استفاده از گرانول و الیاف زئولیت نقره (زئومیک) در سیستم فیلتراسیون آب به منظور کاهش عفونت ناشی از باکتری *استرپتوکوکوس اینیائی* در بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان

مریم قهرمانی[۱]، محمدرضا کلباسی[۲]، مهدی سلطانی[۳] و سیدعلی جوهری[۴]

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۳۰

خلاصه

با توجه به امکان شیوع بیماری استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورشی قزل آلای رنگین کمان ایران و خسارات ناشی از آن بر صنعت آبزی پروری، در این تحقیق امکان استفاده غیر مستقیم از زئولیت نقره به دو صورت گرانول (به میزان ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم) و الیاف (به میزان ۱۰۰ گرم) در سیستم فیلتراسیون آب پرورش بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان، با هدف کنترل باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*، مورد مطالعه قرار گرفت. پس از اطمینان از توان بازدارندگی زئولیت نقره بر علیه باکتری مذکور در شرایط آزمایشگاهی (از طریق آزمایش‌های تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)، آنتی‌بیوگرام روی پلیت و آنتی‌بیوگرام داخل لوله) فیلتر مدیاهای مذکور در فیلترهای تصفیه آب بکار گرفته شدند. در مرحله بعد جهت انجام آزمایش‌ها در محیط طبیعی، باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* (10^5 سلول در میلی‌لیتر) به آب تلقیح گردید و کارایی فیلترها در مهار باکتری از طریق سنجش بار باکتریایی آب، بررسی میزان مرگ و میر و علایم بالینی ماهیان و نیز کشت اندام‌های کلیه و طحال ارزیابی گردید. بر اساس نتایج به دست آمده حداقل غلظت بازدارنده زئولیت نقره بر رشد باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. نتایج حاصله اختلاف معنی‌داری را در کاهش بار باکتریایی آب، تلفات ماهی و ظهور علایم بیماری در تیمارهای حاوی ترکیبات نقره در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد و در مجموع از بین فیلتر مدیاهای آزمایش شده در این بررسی، الیاف زئولیت نقره با کاهش تعداد باکتری از log ۵/۴۸±۰/۰۱ به log ۳/۵±۰/۱۷ بالاترین کارایی را جهت استفاده در سیستم فیلتراسیون آب به منظور کنترل باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* داشت. با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد استفاده غیر مستقیم از ترکیبات نقره مورد مطالعه به صورت کاربرد در فیلترها از پتانسیل کافی در کاهش حدت و کنترل باکتری و پیشگیری از شیوع بیماری در سیستم پرورش قزل آلا برخوردار باشند. آگاهی از سایر تاثیرات جنبی اینگونه مواد بر روی آبزیان مستلزم انجام تحقیقات بیشتر است.

کلمات کلیدی: زئولیت نقره، قزل آلای رنگین کمان، استرپتوکوکوزیس، فیلتراسیون

مقدمه

امروزه صنعت آبزی پروری یکی از منابع مهم تأمین پروتئین در جهان محسوب می‌شود. در این خصوص پرورش ماهیان سردابی و به ویژه قزل آلای رنگین کمان *(Oncorhynchus mykiss)* از جایگاه خاصی برخوردار است. طبق آخرین آمار منتشر شده توسط سازمان خوار و بار و کشاورزی ملل متحد، در سال ۲۰۰۹ میزان تولید قزل آلای رنگین کمان بالغ بر ۷۳۶۴۲ تن بوده و ایران پس از ترکیه رتبه دوم جهان در تولید این ماهی در آب‌های شیرین را داشته است (۸). یقیناً پیشگیری از بیماری‌های آبزیان کلید موفقیت در صنعت آبزی پروری در آینده

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

[۲] دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس E-mail: kalbassi_m@modares.ac.ir (نویسنده مسئول)

[۳] استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان ، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

[۴] دانشجوی دکترای تخصصی شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

خواهد بود. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی شایع در اکثر مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان در سال‌های اخیر در بسیاری از کشورهای دنیا استرپتوکوکوزیس[1] گزارش شده است (۳). مطالعات متعددی در خصوص بیماری‌زایی، شناسایی و جداسازی بیماری از مزارع تکثیر و پرورش قزل آلای کشور انجام گرفته است (۱، ۲۶ و ۲۸) که بیانگر گسترش بیماری در مزارع قزل آلای کشور بوده و تا کنون موجب خسارات زیادی بر این صنعت گردیده است. به علاوه در این مطالعات گونه عمده درگیر در بروز استرپتوکوکوزیس در مزارع قزل آلای ایران *استرپتوکوکوس اینیایی*[2] (۲۶) و لاکتوکوکوس گارویه[3] (۲۸) معرفی شده است.

به علت توسعه گونه‌های جدید باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و همچنین محدودیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، توسعه قابلیت‌های جدید برای محافظت در برابر باکتری‌ها نیازی ضروری است و استفاده از ترکیبات ضد میکروارگانیسم پایدار که باعث ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌ها نشود اجتناب‌ناپذیر است (۱۶، ۲۵ و ۳۳). در حال حاضر تحقیقات زیادی بر روی ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی و غیر آلی در حال انجام می‌باشد که در بین آنها نقره به دلیل پایداری بالا و طیف وسیع فعالیت ضدباکتریایی از مدت‌ها پیش مورد توجه بوده است (۷ و ۱۱).

زئولیت‌ها، آلومینوسیلیکات‌های سدیم هیدراته[4] هستند که به علت خواص فیزیکو شیمیایی بی‌نظیری همچون جذب گازها و عوامل سمی، خاصیت جابجایی یونی، غربال کنندگی مولکولی و خواص کاتالیتیک[5] (۶) به عنوان فیلترهای تصفیه آب بکار می‌روند (۱۸، ۳۲ و ۳۴). از طرفی زئولیت کشش قوی نسبت به یون نقره Ag^+ نشان می‌دهد و می‌تواند از طریق الکترواستاتیکی تا نزدیک به ۴۰٪ وزنی، یون نقره را در ساختار خود محصور نماید (۱۴ و ۳۰). زئولیتی که حاوی یون‌های نقره باشد (زئولیت نقره)، می‌تواند در ترکیب با انواع رزین‌ها و پلیمرهای مصنوعی و طبیعی فعالیت ضد باکتری و ضد قارچی از خود نشان دهد (۳۰ و ۳۱).

Kawahara و همکاران در سال ۲۰۰۰، باکتریایی زئولیت نقره را علیه باکتری‌های دهانی از جمله *Streptococcus mutans* و *Staphylococcus aureus* مورد بررسی قرار دادند. نتایج به دست آمده نشان داد که زئولیت نقره از رشد باکتری‌های مورد آزمایش تحت شرایط بی‌هوازی جلوگیری می‌کند و میزان MIC به دست آمده ۲۰۴۸-۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد (۱۴).

Inoue و همکاران در سال ۲۰۰۲، فعالیت ضد باکتریایی زئولیت نقره را در مقابل باکتری *E. coli* تحت شرایط هوازی مورد مطالعه قرار دادند و ثابت شد که فعالیت ضد باکتریایی یون Ag^+ تحت شرایط بدون اکسیژن قدرت کمتری نسبت به شرایط غنی از اکسیژن داشته است (۱۲). Matsumura و همکاران در سال ۲۰۰۳، در مطالعه‌ای به بررسی فعالیت ضد باکتریایی زئولیت نقره علیه باکتری *E. coli* پرداخته و به این نتیجه رسیدند که یون‌های نقره نقش مهمی را در فعالیت ضد باکتریایی زئولیت نقره ایفا می‌کنند (۱۷).

اگر چه مطالعات مختلفی وجود دارد که استفاده غیر مستقیم از ترکیبات نقره را به صورت فیلتر برای تصفیه آب پیشنهاد کرده‌اند (۲۴). اما در حال حاضر اطلاعات دقیقی در مورد تأثیرات ضد باکتریایی زئولیت نقره در پیشگیری یا درمان بیماری‌های آبزیان گزارش نشده است. بنابراین در مطالعه حاضر با هدف کنترل باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* امکان استفاده از زئولیت نقره در سیستم فیلتراسیون آب پرورش ماهی قزل آلای رنگین

1- Streptococosis
2- *Streptococcus iniaie*
3- *Lactococcus garvieae*
4- Hydrated sodium aluminosilicate
5- Catalytic

کمان مورد مطالعه قرار گرفت. در این راستا سعی شده است تا به این فرضیه پاسخ داده شود که آیا استفاده از زئولیت نقره و همچنین فیلترهای حاوی گرانول یا الیاف زئولیت نقره در سیستم فیلتراسیون پرورش بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان منجر به کنترل باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* خواهد شد؟

مواد و روش کار

زئولیت نقره

پودر زئولیت نقره نوع AJ10N با نام تجاری زئومیک از شرکت ژاپنی سینانن[1] تهیه گردید. این ماده محتوی ۲/۵٪ وزنی یون نقره است که به طور 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 ۲/۵ میکرومتر می‌باشد.

گرانول زئولیت نقره (زئومیک نوع BG02N)، با ابعاد ۲ تا ۵ میلی‌متر، از شرکت سینانن ژاپن تهیه گردید. این ماده متشکل از ۷۰٪ زئولیت نقره و ۳۰٪ رس (به عنوان بایندر) می‌باشد (میزان نهایی نقره برابر ۱/۷۵ درصد می‌باشد). الیاف زئولیت نقره از جنس پلیمر Polyamide و متشکل از ۵٪ زئولیت نقره (میزان نهایی نقره برابر ۰/۱۲۵ درصد) نیز از شرکت مذکور خریداری گردید (شکل ۱).

شکل ۱- تصویر الیاف زئولیت نقره (سمت راست) و گرانول زئولیت نقره (سمت چپ) مورد استفاده در سیستم فیلتراسیون آب.

باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*

استرپتوکوکوس‌ها باکتری‌های گرم مثبت کروی شکل با ضخامت کمتر از ۲ میکرون می‌باشند که در محیط‌های آبی به صورت دوتایی یا زنجیره‌ای دیده می‌شوند. انتقال آنها به صورت افقی و تماس مستقیم از ماهی مبتلا یا غذای آلوده صورت می‌گیرد (۱۵). استوک خالص باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* (با کد D) از گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید، که از تلفات ماهیان قزل آلای مزارع کشور جداسازی و شناسایی شده بود (۲۶). برای تهیه سوسپانسیون باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* به میزان لازم از پرگنه‌های باکتری روی محیط TSA حاوی ژلوز خوندار برداشته و به داخل یک لوله آزمایش محتوی بافر نمکی فسفات (PBS) (۷/۲ گرم Nacl، ۱/۴۸ گرم Na_2HPo_4، ۰/۴۳ گرم KH_2Po_4 در ۱ لیتر آب مقطر) منتقل و توسط شیکر یکنواخت گردید. سپس غلظت باکتری‌ها با محلول مک فارلند[2] ۱ (۰/۱ میلی‌لیتر 1% $BaCl_2$ ، ۹/۹ میلی‌لیتر 1% H_2So_4) تنظیم گردید تا تعداد 3×10^8 سلول در میلی‌لیتر باکتری در سوسپانسیون مورد نظر موجود باشد.

1- Sinanen
2- Mac Farland Nephelometery Standards

آزمایش‌های میکروبی

تعیین حداقل غلظت بازدارنده[1] زئولیت نقره (MIC)

برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده زئولیت نقره دوازده غلظت هندسی نزولی از زئولیت نقره شامل ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵،۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲،۷/۸۱،۳/۹۰، ۱/۹۵ و ۰/۹۷ میکروگرم در میلی‌لیتر داخل لوله‌های آزمایش تهیه گردید. آنگاه ۱ میلی‌لیتر از محتویات هر کدام از لوله‌های آزمایش به شیشه‌های محتوی ۱۹ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیک سویا براث (TSB) اضافه شد. در مرحله بعد، از سوسپانسیون تهیه شده باکتری ۱۰ میکرولیتر به هر کدام از لوله‌های محتوی محیط کشت TSB و زئولیت نقره اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. پس از طی زمان ۲۴ ساعت با استفاده از میکروسمپلر، ۱۰ میکرولیتر از محتوی هر یک از شیشه‌ها برداشته و در مرکز پلیت‌های محتوی محیط کشت ژلوز خوندار اضافه و با استفاده از آنس کشت سطحی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار گرفت. محیط کشت فاقد زئولیت نقره نیز به عنوان شاهد آزمایش در نظر گرفته شد. همچنین تیمار کنترل منفی یعنی محیط کشت فاقد زئولیت نقره که بر روی آن کشتی انجام نگرفته بود آماده شد، تا از عدم حضور هر گونه میکروارگانیسم دیگری در شرایط آزمایش اطمینان حاصل گردد. رشد پرگنه‌های *استرپتوکوکوس اینیایی* در حضور زئولیت نقره با رشد آن در نمونه‌های شاهد مقایسه شد. غلظتی از زئولیت نقره که در آن هیچ‌گونه باکتری بر روی پلیت رشد نکرد به عنوان حداقل غلظت کشنده و غلظتی از زئولیت نقره که در آن بیش از ۹۰٪ باکتری‌ها در مقایسه با تیمار شاهد از بین رفتند، به عنوان حداقل غلظت بازدارنده زئولیت نقره مشخص شد (۲۷).

آزمایش آنتی‌بیوگرام روی پلیت[2]

برای انجام این آزمایش ابتدا میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* (حاوی 10^5 سلول در میلی‌لیتر) به محیط ژلوز خوندار تلقیح و کشت سطحی داده شد. سپس ۱ گرم از پودر زئولیت نقره در وسط پلیت‌های تلقیح شده با باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت کشت داخل انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اندازه ناحیه ممانعت از رشد باکتری اندازه‌گیری شد (۱۳).

آزمایش آنتی‌بیوگرام داخل لوله[3]

برای انجام این آزمایش ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* با تراکم 10^8 سلول در میلی‌لیتر داخل لوله‌های آزمایش محتوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته شد. پس از آن داخل هر لوله آزمایش ۱ گرم از پودر زئولیت نقره، اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر به خوبی مخلوط شد. در گروه شاهد نیز تمام شرایط یکسان بود و فقط پودر زئولیت نقره به لوله آزمایش اضافه نگردید. پس از انجام رقیق‌سازی به میزان ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های 10^{-1}، 10^{-3} و 10^{-5} برداشته و بر روی پلیت‌های محتوی محیط کشت ژلوز خوندار کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون صورت پذیرفت. پس از طی زمان انکوباسیون با بررسی میزان رشد باکتری بر روی پلیت، مشخص گردید که آیا پودر زئولیت نقره مورد استفاده قادر به ممانعت از رشد باکتری گردیده است یا خیر (۱۳).

مطالعات In vivo

پس از بررسی خواص ضد میکروبی زئولیت نقره در شرایط آزمایشگاهی، برخی روش‌های ممکن برای استفاده

1- Minimum inhibitory concentration
2- Zone of inhibition test
3- Test tube test

غیر مستقیم از زئولیت نقره در مراحل پرورش بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان در کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان واقع در دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور با استفاده از فیلترهای تصفیه آب آکواریوم، پس از خارج نمودن فوم موجود در محفظه فیلترها، بسترهای مورد تحقیق در مقادیر زیر جایگزین فوم مذکور در فیلترها گردید:

۱- گرانول زئولیت نقره در مقادیر ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم در هر فیلتر.

۲- الیاف زئولیت نقره به میزان ۱۰۰ گرم در هر فیلتر.

۳- فیلترهای حاوی فوم معمولی (مرسوم در فیلترهای تصفیه آب آکواریوم) به عنوان تیمار شاهد.

برای شروع آزمایش در هر آکواریوم با حجم ۸۰ لیتر تعداد ۱۵ عدد بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان ۱۵-۱۰ گرمی قرار داده شد. پس از راه‌اندازی فیلترها آلوده‌سازی آب بوسیله باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* با تراکم 10^5 سلول در میلی‌لیتر انجام شد. در زمان‌های ۲، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از آلوده‌سازی، نمونه‌برداری از آب خروجی فیلترها انجام شد. برای انجام نمونه‌برداری در هریک از ساعت‌های مذکور از شیشه‌های ۵۰ میلی‌لیتری تیره رنگ که برای هر آکواریوم به صورت مجزا اختصاص داده شده بودند، استفاده گردید. بلافاصله پس از نمونه‌برداری، شیشه‌ها به آزمایشگاه انتقال داده شدند. برای شروع کشت نمونه‌های آب، ابتدا رقیق‌سازی متوالی انجام شد. به این ترتیب که ۱ میلی‌لیتر از نمونه آب مربوط به هر تیمار به ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک موجود در لوله آزمایش اول اضافه گردید. آنگاه ۱ میلی‌لیتر از لوله اول برداشته و به لوله دوم اضافه شد. این کار تا لوله آزمایش پنجم ادامه یافت و ۱ میلی‌لیتر انتهایی دور ریخته شد. به این ترتیب رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4} و 10^{-5}سلول در میلی‌لیتر تهیه گردید. پس از پایان رقیق‌سازی ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های 10^{-1}، 10^{-3} و 10^{-5} سلول در میلی‌لیتر بر روی محیط کشت ژل خون‌دار کشت داده شده و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (۲۶). پلیت‌ها در فواصل زمانی ۲۴ تا ۴۸ ساعت به طور مرتب جهت شمارش کلونی‌های باکتری بررسی شدند. برای سنجش کارایی هر یک از فیلترها علاوه بر کشت باکتری از نمونه آب، میزان مرگ و میر ماهیان و علایم ظاهری آنها نیز مورد بررسی قرار گرفت. در پایان دوره نیز برای بررسی رشد باکتری داخل اندام‌های ماهی (کلیه و طحال)، از هر یک از تیمارها به طور تصادفی ۳ ماهی انتخاب شده و کشت اندام‌های مذکور انجام شد. برای این منظور ابتدا سطح خارجی بدن هر ماهی به طور کامل با الکل استریل گردید. سپس توسط قیچی‌های استریل مجزا، یک برش طولی و یک برش عرضی از انتهای باله مخرجی هر ماهی داده شد تا امعاء و احشاء آن قابل رؤیت گردد. آنگاه توسط آنس استریل از کلیه و طحال هر ماهی یک تکه برداشته و روی پلیت‌های محتوی محیط کشت ژل خون‌دار کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفت. پس از طی ۲۴ ساعت پلیت‌ها جهت شمارش کلونی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت بررسی شدند و نتایج حاصله ثبت شد (۲).

تجزیه و تحلیل آماری

پراکنش طبیعی داده‌های حاصل از این تحقیق با آزمون کولموگروف- اسمیرنوف پردازش گردید. پردازش آماری نتایج حاصله شامل میزان رشد باکتری در آزمایش تعیین حداقل غلظت بازدارنده، بررسی تأثیر نوع بستر زئومیکی (گرانول یا الیاف) و مقایسه کارایی فیلترها توسط نرم‌افزار SPSS ۱۳/۲ و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام پذیرفت. مقایسه میانگین‌ها در سطح ۹۵٪ انجام شد.