

خاصیت ضد میکروبی کامپوزیت کیتوزان با بنتونیت اصلاح شده علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا بیماری‌زای آبزیان

ظهیر شکوه سلجوقی^{۱*}، امیدوار فرهادیان^۱، نوید رمضانیان^۲

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

واژه‌های کلیدی

کامپوزیت کیتوزان

بنتونیت

روش اسیدی- گرمایی

آئروموناس هیدروفیلا

خاصیت ضد میکروبی

کنترل بیماری‌های باکتریایی ماهیان همواره یکی از مهمترین مشکلات آبزی پروران در طی سالهای اخیر بوده است. از این رو، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی جدید با حداقل عوارض مرسوم گردیده است. در این پژوهش با استفاده از روش اسیدی-گرمایی ساختار بنتونیت اصلاح گردید، سپس مبادرت به ساخت هیبرید کیتوزان و بنتونیت اصلاح شده گردید. ساختار ترکیبات با استفاده از روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) مطالعه گردید. مطالعه ضد باکتریایی ترکیبات بر باکتری گرم منفی آئروموناس هیدروفیلا در شرایط آزمایشگاهی با دو روش دیسکی و میکرودايلوشن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج روش دیسکی نشان داد که ترکیبات ساخته شده دارای خاصیت ضد باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا بودند. بنتونیت اصلاح شده با روش اسیدی-گرمایی دارای قطر هاله عدم رشد برابر با $11/16 \pm 0/11$ و هیبرید کامپوزیت کیتوزانی برابر با $8/54 \pm 0/12$ بود. برای تعیین قدرت ضد میکروبی (MIC و MBC) از روش میکرودايلوشن و شمارش کلونی در محیط کشت اگر استفاده گردید. نتایج نشان داد که ترکیب اصلاح شده با روش اسیدی گرمایی دارای MBC به میزان $28/57$ و $14/28$ میلی گرم بر لیتر برای باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ده دقیقه و سی دقیقه بودند. برای کامپوزیت کیتوزان و بنتونیت اصلاح شده دارای MBC به میزان $14/28$ میلی گرم بر لیتر برای باکتری آئروموناس هیدروفیلا در ده و سی دقیقه بودند. نتایج نشان داد که ترکیبات اصلاح شده بنتونیتی و کامپوزیتی ساخته شده دارای اثرات ضد میکروبی قوی بوده و قابلیت حذف عوامل بیماری‌زا را در شرایط آزمایشگاهی داشته و می‌توانند به عنوان ترکیبات جدید به منظور کنترل عوامل بیماری‌زا در سیستم‌های پرورشی مورد استفاده قرار گیرند.

*مسئول مکاتبات:

zoheirsaljoghi@gmail.com

۱ مقدمه

امروزه صنعت پرورش ماهیان با شیوع بیماری‌های باکتریایی رو به رو است، که نتیجه‌ی آن مرگ و میر بالا و از دست رفتن بخش اعظمی از منابع مالی است [۱]. بیماری‌های باکتریایی شایع‌ترین مشکل عفونی ماهیان پرورشی است و اکثر عفونت‌های باکتریایی توسط ارگانیسم‌های گرم منفی ایجاد می‌شوند. اکثر باکتری‌های بیماری‌زای ماهیان، ساکنان طبیعی محیط آبی، اعم از آب شیرین یا دریایی هستند. عوامل استرس‌زا از جمله حمل و نقل، تراکم زیاد، کیفیت ضعیف آب و تغذیه ناکافی، باعث ایجاد بیماری‌های باکتریایی در ماهی می‌شود [۲]. آئروموناس متحرک از جمله شایع‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در ماهیان است و موجب ایجاد سندرمی موسوم به سپتی‌سمی آئروموناس متحرک (MAS) می‌گردد. این سپتی‌سمی بیشتر به وسیله باکتری‌های منحصر به فردی از جمله *A. caviae*، *A. hydrophila*، *A. sobria* که در آب شیرین متداول هستند به وجود می‌آید که علائم بالینی شایعی از جمله خونریزی‌های پوستی و زخم، خونریزی احشایی، ورم، آب آوردگی شکم و بیرون زدگی چشم‌ها دارد [۳]. همچنین باعث بیماری‌زایی در انسان نیز می‌گردند. در انسان سالم اغلب علائمی همچون عفونت و تورم موضعی داشته و در کسانی که دچار نقص ایمنی هستند می‌تواند عامل تهدید کننده‌ی زندگی آن‌ها شود.

سپتی‌سمی آئروموناسی متحرک، یک مشکل اساسی برای پرورش دهندگان ماهی در سراسر جهان می‌باشد. این آلودگی می‌تواند به سرعت در میان ماهیان گسترش یابد و مرگ و میر بالایی را به همراه داشته باشد [۴، ۵]. آئروموناس هیدروفیلا یک باکتری گرم منفی فرصت طلب می‌باشد که می‌تواند باعث خونریزی و زخم‌های سطحی در بیشتر گونه‌های آب شیرین شود [۶]. این باکتری از نظر اقتصادی بسیار مهم است، زیرا باعث بیماری‌زایی در انسان و گونه‌های آبزی از جمله ماهیان خوراکی و زینتی می‌گردد [۷].

افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها و مواد ضد عفونی کننده در باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان، به همراه عوارض متعددی که به وسیله استفاده معمول از عوامل ضد باکتریایی به وجود آمده، دانشمندان را به تحقیق در مورد عوامل ضد باکتریایی جدید واداشته و مطالعات نشان داده که ترکیبات با پایه‌های معدنی و آلی جدید می‌توانند جایگزین مناسبی برای این گونه مواد باشند [۸، ۹]. افزایش بیش از حد شیوع بیماری‌های باکتریایی در صنعت آبزی پروری و همچنین توسعه مقاومت باکتریایی، نیازمند عوامل ضد باکتریایی جدید می‌باشد. در میان مواد ضد میکروبی مختلف، کیتوزان به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است و از زمان‌های قدیم برای مبارزه با عفونت و جلوگیری از فساد استفاده می‌شده است [۱۰، ۱۱].

تحقیقات انجام شده خصوصاً در دهه‌های ۱۹۸۰ تا ۱۹۹۰ خواص ضد میکروبی کیتین و کیتوزان را به خوبی بیان نموده‌اند [۸، ۱۲]. در این تحقیقات کیتوزان به عنوان ماده‌ای باکتری کش و همچنین ماده‌ای که مانع از حرکت، فعالیت و رشد باکتری می‌شود معرفی شده است. اما بیشتر تحقیقات و مطالب علمی منتشر شده در مورد این ماده به نقش ممانعت از رشد باکتری‌ها توسط کیتوزان اشاره دارند [۱۲]. امروزه هنوز مکانیسم دقیق تاثیر کیتوزان در فرایندهای ضد میکروبی آن به طور کامل مشخص نشده است و گمان می‌رود که عوامل و فاکتورهای مختلفی در این بین ایفای نقش نمایند [۱۰]. ترکیبات معدنی رسی از جمله ترکیبات دیگری می‌باشند که در سالهای اخیر کاربردهای متنوعی را از خود نشان دادند. از جمله ترکیب آنها با عوامل ضد میکروبی مختلف سبب ایجاد ترکیبات متنوع با خاصیت ضد باکتریایی و قارچی گردیده است [۱۲]. در مطالعه حاضر با استفاده از تیمارهای اسیدی و گرمایی به ساخت ترکیبات ضد میکروبی پرداخته شده و در مرحله بعد پس از هیبریداسیون آن با کیتوزان به عنوان یک ترکیب جدید خاصیت ضد میکروبی آن علیه باکتری بیماری‌زای آئروموناس هیدروفیلا آبزیان بررسی گردید

مواد و روش‌ها

تهیه رس بنتونیت اصلاح شده با اسید هیدروکلریک

در این روش ابتدا کلیه ناخالصی‌های موجود در نمونه رس بنتونیت جمع‌آوری گردید. در مرحله بعد توسط محلول ۱ مولار کلرید سدیم رس را به مدت ۳ ساعت هم‌زده شد و در اون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. در مرحله بعد توسط اسید هیدروکلریک ۲ مولار به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد هم‌زده شد و سپس با آب دو بار تقطیر چندین بار شسته و در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد در اون خشک گردید. سپس ذرات به اندازه ۰/۸ تا ۱/۲ میلی‌متر در آمدند و در کوره در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد [۱۷، ۱۸].

تهیه کامپوزیت کیتوزان و بنتونیت اصلاح شده با روش راسیدی- گرمایی

در این روش با نسبت ۲ به ۱ (کیتوزان به رس بنتونیت اصلاح شده با روش اسیدی- گرمایی) به صورت قطره قطره ترکیب بنتونیتی را به محلول کیتوزان در اسید استیک در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد توسط همزن مغناطیسی هم‌زده شد. ترکیب حاصله چندین بار با آب مقطر شستشو داده شده و در مرحله بعد ترکیب حاصله را در دمایی ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید.

روش دیسکی

برای انجام آزمایش اندازه گیری منطقه مهار رشد باکتری از روش پورپلیت عمقی استفاده شد. بدین صورت که ابتدا از محیط کشت مولر هیتتون آگار مطابق با دستورالعمل قید شده بر روی ظرف حاوی محیط کشت تهیه و جهت استریل اتوکلاو شد در ادامه از استوک لیوفیلیزه باکتری آئروموناس هیدروفیلا با تلقیح در لوله حاوی ۵ میلی لیتر محیط استریل مولر هیتتون براث و گرمخانه گذاری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، کشت شبانه تهیه

شد. سپس از این کشت شبانه، سوسپانسیون میکربی معادل نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ سلول در میلی لیتر) با استفاده از اسپکتروفتومتری و قرائت جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر آماده سازی شد و به هر پلیت حاوی آگار سرد شده (با دمای ۴۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد) ۱ سی‌سی از سوسپانسیون میکربی فوق افزوده شد در ادامه قبل از سرد شدن و بستن کامل ژل از هر کدام از ترکیبات ساخته شده ضد میکربی (بنتونیت اصلاح شده و کامپوزیت کیتوزان حاوی بنتونیت اصلاح شده) به همراه کنترل شاهد (بنتونیت طبیعی و کیتوزان خام، بدون اصلاح و فاقد خاصیت ضد میکربی) به اندازه دو دهم گرم با سه تکرار و با فاصله در هر پلیت قرار داده شد. سپس درب پلیت‌ها بسته و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. خاصیت ضد میکربی با تشکیل هاله‌ای شفاف و فاقد رشد باکتری در اطراف هر کدام از ترکیبات که اندازه قطر این هاله با میزان خاصیت ضد میکربی رابطه مستقیم دارد، نمایان می‌شود. عدم تشکیل هاله شفاف در اطراف نمونه شاهد بیانگر انجام صحیح فرایند روی ترکیبات مورد آزمایش است. به عنوان کنترل مثبت از آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین جهت بررسی قابلیت ضد میکروبی استفاده گردید.

تست لوله آزمایش

به منظور بررسی و اندازه گیری توان ضد میکربی دو ترکیب کامپوزیت کیتوزانی و بنتونیت اصلاح شده علیه آئروموناس هیدروفیلا 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 ۷ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیتتون براث افزوده و بعد از بستن کامل درب لوله‌ها جهت استریل به اتوکلاو منقل شدند. بعد از استریل و سرد شدن لوله‌ها به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکربی با غلظتی معادل نیم مک فارلند افزوده و سپس

کشنندگی (MBC) استفاده شد بدین صورت که جهت تعیین MIC لوله های حاوی مقادیر مختلف ترکیب ضد میکروبی (از ۰/۱ تا ۱ گرم) تلقیح شده با میزان ثابتی از باکتری به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد سپس کدورت محیط کشت مایع هر یک از لوله ها بطور چشمی مشاهده شد. کدورت مشاهده شده از اولین لوله حاوی مقادیر کمتر ترکیب ضد میکروبی تا لوله آخر، به تدریج کم و در نهایت در لوله ای حاوی یکی از غلظت ها به بعد، کاملاً فاقد کدورت (فاقد رشد میکروبی) می شود لذا اولین لوله فاقد کدورت به عنوان MIC ترکیب مورد آزمایش ثبت شد در ادامه جهت تعیین MBC و اطمینان از عدم وجود باکتری زنده، از اولین لوله فاقد کدورت تا آخرین لوله، مقدار ۱ سی سی نمونه با سمپلر برداشته و روی پلیت های حاوی مولر هیتون آگار که از قبل تحت شرایط استریل تهیه شده بود به صورت پورپلیت سطحی نمونه گذاری و پس از جذب نمونه ها توسط محیط، پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شده و سپس مورد بررسی قرار گرفتند. غلظتی از نمونه که از کشت آن هیچ گونه کلونی باکتریایی رشد نکرده بود به عنوان MBC آن ترکیب گزارش شد. معمولاً میزان MBC یک ترکیب از نظر مقدار آن ترکیب از میزان گزارش شده برای MIC بیشتر است [۲۰].

تصاویر میکروسکوپ الکترونی

برای تعیین ساختار و تغییرات به وجود آمده در سطح ترکیبات از تصاویر میکروسکوپ الکترونی پیمایشگر زمینه ای استفاده گردید. بدین منظور ابتدا ترکیبات با اصلاحات مختلف ساخته شده و همچنین ترکیبات بدون اصلاحات روی پایه های مخصوص چسبانده شده و توسط دستگاه پوشش دهنده ساخت شرکت Kyky، مدل SBC12 پوشش طلا داده شدند. سپس نمونه های آماده شده در میکروسکوپ الکترونی (پژوهشگاه بوعلی-دانشگاه علوم پزشکی مشهد) ساخت شرکت TEScan مدل MIRA 3 قرار داده شده و تصویربرداری از

به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد و در ادامه جهت بررسی و اندازه گیری توان ضد میکروبی 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.

با شمارش باکتری ها بعد از مجاور سازی با ترکیبات ضد میکروبی و گذشت زمان های مختلف می توان به میزان توان ضد میکروبی ترکیبات فوق دست یافت لذا به منظور توانایی شمارش کلنی ها از هر کدام از لوله ها در زمان های ذکر شده رقت های سریال 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 مولر هیتون آگار پخش شد پس از جذب نمونه توسط محیط، پلیت ها به انکوباتور ۳۷ درجه 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 هیتون آگار به همراه سوسپانسیون میکروبی بدون مجاور سازی با ترکیبات ضد میکروبی) به منظور داشتن رشد حداکثری باکتری و مقایسه با اثرات ضد باکتری ترکیبات مورد آزمایش و کنترل منفی (پلیت حاوی محیط کشت بدون تلقیح باکتری) به منظور کنترل شرایط استریل و اطمینان از عدم بروز آلودگی های ثانویه و کنترل شاهد (پلیت حاوی محیط کشت به همراه ترکیبات ضد میکروبی و بدون تلقیح باکتریایی) به منظور کنترل ترکیبات ضد میکروبی مورد آزمایش از جهت فقدان آلودگی، گذاشته شد.

جهت تعیین MIC و MBC به طریق زیر عمل شد:

دو سری لوله ده تایی که جهت تعیین فعالیت ضد میکروبی دو ترکیب مورد آزمایش علیه آئروموناس هیدروفیلا، مطابق قسمت فوق (تست لوله آزمایش) آماده سازی شده بود در ادامه آزمایش، جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت

بدون اصلاح و فاقد خاصیت ضد میکروبی بود. میزان حذف باکتری‌ها توسط ترکیبات اصلاح‌شده در زمان‌های ۱۰، ۳۰، ۶۰، ۱۸۰، ۳۶۰، ۷۲۰ و ۱۴۴۰ دقیقه برای باکتری‌ها در برابر مقادیر ماده ضد میکروبی به‌صورت جداگانه و مستقل در ۳ تکرار مورد مطالعه واقع شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها، نتایج با استفاده از نرم‌افزار به‌وسیله آنالیز واریانس یک‌طرفه بررسی و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده گردید. این موارد در نرم‌افزار SPSS 13 ویندوز ۷ اجرا شدند. رسم نمودارها نیز در نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی نتایج میکروسکوپ الکترونی (MES EF) و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (XDE)

شکل شماره ۱ بیانگر تصویر میکروسکوپ الکترونی بتونیت‌های خام و اصلاح شده با دو روش اسیدی-گرماپی می‌باشد. در شکل شماره ۱ تصویر سمت چپ، صفحه‌بندی لایه‌ای که مشخصه رسه‌های بتونیتی می‌باشد کاملاً مشخص می‌باشد. در شکل سمت پایین-راست رس بتونیت اصلاح شده توسط روش اسیدی-گرماپی آورده شده است که اعمال تیمارهای متعدد دما و اسیدی سبب برهم خوردن لایه‌بندی رس و شکل‌گیری حالت جدید (متخلخل) در نمونه گردیده است. نتایج میکروسکوپ الکترونی نشان داد که تغییرات متناسب با نوع روش اصلاحی در نمونه‌ها در مقایسه با نمونه خام اولیه ایجاد گردید. شکل شماره ۲ بیانگر کیتوزان خام (سمت چپ) و کامپوزیت کیتوزان حاوی بتونیت اصلاح‌شده است همانطور که در شکل شماره ۲ مشخص است یک بی‌شکلی در هر دو نمونه کیتوزان خام و کامپوزیت کیتوزانی مشاهده می‌گردد [۱۹].

طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) در مورد نمونه‌ها نشان داد که نمونه بتونیت خام دارای عناصری از قبیل آلومینیوم، سیلیسیوم، اکسیژن، سدیم، منیزیم و ... می‌باشد که عناصر شاخص فیلوسیلیکات‌های آبدار از قبیل بتونیت است. در نمونه اصلاح شده با اسید

نمونه‌ها انجام گردید. در تصاویر با بزرگنمایی ۱۰ هزار برابر، قطر ذرات موجود به‌وسیله نرم‌افزار Digimzer ver4.1.1.0 اندازه‌گیری شد.

طیف‌سنجی مادون قرمز

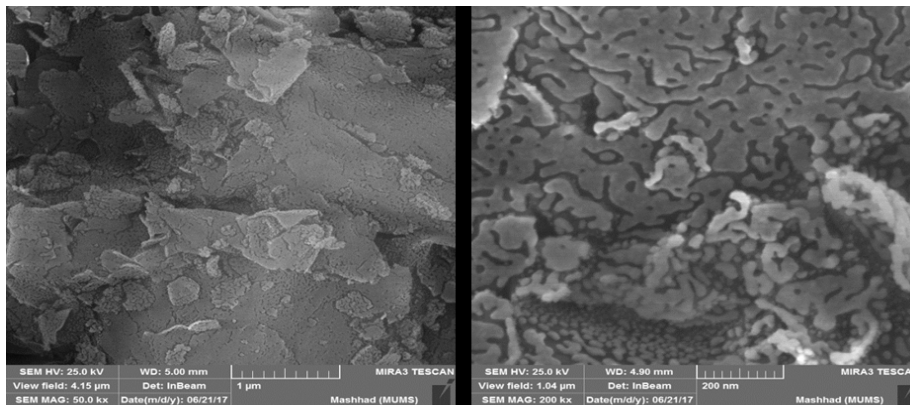
طیف‌سنجی مادون قرمز بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. این روش به‌عنوان روشی پر قدرت و توسعه‌یافته برای تعیین ساختار و اندازه‌گیری گونه‌های شیمیایی به‌کار رفته می‌رود. همچنین این روش عمدتاً برای شناسایی ترکیبات آلی به کار می‌رود، زیرا طیف‌های این ترکیبات معمولاً پیچیده هستند و تعداد زیادی پیک‌های ماکسیمم و مینیمم دارند که می‌توانند برای اهداف مقایسه‌ای به کار گرفته شوند. نمونه‌ها پس از پودر شدن در هاون به آزمایشگاه شیمی تجزیه دانشگاه فردوسی مشهد انتقال داده و به‌وسیله دستگاه (FTIR, Shimadzu 8400s) مورد آنالیز قرار گرفتند.

طیف‌سنجی پراش انرژی اشعه ایکس

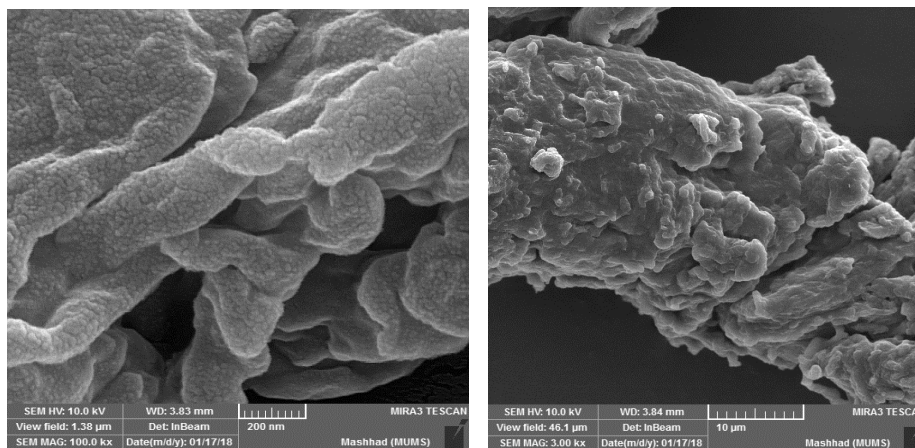
طیف‌سنجی پراش انرژی اشعه ایکس (EDS یا EDX) یک روش تحلیلی است که برای تجزیه و تحلیل ساختاری یا خصوصیات شیمیایی یک نمونه به‌کاررفته می‌رود. این روش بر بررسی برهم‌کنش بین یک منبع برانگیختگی پرتو ایکس و یک نمونه متکی است. قابلیت‌های توصیفی این روش به‌طور کلی بر اساس این اصل کلی است که هر عنصر دارای یک ساختار اتمی منحصربه‌فرد است که مجموعه منحصربه‌فردی از قله‌ها را در طیف پرتو ایکس آن ممکن می‌سازد. در طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس نمونه‌ها پس از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی توسط دستگاه متصل به میکروسکوپ مورد آنالیز قرار گرفتند.

روش‌های آماری مورد استفاده

روش آماری بخش میکروبی مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۲ تیمار (مقدار ماده و زمان) و ۳ تکرار اجرا شد. تیمار شاهد در روش بررسی میکروبی ترکیبات



شکل شماره ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی بتونیت خام (چپ) و بتونیت اصلاح شده با اسید (راست)



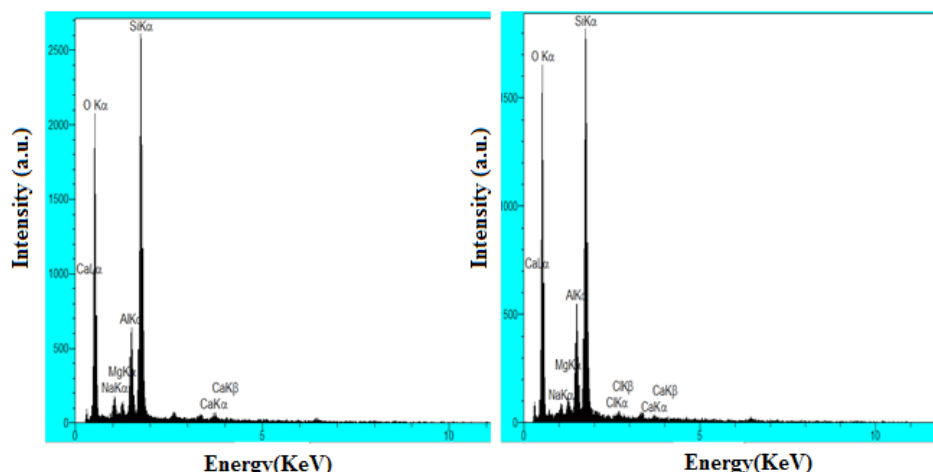
شکل شماره ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی کیتوزان خام (راست) و کامپوزیت کیتوزان حاوی بتونیت اصلاح شده (چپ)

نتایج طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (RITF)

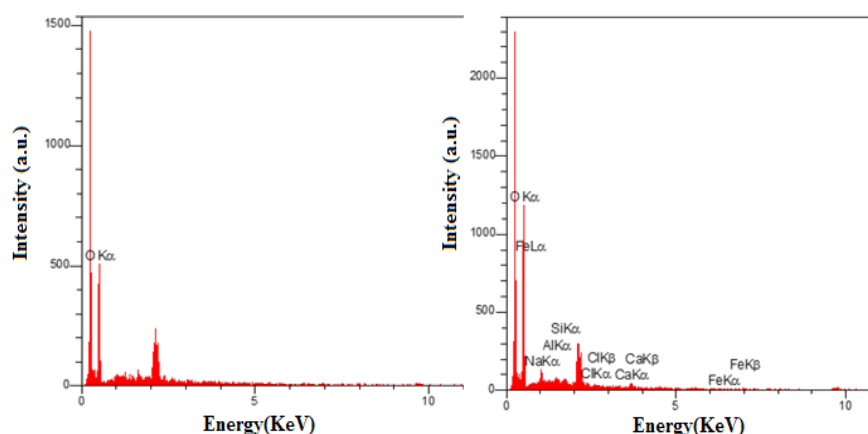
شکل ۵ طیف FT-IR نمونه بتونیت طبیعی را نشان می‌دهد. باند جذب در 3630 cm^{-1} به علت ارتعاشات کششی گروه‌های OH ساختاری بتونیت است. یک نوار واضح در 795 cm^{-1} نشان دهنده کوارتز در نمونه است که توسط پراش اشعه ایکس به طور گسترده تایید شده است. باند در 624 cm^{-1} به دلیل تغییر شکل و خمش حالت پیوند Si-O است. باند ها در 522 cm^{-1} و 469 cm^{-1} به ترتیب به علت ارتعاشات خمشی Al-Si-C

هیدروکلریدریک نیز علاوه بر ترکیبات بالا عنصر کلر نیز شناسایی گردید که نشان دهنده حضور این عنصر در ساختار بتونیت اصلاح شده با روش اسیدی گرمایی - است (شکل شماره ۳).

در شکل شماره ۴ آنالیز عنصری کیتوزان خام و کامپوزیت کیتوزان حاوی بتونیت اصلاح شده مشاهده می‌شود. در نمونه خام عنصر اکسیژن شناسایی شد و در نمونه کامپوزیت کیتوزانی عناصری از قبیل آلومینیوم، سیلیسیوم، اکسیژن، سدیم، منیزیم و کلر شناسایی شد که بیانگر تولید یک هیبرید بین کیتوزان و بتونیت می‌باشد.



شکل شماره ۳. آنالیز عنصری بتونیت خام (چپ) و بتونیت اصلاح شده با روش اسیدی- گرمایی (راست)



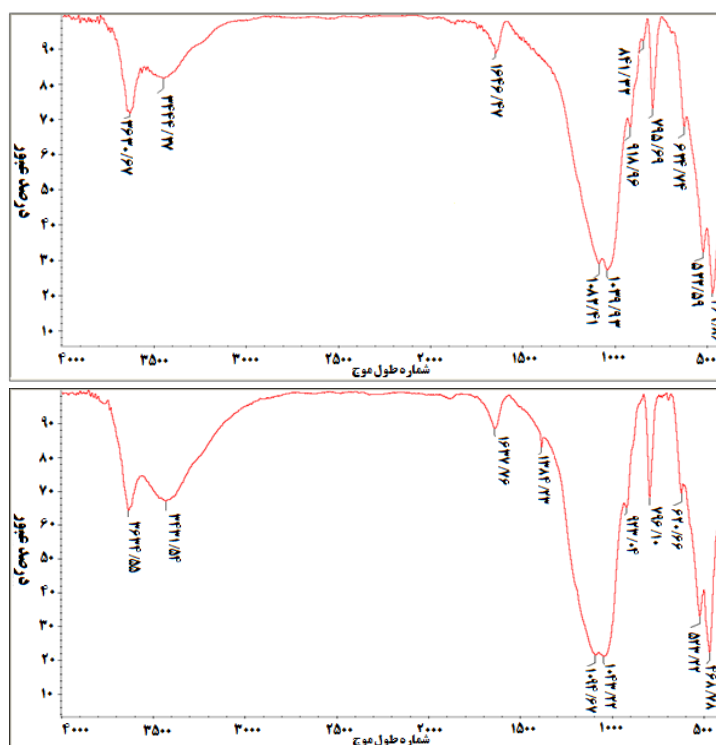
شکل شماره ۴. آنالیز عنصری کیتوزان خام (چپ) و کمپوزیت کیتوزانی حاوی بتونیت اصلاح شده (راست)

قوی‌تر در 1033 cm^{-1} اختصاص به باند کششی دارد [۱۶].

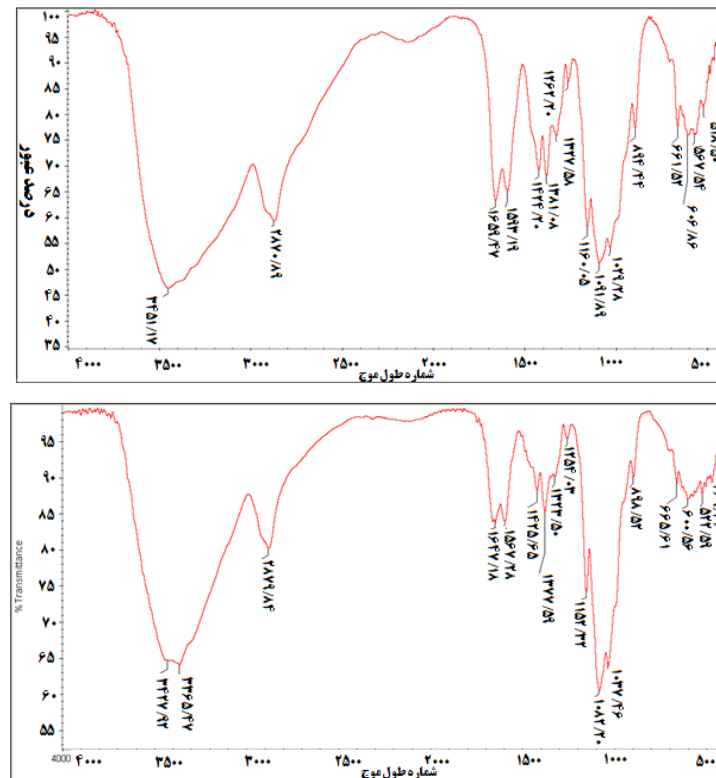
نتایج روش دیسکی

قطر ناحیه بازدارندگی (DIZ) میزان مهار رشد باکتری *A. hydrophila* را نسبت به ترکیبات ضد میکروبی نشان می‌دهد و هرچه این حساسیت بالاتر باشد، باکتری‌ها با فاصله‌ی بیشتری از بستر اجازه رشد می‌یابد (شکل شماره ۷). میانگین مهار رشد باکتری در دو ترکیب ضد باکتریایی در جدول شماره ۱ آورده شده است، ولی در گروه‌های شاهد و بسترهای بدون تیمار مهار

C-Si می‌باشند. باند مربوط به Al-Al-OH در 918 cm^{-1} مشاهده شده است. باند جذب بسیار قوی در 1039 cm^{-1} به علت ارتعاش خمشی Si-O است. باند در 3630 cm^{-1} مسئول هیدروکسیل‌های بدون کامپوزیت آزاد است. در طیف کیتوزان خام، گروه‌های گسترده قوی در 3338 cm^{-1} را می‌توان به ارتعاش کششی N-H در گروه‌های NH_2 منتسب کرد. وجود باند 2885 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی گروه CH_2 دانست. باندهای 1656 و 1555 cm^{-1} مربوط به باند خمشی گروه N-H و باند 1363 cm^{-1} مربوط به باند خمشی C-H می‌باشد. و باند



شکل شماره ۵- طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) نمونه بتونیت خام (بالا) و بتونیت اصلاح شده (پایین)



شکل شماره ۶- طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) نمونه کیتوزان خام (بالا) و کامپوزیت کیتوزان (پایین)

جدول شماره ۱- نتایج حاصل از هاله عدم رشد برای دو باکتری مورد بررسی (بر حسب میلی متر)

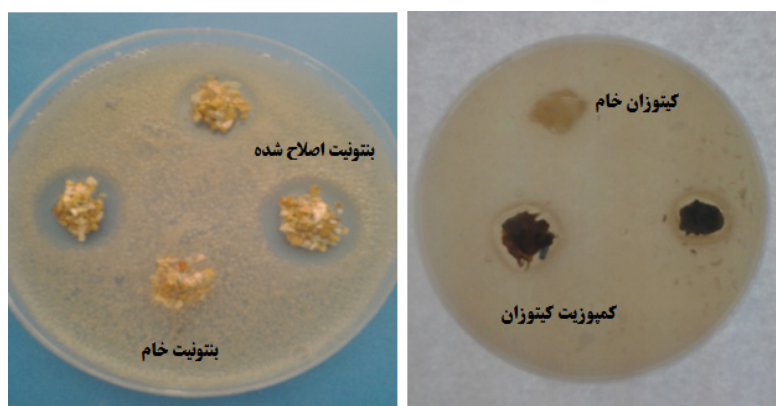
قطر هاله عدم رشد (میانگین $\pm$ انحراف استاندارد)					گونه باکتریایی
هیبرید کامپوزیتی	بتونیت اصلاح شده	اکسی تتراسایکلین	بتونیت خام	کیتوزان خام	
$8/54 \pm 0/12$	$11/16 \pm 0/11$	$18/36 \pm 0/17$	صفر	صفر	<i>آئروموناس هیدروفیلا</i>

رشد باکتری مشاهده نگردید. در کنترل مثبت که از آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین استفاده گردید قطر هاله مشخص مشاهده گردید که نشان از قابلیت ضد میکروبی این ترکیب داشت.

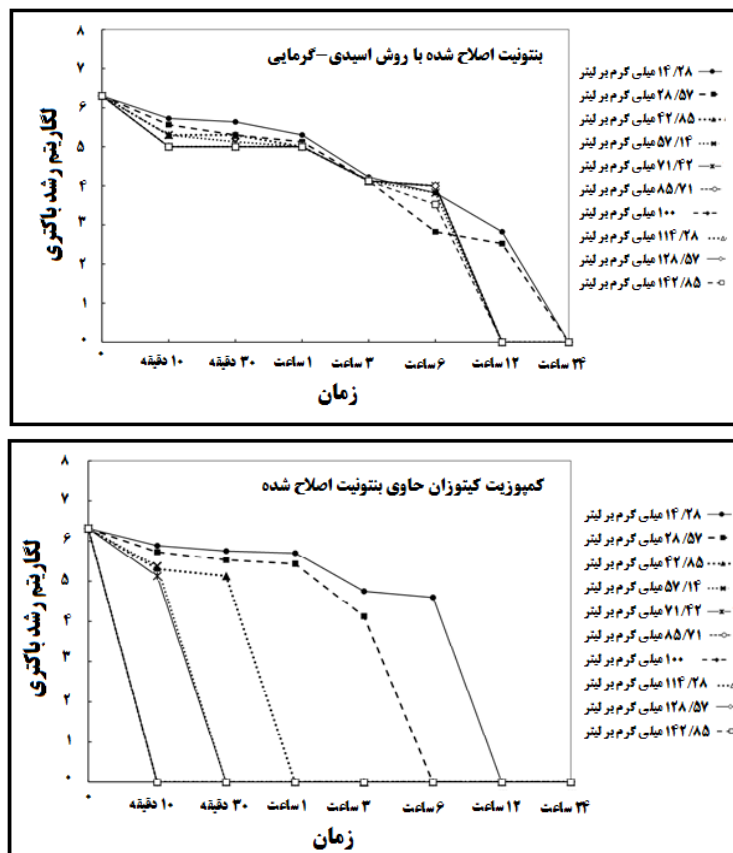
در لوله‌های دارای ترکیبات ضد میکروبی (بتونیت اصلاح شده با روش اسیدی- گرمایی و کمپوزیت کیتوزانی) تراکم باکتری پس از ۲۴ ساعت از لگاریتم ۶ به صفر در میلی لیتر برای آئروموناس هیدروفیلا در زمانهای مختلف رسید. در نتیجه ترکیبات ضد میکروبی ساخته شده دارای قابلیت بالایی در تمام حالات قادر به کنترل کامل رشد باکتری و همچنین از بین بردن باکتریها هستند (شکل ۸). در مورد بتونیت اصلاح شده توسط روش اسیدی - گرمایی تا کنون گزارشی مبنی بر نحوه عملکرد ضد میکروبی در منابع گزارش نگردیده

است اما به نظر می‌رسد که اصلاح توسط تیمارهای متعدد اسید و گرما سبب ایجاد سایت های ضد میکروبی اسیدی و همچنین ایجاد تخلخل بسیار بالا در سطح بتونیت گشته که می توانند سبب از بین رفت باکتری‌ها شود. در مورد ترکیب کمپوزیت کیتوزانی حاوی بتونیت اصلاح شده گزارشی مبنی بر نحوه خاصیت ضد میکروبی وجود ندارد ولی چندین فرضیه در این زمینه وجود دارد که عبارتند از:

مدل‌های مختلفی برای بیان مکانیسم اثر کیتوزان در خاصیت ضد باکتریایی آن بیان شده است که اولین و پذیرفته‌ترین آنها بیانگر تعامل بین بار مثبت ملکول‌های کیتین و کیتوزان و بار منفی غشای سلولی عوامل میکروبی می‌باشد. در این مدل نیروی الکترواستاتیک بین عامل NH و بار منفی موجود در دیواره سلولی



شکل شماره ۷- قطر هاله عدم رشد باکتری در مقابله با ترکیبات ضد میکروبی



شکل شماره ۸- بررسی روند کاهش میزان لگاریتم باکتریایی در غلظت ها و زمانهای مختلف برای آئروموناس هیدروفیلا در مقابل ترکیبات ضد میکروبی

تراوش الکترولیت های درون سلولی میکروارگانیسم مانند K^+ ، پروتئین های کوچک، اسیدهای نوکلئیک، گلوکز و لاکتات دهیدروژناز می شود [۲۱، ۲۲، ۲۳]. این مدل توسط رافلت و همکاران در سال ۲۰۰۸ در آزمایشی با بررسی تاثیر کیتوزان بر باکتری S. Simulans و با مشاهده تغییرات ساختاری مشخص در این باکتری پیشنهاد گردید [۱۱]. در این آزمایش اتصال کیتوزان به سطح باکتری ها قابل مشاهده بود و دیده شد که در محل اتصال کیتوزان به غشای سلولی باکتری، غشا از دیواره سلولی جدا شده و در زیر دیواره حالت شبیه به واکوئول به خود گرفت. این اتصال باعث تغییر یونها و جریان آب به بیرون سلول شده و باعث کاهش فشار درون سلولی گردید [۱۵، ۱۶، ۲۵، ۲۶]. اینگونه تغییری در

میکروبها باعث گیر انداختن عوامل میکروبی شده و از حرکت و رشد آنها جلوگیری می کند [۱۷]. که این عمل احتمالاً از طریق رقابت بایون Ca^{2+} برای اتصال به قسمت دارای بار منفی در غشای سلولی میکروبها صورت می گیرد [۱۸]. تعامل الکترواستاتیکی بین کیتوزان و عوامل میکروبی باعث روی دادن دو اتفاق در سلول های میکروبی شده که عبارتند از:

الف- تغییر در نفوذپذیری غشای دیواره سلولی باکتری که در نهایت موجب تغییر در تعادل اسمزی درونی باکتری شده و از رشد و فعالیت آن جلوگیری کند [۲۱، ۲۲].

ب- هیدرولیز شدن پپتیدوگلیکان های موجود در دیواره سلولی میکروارگانیسم که منجر به خروج و

غشای سلولی در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مشاهده شده است.

دومین مکانیسم ارائه شده برای عملکرد خاصیت ضد باکتریایی کیتوزان اتصال به DNA میکروارگانیسم بوده که منجر به توقف کردن حرکت mRNA و جلوگیری از فرآیند پروتئین سازی میکروارگانیسم می‌شود. کیتوزان این عمل را با ورود به درون هسته میکروارگانیسم‌ها انجام می‌دهد [۲۴، ۲۷، ۲۸، ۲۹]. در این مکانیسم اینگونه فرض شده است که کیتوزان قادر به عبور از دیواره سلولی باکتری‌ها بوده و خود را به غشای پلاسمایی آن می‌رساند.

در تحقیق حاضر تغییر در بار سطحی ترکیبات در حالت اصلاح شده و اصلاح نشده و همچنین حضور عناصر جدید مانند کلر به درون ساختار کامپوزیت کیتوزانی به همراه ایجاد حالت تخلخل سبب ایجاد سبب ایجاد خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری ائروموناس هیدروفیلا گردید.

نتیجه گیری

در این تحقیق با استفاده از دو ترکیب ضد میکروبی به بررسی خاصیت ضد میکروبی علیه دو باکتری بیماری‌زای شاخص در سیستم‌های پرورشی آبزیان پرداخته شد. نتایج نشان داد تیمارهای اعمال شده از طریق روش اسیدی گرمایی سبب ایجاد تغییرات شاخصی در سطح لایه‌ای بنتونیت گردید و از طریق این تغییرات خاصیت ضد میکروبی حاصل گردید. در کمپوزیت کیتوزانی ترکیبی در اثر ایجاد عوامل ضد میکروبی سبب حذف باکتری مورد مطالعه گردید. بررسی ساختار ترکیبات خام بنتونیتی و کیتوزانی با بنتونیت اصلاح شده توسط

روش اسیدی- گرمایی و هیبرید کامپوزیتی کیتوزان و بنتونیت اصلاح شده توسط روش‌های مختلف صورت پذیرفت. نتایج طیف مادون قرمز نشان داد که تغییراتی در جایگاه باندهای ترکیبات ساخته شده در مقایسه با بنتونیت و کیتوزان خام مشاهده گردید که نشان از ایجاد ترکیب هیبریدی دارد. بررسی نتایج میکروسکوپ الکترونی متصل به دستگاه طیف سنجی پراش اشعه ایکس که به منظور بررسی عناصر موجود در ترکیبات بود نشان داد که عناصر جدید به ساختار ترکیبات وارد شده اند. بررسی پتاسیل زتا ترکیبات در حالت خام با بنتونیت اصلاح شده با روش اسیدی- گرمایی و هیبرید کامپوزیتی نشان از تغییر بار در ترکیبات داشت. حضور عناصر جدید به همراه تغییرات بار سطحی ترکیبات می‌تواند به عنوان عوامل موثر در تغییرات در بار و ایجاد خاصیت ضد باکتریایی گردیده و از این طریق سبب حذف باکتری ائروموناس هیدروفیلا گردد. استفاده از این دو ترکیب برای اولین بار علیه باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفته است. نتایج نشان داد با توجه به ارزان و فراهم بودن مواد اولیه (رس بنتونیت و کیتوزان) در کشور این دو ترکیب را می‌توان به عنوان جایگزین ترکیبات شیمیایی با عوارض متعدد در سیستم‌های پرورشی قرار داد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات سرکار خانم دکتر معصومه بحرینی مدیر گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد که در انجام این تحقیق همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- 1- Austin B., Recovery of 'Atypical' Isolates of *Aeromonas Salmonicida*, Which Grow at 37° C, from Ulcerated Non salmonids in England, *Journal of Fish Diseases*, 16, 165-168, 1993.
- 2- Lewbart, G. A., Bacteria and Ornamental Fish. In *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10, 48-56, 2001.
- 3- Noga, E.J., *Fish Disease: Diagnosis and Treatment* Mosby, St. Louis, MO, USA, pp. 88-93, 1996.
- 4- Ardo, L., Jeney, Z., Adams, A., & Jeney, G., Immune Responses of Resistant and Sensitive Common Carp Families Following Experimental Challenge with (*Aeromonas Hydrophila*). *Fish & Shellfish Immunology*, 29(1), 111-116, 2010.
- 5- Peatman E., Mohammed, H., Kirby, A., Shoemaker, C.A., Yildirim-Aksoy, M., Beck, B.H., Mechanisms of Pathogen Virulence and Host Susceptibility in Virulent *Aeromonas Hydrophila* Infections of Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus*). *Aquaculture*, 42(1): 1-8, 2018.
- 6- Shao, J. Z., Liu, J., & Xiang, L. X. (*Aeromonas Hydrophila*) Induces Apoptosis in (*Carassius Auratus*) Lymphocytes in Vitro. *Aquaculture*, 229, 11-23, 2004.
- 7- Harikrishnan, R., Kim, M. C., Kim, J. S., Han, Y. J., Jang, I. S., Balasundaram, C., & Heo, M. S. Immune Response and Expression Analysis of Cathepsin K in Goldfish During (*Aeromonas Hydrophila*) Infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(4), 511-516, 2010.
- 8- Quang, D. V., Sarawade, P. B., Jeon, S. J., Kim, S. H., Kim, J. K., Chai, Y. G., & Kim, H. T. Effective Water Disinfection Using Silver Nanoparticle Containing Silica Beads. *Applied Surface Science*, 266, 280-287, 2013.
- 9- Motshekga, S.C., Ray, S.S., Highly Efficient Inactivation of Bacteria Found in Drinking Water Using Chitosan Bentonite Composites: Modelling and Breakthrough Curve Analysis. *Water Research*. 111(1), 213-223, 2017.
- 10- Malegowd Raghavendra, Jung, J., Kim, D., Seo, J., Microwave Assisted Antibacterial Chitosan-silver Nanocomposite Films. 84, 281-288, 2016.
- 11- Rasoulzadehzali, M., Namazi, H., Facile Preparation of Antibacterial Chitosan/Graphene Oxide-Ag Bio-nanocomposite Hydrogel Beads for Controlled Release of Doxorubicin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 116:54-63, 2018.
- 12- Young C. H., Kaneda S., Mikami Y., Arai T., Igarashi K., Saito M., Miyoshi T. and Fuse A., Protection Activity Induced by the Bacterial Vaccine, Heat-killed *Clostridium Butyricum* Against *Candida albicans* Infections in Mice. *Japen Journal of Medical Mycology*, 28, 262-269, 1987.
- 13- Chen C. S., Liao W. Y. and Tsai G. J., Antibacterial Effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl Chitosan and Application to Oyster Preservation. *Journal of Food Prot*, 61, 1124-1128, 1998.
- 14- Coma V., Martial-Gros A., Garreau S., Copinet A., Salin F. & Deschamps A., Edible Anti-microbial Films Based on Chitosan Matrix. *Journal of Food Science*, 67, 1162-1169, 2002.
- 15- Raafat D., Von Barge K., Haas A. and Sahl H. G., Appl., Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Journal of Environmental Microbiology*, 74, 3764-3773, 2008.
- 16- Wang X., Yumin, D., Jianhong, Y., Yufeng, T., Lu, J., Preparation, Characterization, and Antimicrobial Activity of Quaternized Chitosan/Organic Montmorillonite Nanocomposites. *Journal of Biomedical Materials Research*. 84, 384-390, 2008.

۱۷- شکوه سلجوقی، ظ؛ رفیعی، غ؛ ایمانی، ا؛ بختیاری، م، کاربرد بنتونیت احیا شده به روش اسیدی- گرمایی و سورفکتانت کاتیونی کاهش آلاینده های زیست محیطی فسفات و سولفات در پساب آبی پروری، مجله محیط شناسی، (۳۸) ۳۰: ۴۰-۳۱ (۱۳۹۱).

۱۸- شکوه سلجوقی، ظ؛ رفیعی، غ؛ ایمانی، ا؛ بختیاری، م، حذف آلاینده های نیتريت و نترات از پساب سیستم مدار بسته آبی پروری توسط بنتونیت های اصلاح شده. مجله آب و فاضلاب، (۲)، ۱۴: ۵۴-۴۶ (۱۳۹۱).

19- Lu Z., Gao, J., He, Q., Wu, J., Liang, D., Yang, H. Enhanced Antibacterial and Wound Healing Activities of Microporous Chitosan-Ag/ZnO Composite Dressing. Carbohydrate Polymers, 156, 460-469, 2017.

20- Schwalbe R., Steele-Moore L., Goodwin, A. C., Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. CRC Press. Taylor & Francis Group. London. Pp 430. 2007.

21- Beppu M.M., Vieira R.S., Aimoli, C.G & Santana, C.C., Crosslinking of Chitosan Membranes Using Glutaraldehyde: Effect on ion Permeability and Water Absorption. Journal of Membrane Science, 301, 126-130, 2007.

22- Tsai G. J. & Su W. H., Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan Against Escherichia Coli. J. Food. Protection, 62: 239-243, 1999.

23- Young D. H. & Kauss H., Release of Calcium from Suspension-cultured Glycine Max Cells by Chitosan, other Polycations, and Polyamines in Relation to Effects

on Membrane Permeability. Journal of Plant Physiology, 73, 698-702, 1983.

24- Hadwiger L. A., Kendra D. G., Fristensky B. W & Wagoner W., Chitosan both Activated Genes in Plants and Inhibits RNA Synthesis in Fungi, in: "Chitin in Nature and Technology". Muzzarelli R. A. A., Jeuniaux C. and Gooday G. W. (Eds.), Plenum, New York. 1981.

25- Shahidi F., Arachchi J. & Jeon Y. J., Food Applications of Chitin and Chitosans. Trends Food Sci. Technol., 10, 37-51, 1999.

26- Papineau A.M., Hoover D.G., Knorr D. & Farkas D.F., Antimicrobial Effect of Water Soluble Chitosan with High Hydrostatic Pressure. Journal of Food Biotechnology, 5, 45-57, 1991.

27- Sudarshan N.R., Hoover D.G. & Knorr D., Antibacterial Action of Chitosan. Food Biotechnology, 6, 257-272. 1992.

28- Devlieghere F., Vermeulen A & Debevere J., Chitosan: Antimicrobial Activity, Interactions with Food Components and Applicability as a Coating on Fruit and Vegetables. Journal of Food Microbiol, 21, 703-714. 2004.

29- Sebt I., Martial-Gros A., Carnet-Pantiez A., Grelier S. and Coma V., Chitosan as Bioactive Coating and Film Against Aspergillus Niger Contamination. Journal Food Science, 70, 100-104, 2005.

