررسی و اندازه گیری توان ضد میکربی دو ترکیب کیتوزان حاوی نقره و بنتونیت اصلاح شده علیه یرسینیا راکری از روش تست در لوله استفاده شد. بدین صورت که ابتدا دو سری لوله ده تایی را بطور جداگانه از ترکیبات ضد میکربی فوق از مقدار ۰/۱ گرم تا ۱ گرم(با میزان افزایش ۰/۱ گرم در هر لوله) پر کرده سپس به هر لوله ml ۷ محیط کشت مولر هینتون براث افزوده و بعد از بستن کامل درب لوله ها جهت استریل به اتوکلاو منتقل شدند. بعد از استریل و سرد شدن لوله ها به هر لوله ۱۰۰µ (میکرولیتر) از سوسپانسیون میکربی یرسینیا راکری با غلظتی معادل نیم مک فارلند افزوده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد و در ادامه جهت بررسی و اندازه گیری توان ضد میکربی ترکیبات فوق در مدت زمانهای ۱۰، ۳۰ ، ۶۰ دقیقه و ۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون به طریقه زیر عمل شد. چون میزان تلقیح اولیه باکتری به هر لوله کاملا معلوم است (با احتساب ۱۰۰ مایکرو لیتر از نیم مک فارلند و ریختن در ۷ میلی لیتر محیط کشت، غلظت نهایی سوسپانسیون میکربی در هر لوله 2×10^6 cfu/ml می شود) با شمارش باکتریها بعد از مجاور سازی با ترکیبات ضد میکربی و گذشت زمانهای مختلف می توان به میزان توان ضد میکربی ترکیبا ت فوق دست یافت لذا به منظور توانایی شمارش کلنی ها از هر کدام از لوله ها در زمانهای ذکر شده رقت های سریال (serial dilution) از ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ... تهیه و از هر رقت به حجم ۱ میلی لیتر و با سه بار تکرار در پلیت های حاوی محیط کشت مولرهینتون آگار پخش شد پس از جذب نمونه توسط محیط، پلیت ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت منتقل شدند. جهت شمارش کلنی ها، پلیت حاوی رقتی انتخاب می شود که کلنی های رشد کرده در آنها پراکنده و قابل شمارش باشند در نهایت پس از شمارش کلنی ها تعداد آنها را ضرب در عکس ضریب رقت کرده و تعداد واقعی کلنی ها بدست می آید. در هر سری کنترل مثبت (پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون اگار به همراه سوسپانسیون میکربی بدون مجاور سازی با ترکیبات ضد میکربی) به منظور داشتن رشد حداکثری باکتری و مقایسه با اثرات ضد باکتری ترکیبات مورد ازمایش و کنترل منفی (پلیت حاوی محیط کشت بدون تلقیح باکتری) به منظور کنترل شرایط استریل و اطمینان از عدم بروز آلودگیهای ثانویه و کنترل شاهد(پلیت حاوی محیط کشت به همراه ترکیبات ضد میکربی و بدون تلقیح باکتریایی) به منظور کنترل ترکیبات ضد میکربی مورد آزمایش از جهت فقدان آلودگی ، گذاشته شد(NCCLS, 2003). این آزمایشات در ۳ تکرار به منظور شمارش کلونی های در روی محیط کشت مولر هینتون اگار انجام شد.

نتایج

بررسی نتایج حاصل از XRD[1] نمونه بنتونیت منطقه دیهوک طبس:منحنی حاصل از پراش پرتو ایکس موجود در شکل ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که رس موجود دارای کانیهای کوارتز (۴۱ درصد)، سیلیکات های آبدار سدیم، کلسیم، منیزیوم و آلومنیوم (۳۵/۵ درصد)، سدیم استرلیت (۱۰/۳ درصد)، ایلیت (۵/۹ درصد)، مسکوویت (۲/۲ درصد) و گچ (۱/۶ درصد) یافت شد.

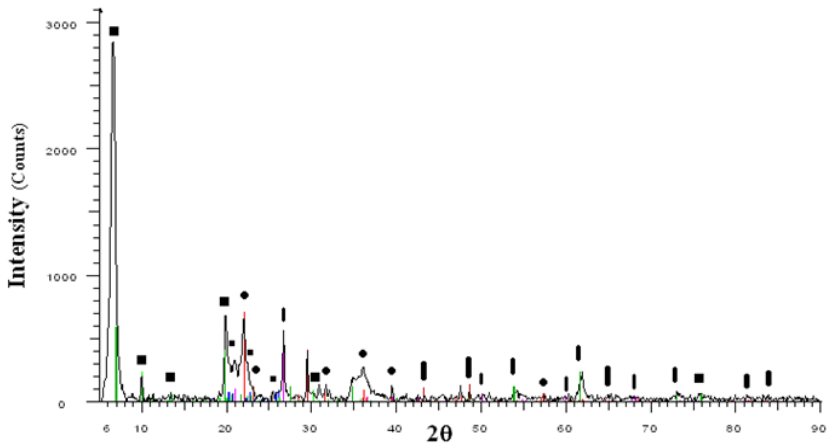
[1] X-Ray Diffraction



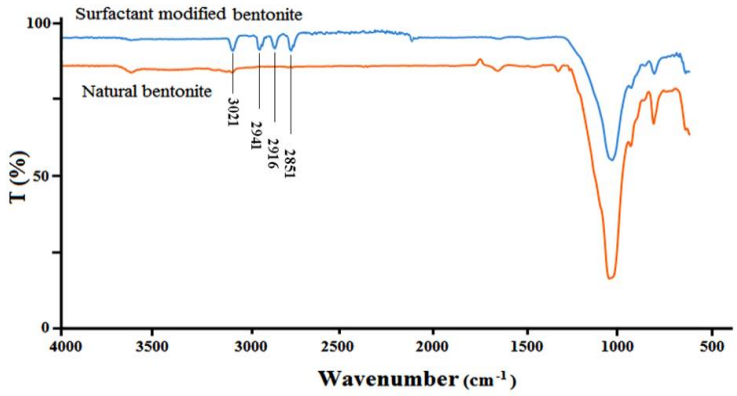
شکل ۱: بررسی نتایج حاصل از XRD نمونه بنتونیت منطقه دیهوک طبس
Figure 1: XRD pattern of bentonite sample from Dyhuk, Tabas area

بررسی نتایج حاصل از XRD نمونه بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت: منحنی حاصل از پراش پرتو ایکس موجود در شکل ۲ مؤید آن است که با روش اصلاحی موجود و با استفاده از سورفکتانت تترا دسیل تری متیل آمونیوم برماید و سایر تیمارهای انجام شده تغییرات اساسی در ساختار لایه ای و بلورین نمونه بنتونیت حاصل شد. ترکیب حاصله دارای کانیهای کریستوبالیت (۲۷/۸ درصد)، هیولاندیت (۹/۲ درصد)، کوارتز (۵/۱ درصد)، منتموریولونیت (۲۳/۱ درصد)، کلسیت (۱۶/۲ درصد) و آلومینیوم سولفات هیدراته (۱۸/۵ درصد) می باشد. نتایج نشان داد که اعمال تیمارهای دمایی و نمکی سبب تغییر در ساختار لایه ای و سطحی رس بنتونیت گردید و آنرا بهبود بخشید.

بررسی نتایج FTIR بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی: طیف مادون قرمز (FTIR) بنتونیت خام و اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی در شکل شماره ۳ آورده شده است. همانطور که در شکل دیده می شود گروه تترادسیل تری متیل آمونیوم برماید دارای باند واضح در cm^{-1} ۳۰۲۱ بوده و در حالیکه دم الکیل دارای یک باند مشخص در cm^{-1} ۲۹۴۱ و ۲۹۱۶ می باشند. این امر نشان دهنده ورود سورفکتانت کاتیونی به درون شبکه رس بنتونیت می‌باشد.

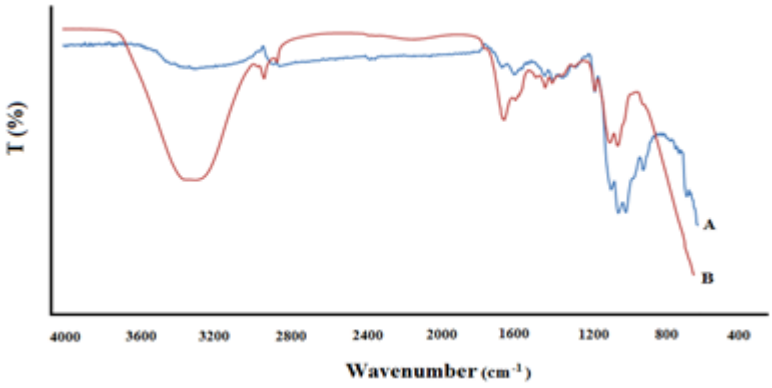


شکل ۲: بررسی نتایج حاصل از XRD نمونه بنتونیت اصلاح شده توسط سورفکتانت
Figure 2: XRD pattern of surfactant modified bentonite sample.



شکل ۳: طیف FTIR بنتونیت خام و بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی
Figure 3: FTIR analysis of raw and surfactant modified bentonite.

بررسی نتایج FTIR کمپوزیت کیتوزانی حاوی اکسید نقره: در طیف کیتوزان خام (A)، گروه های گسترده قوی در $3338\ cm^{-1}$ را می توان به ارتعاش کششی N-H در گروه های NH_2 منتسب کرد. وجود باند $2885\ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی گروه CH_2 دانست. باندهای ۱۶۵۶ و $15559\ cm^{-1}$مربوط به باند خمشی گروه N-H و باند $1363\ cm^{-1}$ مربوط به باند خمشی C-H می باشد و باند قوی تر در $1033\ cm^{-1}$ اختصاص به باند کششی دارد (Beppu et al., 2007). طیف مربوط به کمپوزیت کیتوزان حاوی اکسید نقره در شکل ۴(B) نمایش داده شده است. در طیف مادون قرمز از کمپوزیت کیتوزان حاوی اکسید نقره، یک پیک مشخص در $3282\ cm^{-1}$ ظاهر گردید که می توان به طیف کششی ارتعاشی گروه های NH_2 و گروه های OH نسبت داد. پیک موجود در $1556\ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاش خمشی NH می باشد (شکل ۴).



شکل ۴: طیف FTIR مربوط به کیتوزان خام و کمپوزیت کیتوزان حاوی اکسید نقره
Figure 4: FTIR analysis of raw chitosan and AgO-chitosan composite

بررسی نتایج روش دیسکی: باکتری پرسینیا راکری نسبت به بسترهای رسی و کیتوزانی محتوی ترکیبات ضد میکروبی نشان می‌دهد و هرچه این حساسیت نسبت به ترکیبات ضد باکتریایی در محیط کشت بالاتر باشد، باکتریها با فاصله بیشتری از ترکیبات اجازه رشد می یابند. میانگین مهار رشد باکتری در دو ترکیب آنتی باکتریال، در

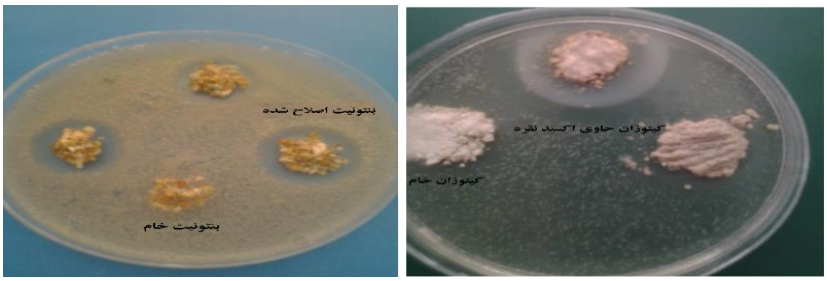
حالت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی تترادسیل تری متیل آمونیوم برماید و کیتوزان حاوی اکسید نقره در جدول شماره ۱ آورده شده است، در گروه های شاهد و بسترهای بدون تیمار مهار رشد باکتری مشاهده نگردید (شکل ۵).

تعیین میزان MIC و MBC: فعالیت ضد میکروبی کمپوزیت کیتوزان حاوی اکسید نقره در شکل شماره ۶ آورده شده است. خاصیت ضد میکروبی با افزایش زمان تماس و افزایش مقدار ماده ضد میکروبی افزایش یافت. فعالیت ضد میکروبی کیتوزان حاوی اکسید نقره در مقابل باکتری *Yersinia ruckeri* دارای MBC به مقدار ۲۸/۵۷ میلی گرم بر لیتر بود. مقدار MIC در تیمارهای انجام شده کمتر از مقدار MBC بود (کمتر از ۱۴/۲۸ میلی گرم بر لیتر). شکل شماره ۷ بیانگر خاصیت ضد میکروبی بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی تترادسیل تری متیل آمونیوم بروماید می باشد. همانطور که از شکل مشخص است با توجه به جایگیری سورفکتانت کاتیونی در شبکه بنتونیت خاصیت ضد میکروبی مناسبی فراهم گردید. ترکیب ضد میکروبی آزمایش شده دارای MBC به مقدار ۴۲/۸۵ و ۲۸/۵۷ میلی گرم بر لیتر به ترتیب در ۱۰ و ۳۰ دقیقه بود.

جدول ۱: نتایج حاصل از هاله عدم رشد باکتری یرسینیا راکری (بر حسب میلی متر)

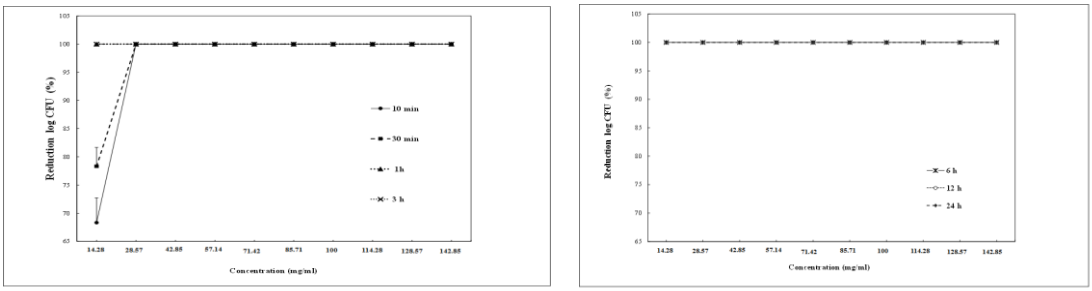
Table 1: Zone of inhibition results agaist *Yersinia ruckeri* (mm)

گونه باکتریایی	کیتوزان خام	بنتونیت خام	بنتونیت اصلاح شده	کیتوزان حاوی اکسید نقره
یرسینیا راکری	فاقد هاله	فاقد هاله	۱/۲±۰/۱۶	۵/۶۳±۰/۵۳



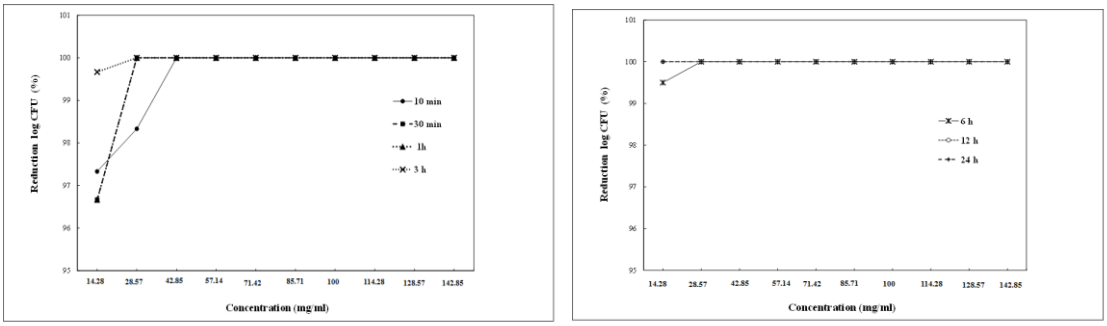
شکل ۵: هاله عدم رشد ترکیبات بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی (سمت چپ) و کیتوزان حاوی اکسید نقره (سمت راست) علیه باکتری یرسینیا راکری

Figure 5: Zone of inhibition of surfactant modified bentonite (left) and AgO-chitosan composit agaist *Yersinia ruckeri*



شکل ۶: نتایج حاصل از اثر کمپوزیت کیتوزان حاوی اکسید نقره بر کاهش میزان باکتری یرسینیا راکری در تیمارهای مختلف

Figure 6: Percent reduction in the number at different time and concentrations AgO-chitosan composite.



شکل ۷: نتایج حاصل از اثر بنتونیت اصلاح شده بر کاهش میزان باکتری یرسینیا راکری در تیمارهای مختلف
Figure 7: Percent reduction in the number at different time and concentrations AgO-chitosan composite.

بحث

معمولاً از ضد عفونی کننده ها از قبیل فرمالین و مالاشیت گرین برای کنترل عفونتهای ناشی از عوامل بیماریزا در کارگاههای پرورش ماهی استفاده می کنند. کاربرد این ترکیبات می بایست در غلظتهایی صورت گیرد که برای ماهیان کشنده نباشد. از طرفی، استفاده زیاد از مواد ضد باکتریایی مانند آنتی بیوتیکها در آبزی پروری به عنوان یک مشکل در حال گسترش مطرح بوده و یافتن راه حلی برای کنترل پاتوژنها نیز همواره از مهمترین نگرانی های متولیان این صنعت بوده است. لذا ترکیبات ضد عفونی کننده غیر دارویی می تواند یکی از راه حلها باشد. استفاده از ضد عفونی کننده های متعدد سبب ایجاد مقاومت دارویی در باکتریهای بیماریزا می گردد (Wang *et al.*, 2007). عدم موفقیت در درمان بسیاری از بیماریهای مزمن و حاد، همچنین اثرات مضر داروهای شیمیایی و آنتی بیوتیکهای مرسوم در کشور و مقاومت روز افزون باکتریهای مختلف در برابر بسیاری از داروها، سبب گرایش محققین به مطالعه در زمینه استفاده از ترکیبات جدیدتر با قابلیت بالاتر حذف عوامل بیماریزای باکتریایی را فراهم نموده است(عادل و همکاران، ۱۳۹۵). استفاده از زئولیت اصلاح شده توسط ترکیبات فلزی در کنترل بیماریهای قارچی ماهیان سردآبی (Johari *et al.*, 2013) و باکتریایی میگوها (Sarkheil *et al.*, 2016) توسط محققیق صورت پذیرفته است و تا کنون گزارشی مبنی بر استفاده از ترکیبات بر پایه بنتونیت با خاصیت ضد میکروبی در داخل و خارج کشور جهت کنترل بیماریهای باکتریایی آبزیان مشاهده نگردیده است.

ترکیبات سطحی فعال سورفکتانتها می توانند با غشای سلولی میکروارگانیسم ها ارتباط برقرار کنند و به عنوان عوامل ضد باکتری عمل کنند. از سورفکتانها انواع مختلفی به صورت کاتیونی، آنیونی و غیر یونی وجود دارد. نتایج برخی مطالعات نشان داد که سورفکتانت کاتیونی فعالیت ضد میکروبی بیشتری دارند (Grant *et al.*, 1992). تحقیقات نشان داد که فعالیت ضد میکروبی سورفکتانتها بستگی به ساختار سورفاکتانتها دارد(Zhi *et al.*, 2014). نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت ضد میکروبی در زمانی که سورفکتانت ها در ۱۴-۱۰ کربن در زنجیره آنها وجود دارد، مشاهده می شود (Nagamune *et al.*, 2000). بر اساس نتایج محققین، مولکولهای سورفکتانت که در سطح ترکیبات معدنی بارگذاری می شوند باعث کشتن باکتری ها می گردد. نتایج تحقیقات مشابه بر روی رسهای اصلاح شده توسط ترکیبات سورفکتانی دیگر نشان داد که سورفکتانت قرار گرفته شده بر روی ساختار سطحی و لایه ای بنتونیت سبب چسبیده شدن باکتریها به آنها و نهایتاً از بین رفتن آنها می شود (Malek *et al.*, 2016). با توجه به اطلاعات منتشر شده در برخی مقالات، فعالیت ضد باکتری ترکیبات معدنی اصلاح شده با سورفکتانت به علت انتشار مولکول های سورفاکتانت از مواد اصلاح شده نیست، بلکه پیوستن سلول های باکتری به لایه سورفکتانت روی سطح این ترکیبات می باشد. ترکیبات فلزی نشانده شده بر سطح ترکیبات آلی و معدنی

متعدد از قبیل کیتوزان نیز یکی دیگر از مواد با خاصیت ضد میکروبی محسوب می شوند. مشکل عمده در استفاده از ترکیبات محقیقن مذکور رهایش ترکیبات فلزی سمی از قبیل نقره و جذب آن توسط بدن آبزی می باشد که می تواند در اندامهای مختلف تجمع یابند. استفاده از ترکیبات رس بنتونیت اصلاح شده در مطالعه اخیر تا کنون در صنعت آبزی پروری گزارش نشده است. مطالعات محدودی در زمینه خاصیت ضد میکروبی کیتوزان حاوی نقره در آبزی پروری صورت پذیرفته است (Dananjaya *et al*., 2016). نتایج این تحقیقات نشان داد که ترکیب حاوی نقره از روش های مختلف باعث از بین رفتن باکتری ها می شود. از جمله اینکه نفوذ نقره به داخل سلول باکتریایی و اثر گذاری بر DNA سلولی سبب مرگ باکتریها می گردند. از طرفی نقره سبب اثر گذاری بر تبادلات غشاء سلول باکتریایی، مختل نمودن فعالیت آنزیمهای سیتوپلاسمی و تولید رادیکالهای آزاد کشنده درون سلولی می شود و از این طریق باعث از بین رفتن باکتریها می گردد. نتایج این تحقیق نشان داد که ترکیبات اصلاح شده معدنی و آلی مورد استفاده قابلیت مناسبی در حذف باکتریهای مورد بررسی از خود نشان دادند که می توانند به عنوان یترکیبات جدید با کارایی بالا در صنعت آبزی‌پروری مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه صنعتی اصفهان به لحاظ فراهم نمودن بودجه و امکان تحقیق سپاسگزاری می شود.

منابع

شکوه سلجوقی، ظ.، رفیعی، غ.، ایمانی، ا. و بختیاری، م.، ۱۳۹۱. کاربرد بنتونیت احیا شده به روش اسیدی- گرمایی و سورفکتانت کاتیونی کاهش آلاینده های زیست محیطی فسفاته و سولفاته در پساب آبزی پروری. مجله محیط شناسی، ۳۸: ۴۰-۳۱.

عادل، م.، صفری، رضا.، ذریه زهرا، م.، الهیف راضیه.، ۱۳۹۵. مطالعه اثرات ضد باکتریایی برخی از عصاره های گیاهیبر باکتری یرسینیا راکری *Yersinia ruckeri* در شرایط آزمایشگاهی. مجله علمی شیلات ایران، ۳:۵۱-۴۱.

Akmaz, S., Adjgüzel, E.D., Yasar, M and Erguven, O., 2013. The effect of Ag content of the chitosan-silver nanoparticle composite material on the structure and antibacterial activity. Advances in Materials Science and Engineering, 12:1-6.DOI: 10.1155/2013/690918.

Beppu, M.M., Vieira, R.S., Aimoli, C.G and Santana, C.C., 2007. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. Journal of Membrane Science, 301: 126-130 .DOI:10.1016/j.memsci.2007.06.015.

Bestor, M.S., Mustamaki, N., HeiniKainen, S., koshki, V.H., Jeffryes, D.V., Wiklund, T., 2010. Introduction of Yersinia ruckeri biotype 2 into Finnish fish farms. Aquaculture, 308: 1-5. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.08.009.

Dananjaya, S.H.S., Godahewa, G.I., Jayasooriya, R.G.P.T., Lee, J., De Zoysa, M., 2016. Antimicrobial effects of chitosan silver nano composites (CAgNCs) on fish pathogenic *Aliivibrio (Vibrio) salmonicida*, aquaculture, 450: 422-430. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.08.023.

Furones, M.D., Rodgers, C.J., Munn, C.B., 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. Annual Review of Fish Diseases, 3: 105-125. DOI: 10.1016/0959-8030(93)90031-6.

Grant R.L., Yao C., Gabaldon D., Acosta D., 1992. Evaluation of Surfactant Cytotoxicity Potential by Primary Cultures of Ocular Tissues: I. Characterization of Rabbit Corneal Epithelial Cells and Initial Injury and Delayed Toxicity Studies. Toxicology, 76: 153-176. DOI: 10.1016/0300-483X(92)90162-8.

Haldori, Y., Shim, J., 2013. Chitosan-Zinc Oxide hybrid composite for enhanced dye degradation and antibacterial activity. Composite Interfaces, 20: 365–377. DOI: 10.1080/15685543.2013.806124.

Jain, P and Pradeep, T., 2005. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. Biotechnology and bioengineering, 90: 59-63. DOI: 10.1002/bit.20368.

Johari, S.A., Kalbassi, M. R., Yu, J., 2013. Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Iranian Journal of Fisheries Sciences, 1276-95. DOI: 0.12980/JCLM.2.2014J28.

Li, G.Y., Jiang, Y., Hoang, K., Ding, P., Chen, J., 2008. Preparation and properties of magnetic Fe3O4–chitosan nanoparticles. Journal of Alloys and Compounds, 466: 451–456. DOI: 10.1016/j.jallcom.2007.11.100.

Lv, Y., Liu, H., Wang, Z., Liu, S., Hao, L., Sang, Y., Boughton, R. I., 2009. Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment. Journal of Membrane Science, 331: 50-56. DOI: 10.1016/j.memsci.2009.01.007.

Malek, N.A., NurAzalisa, W., Lin, C., 2016. Antibacterial activity of cetyltrimethylammonium bromide modified silver-bentonite. Applied Clay Science, 45: 265-272. DOI: 10.1051/matecconf/20166003005.

Nagamune H., Maeda T., Ohkura K., Yamamoto K., Nakajima M., Kourai H., 2000. Evaluation of the cytotoxic effects of bis–quaternary ammonium antimicrobial reagents on human cells. Toxicology In Vitro, 14: 139–147. DOI: 10.1016/S0887-2333(00)00003-5.

NCCLS., 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard-6th ed. M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Ozdemir, G., Yapar, S., Limoncu, M., 2013. Preparation of cetylpyridinium montmorillonite for antibacterial applications. Applied Clay Science, 72: 201–205. DOI: 10.1016/j.clay.2013.01.010.

Sarkheil, M., Sourinejadad, I., Mirbakhsh, M., Kordestanid, D., Joharie, S.A., 2016. Application of silver nanoparticles immobilized on TEPA-Den-SiO2 as water filter media for bacterial disinfection in culture of Penaeid shrimp larvae. Aquacultural Engineering, 74: 17–29. DOI: 10.1016/j.aquaeng.2016.05.003.

Soltani, M., Fadaii, F., Mehrabi, M.R., 1999. First report of a yersiniosis-like infection in Iranian farmed rainbow trout. Bulletin-

European Association of Fish Pathologists. 9:173-177.

Soltani, M., Shafiei, Sh., Mirzargar, S.S., Ebrahimzadeh Musavi, H.A., Ghodratnama, M., 2014. Study of efficacy of vaccination against yersinosis in rainbow trout using local strains of *Yersinia ruckeri*. Journal of Veterinary Research, 69: 57-63. DOI: 2008-2525.

Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., Chiers, K., 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. Journal of Fish Diseases. 30: 257-268. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2007.00816.x.

Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Ryckarert, J., Duchateau, L., Haesebrouck, F., 2009. Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout Onchorhynchus mykiss. Diseases of Aquatic Organisms, 84:219-228. DOI: 10.3354/dao02057.

Tukmechi, A., Ownagh, A., Mohebbat, A., 2010. In vitro antibacterial activities of ethanol extract of iranian propolis (EEIP) against fish pathogenic bacteria (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*). Brazilian Journal Microbiolgy, 41: 1086-1091. DOI: 10.1590/S1517-83822010000400030.

Turker, H., Birinci yildirim, A., Pehlivan karkas, F., Koyluoglu, H., 2009. Antibacterial activities of extracts from some Turkish endemic plants on common fish pathogens. Turk Journal Biology. 33:73-78. DOI: 10.3906/biy-0805-18.

Wang, C.Y.C., Shie, H.S., Chen, S.C., Hung, J.P., Hsie, H.T.C., 2007. Lactococcus garvieae infections in human: possible association with aquaculture outbreaks. International Journal of Clinical Practice, 61(8): 68-73. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2006.00855.x.

Zhi, L., Li, Q., Li, Y., Sun, Y., 2014. Self-aggregation and antimicrobial activity of saccharide-cationic surfactants. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 456: 231-237. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2014.05.042.

Study on antibacterial effect of chitosan containing silver oxide and modified bentonite with cationic surfactant against *Yersinia ruckeri* isolated from rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*)

Shokouh Saljoghi Z.[1*], Farhadian O.[1], Ramezanian N.[2], Mehraban Sangatash M.[3]

* zoheirsaljoghi@gmail.com

1-Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

2- Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3-Food Quality and Safety Research Group, Food science and Technology research Institute, ACECR, Mashhad, Iran

Abstract

In this study, the antibacterial effects of modified bentonite with cationic surfactant and chitosan containing silver oxide against Yersinia ruckeri were investigated under laboratory conditions. These antimicrobial compounds were prepared with bentonite modified with cationic surfactant Tetradecyltrimethylammonium bromide and chitosan modified with silver oxide. The X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for determination of the structures of bentonite and chitosan composite containing silver oxide showed that the surface and layer structures of them were changed by modification. The antibacterial effects of the two types of antimicrobial compounds on gram-negative bacteria Yersinia ruckeri under laboratory conditions were investigated according to the disk diffusion and macrodilution methods. The results of the disk diffusion method indicated that these compounds had antibacterial properties. The minimum bactericidal concentration (MBC) and the minimum inhibitory concentration (MIC) were determined by the use of microdilution method and counting of colonies on agar plates. The zone of inhibition of chitosan containing silver oxide and modified bentonite were 5.63±0.53 and 1.2±0.16 mm, respectively. The minimum bactericidal concentrations (MBC) of chitosan containing silver oxide and the modified mineral clay compound against Yersinia ruckeri in 10 minutes were 28.57 and 42.85 mg/L. The minimum inhibitory concentration (MIC) of chitosan containing silver oxide and modified clay in 10 minutes was 14.28 mg/L. The results of this study showed that modified bentonite and chitosan containing silver oxide had strong antimicrobial effects and the ability to kill pathogens under laboratory conditions. The bactericidal effect of chitosan containing silver oxide was stronger than the bactericidal effect of modified bentonite clay.

Keywords: Bentonite, Cationic surfactant, Chitosan, Yersinia ruckeri, Antimicrobial effect

*Corresponding author