بررسی عملکرد قابلیت ضد باکتریایی ترکیب‌های جدید بنتونیتی اصلاح شده علیه باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان: *Streptococcus iniae* و *Aeromonas hydrophila*

ظهیر شکوه سلجوقی، امیدوار فرهادیان*+

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

چکیده: بیماری‌های باکتریایی یکی از مهم‌ترین معضل‌های پیش روی توسعه آبزی‌پروری ایران محسوب می‌شود. باکتری‌های گرم مثبت و منفی گوناگونی مانند *Aeromonas hydrophila* و *Streptococcus iniae* سبب ایجاد عارضه‌های گسترده‌ای در ماهیان شده‌اند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب مشکل‌هایی در مصرف کنندگان می‌شود. از این رو، استفاده از ترکیب‌های ضد میکروبی نوین با کم‌ترین عارضه مرسوم شده است. در این پژوهش ساختار رس بنتونیت با استفاده از سورفکتانت کاتیونی و روش اسیدی ـ گرمایی اصلاح شد. مطالعه‌ها مشخص نمود که تغییرهایی طی اصلاح با دو روش در ساختار بنتونیت به دست آمده است. در این مطالعه اثر ضد باکتریایی دو نوع بنتونیت اصلاح شده علیه باکتری گرم مثبت *Streptococcus iniae* و باکتری گرم منفی *Aeromonas hydrophila* در شرایط آزمایشگاهی با دو روش منطقه مهار رشد باکتری (روش دیسکی) و آزمون لوله آزمایش(مایکرودایلوشن) مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین قدرت ضدمیکروبی به صورت کم‌ترین غلظت بازدارندگی و کم‌ترین غلظت کشندگی (MIC و MBC) از روش مایکرودایلوشن و شمارش کلونی در محیط کشت مولر هینتون اگار استفاده شد. نتیجه‌ها نشان داد که ترکیب اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی دارای MBC به میزان ۴۲٫۸۵ و ۲۸٫۵۷ میلی گرم در لیتر برای باکتری *Aeromonas hydrophila* در ده و سی دقیقه و ۷۱٫۴۲ میلی گرم در لیتر در ده و سی دقیقه برای *Streptococcus iniae* به ترتیب بودند. برای ماده اصلاح شده با روش اسیدی-گرمایی MBC به میزان ۲۸٫۵۷ و ۷۱٫۴۲ میلی گرم در لیتر برای باکتری *Aeromonas hydrophila* در ده و سی دقیقه به ترتیب ۲۸٫۵۷ و ۱۴٫۲۸ میلی گرم در لیتر در ده و سی دقیقه برای *Streptococcus iniae* بودند. نتیجه‌های این پژوهش نشان داد که ترکیب‌های اصلاح شده بنتونیتی دارای اثرهای ضد میکروبی قوی بوده و قابلیت حذف عامل‌های بیماری‌زا را در شرایط آزمایشگاهی داشته و می‌توانند به عنوان ترکیب‌های نوین به منظور کنترل عامل‌های بیماری‌زا در سامانه‌های پرورشی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: بنتونیت؛ ماده فعال سطحی کاتیونی؛ اصلاح اسیدی ـ گرمایی؛ *Aeromonas hydrophila* ؛ *Streptococcus iniae*؛ خاصیت ضد میکروبی.

KEYWORDS: *Bentonite; Cationic surfactants; Acidic-thermoacid activation method; Aeromonas hydrophila; Streptococcus iniae; Antimicrobial.*

*عهده دار مکاتبات

+E-mail: omfarhad@cc.iut.ac.ir

مقدمه

با توجه به افزایش جمعیت و نیاز روزافزون به فرآورده‌های آبزیان به عنوان بخش مهمی از نیاز غذایی، در سال‌های اخیر پرورش متراکم، در دستورکار بسیاری از پرورش دهندگان قرار گرفته است. گسترش صنعت آبزی پروری موجب شیوع روز افزون بیماری‌های مشترک بین انسان و دام به ویژه عفونت‌های باکتریایی شده است. استفاده از ترکیب‌های آنتی بیوتیکی به عنوان رایج ترین راه حل کنترل این بیماری‌ها مطرح است. ولی استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها در آبزی‌پروری سبب توسعه گونه‌های مقاوم باکتریایی شده است که افزون بر صنعت آبزی‌پروری، سلامت مصرف کننده انسانی را نیز دچار مشکل می‌سازند. در چند دهه اخیر عامل‌های بیماری‌زای نو ظهور باکتریایی صدمه‌های بسیاری به صنعت آبزی پروری وارد نموده است. دو سویه از باکتری‌های گرم منفی *Aeromonas hydrophila* و گرم مثبت *Streptococcus iniae* مانعی در پیشرفت صنعت آبزی‌پروری در جهان محسوب می شوند. باکتری استرپتوکوکوس اینیایی بین انسان و ماهی مشترک بوده و در نقاطه‌های از جهان که ماهیان را به صورت خام مصرف می کنند و یا توسط کارگرانی که با حمل و نقل و دستکاری ماهی سر و کار دارند می‌تواند از ماهی به انسان منتقل شود [۱]. تا کنون بیش‌تر از ۲۵ مورد عفونت استرپتوکوکوس اینیایی به انسان از آمریکا، کانادا، تایوان و چین گزارش شده است که ایمنی بدن را به خطر انداخته است. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی شایع در بیش‌تر مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان در ساله‌ای اخیر در بسیاری ازکشورهای دنیا، استرپتوکوکوزیس بوده است [۲]. مطالعه‌های زیادی در زمینه شناسایی، جداسازی و بیماری‌زایی، آن‌ها در مزرعه‌های تکثیر و پرورش قزل آلای کشور انجام گرفته که بیانگر گسترش بیماری در مزارع قزل آلای کشور بوده و تاکنون موجب خسارت‌های زیادی برای صنعت شده است [۴، ۳].

Aeromonas hydrophila یک باکتری فرصت طلب، گرم منفی، میله ای، به طور عمده متحرک، بی هوازی اختیاری، اکسیداز مثبت و تخمیر کننده گلوکز است [۵]. این باکتری سبب آلودگی زخم‌ها، عفونت خون و التهاب معدی روده ای با منشاء آب و غذا در انسان می‌شود [۶]. همچنین انواع گوناگون شیوع این بیماری بر حسب حدت بیماریزایی و تولید سم در این باکتری‌ها شناسایی شده است. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که برخی از سویه ها با هجوم به لایه مخاطی روده آبزیان سبب التهاب معدی روده‌ای می‌شوند، درحالی‌که سایر سویه‌ها با تولید آئرولیزین باعث به وجود آمدن این عارضه در انسان می‌شوند [۷]. به طور کلی باکتری‌های جنس *Aeromonas hydrophila* با تولید سموم بیرونی مانند انتروتوکسین، همولیزین (آئرولیزین)، لیپاز و پروتئاز سبب بروز بیماری می‌شوند [۸].

به طور معمول از ضد عفونی کننده‌ها برای کنترل عفونت‌های ناشی از عامل‌های بیماریزا در کارگاه‌های پرورش ماهی استفاده می‌کنند. کاربرد این ترکیب‌ها می‌بایست در غلظت‌هایی صورت گیرد که برای ماهیان کشنده نباشد تأثیر یک ماده ضد عفونی کننده، بستگی به نسبت زمان و غلظت آن ماده دارد. در این حالت باید ماهی را در آبی با نسبت یا زمان و غلظت معین قرار داد تا بدون این که به آن صدمه وارد شود، موجودهای زنده عفونی‌زا را از بین ببرد [۹]. از سویی، 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 عامل‌های بیمای‌زا نیز همواره از مهمترین نگرانی های دست‌اندرکاران این صنعت بوده است. درنتیجه ترکیب‌های ضد عفونی کننده غیر دارویی می‌توانند یکی از راه‌حل‌ها باشد. ترکیب‌های رسی از سالیان گذشته در صنایع گوناگون مورد استفاده قرار می گرفته است. از ترکیب‌های بنتونیت احیا شده توسط سورفکتانت کاتیونی و روش اسیدی ـ گرمایی در تصفیه پساب سامانه‌های پرورشی آبزیان [۱۱، ۱۰]، کنترل بلوم جلبکی در استخرها، کنترل کشند قرمز [۱۲] و در جیره غذایی آبزیان به عنوان عامل چسباننده به دلیل ویژگی‌های یگانه تصفیه‌ای و چسبانندگی بالا آن‌ها استفاده شده است. به تازگی استفاده از ترکیب‌های رسی به همراه عامل‌های ضد میکروبی در کنترل عامل‌های میکروبی پژوهش‌هایی صورت گرفته است [۱۳]. در این پژوهش با استفاده از دو روش اصلاح توسط سورفکتانت کاتیونی تترا دسیل تری متیل آمونیوم برماید[۱] و روش اسیدی ـ گرمایی به ایجاد حالت ضد میکروبی مبادرت ورزیده شد و فعالیت ضد باکتریایی ترکیب‌ها علیه باکتری‌های *Aeromonas hydrophila* و *Streptococcus iniae* مورد ارزیابی قرار گرفت.

بخش تجربی

تهیه بنتونیت اصلاح شده توسط سورفکتانت[۲]

رس مورد استفاده در این پژوهش از منطقه دیهوک واقع در شهرستان طبس استان خراسان جنوبی تهیه شد. رس مورد استفاده به طور طبیعی به ویژه شامل بنتونیت می‌باشد.

(۱) Tetradecyltrimethylammonium bromide

(۲) Surfactant Modified Bentonite, SMB

نخست با استفاده از محلول یک مولار سدیم کلرید در مدت زمان ۳ ساعت ترکیب بنتونیت سدیمی تهیه شد، رس‌های اصلاح شده توسط سدیم کلرید با نسبت ۴ گرم رس به محلول فعال کننده سطحی ۰/۰۱ مولار در ۳۰۰ دور در دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت هم زده شد و سپس رس به دست آمده صاف شد و با آب مقطر چندین بار شسته و سپس ارگانوبنتونیت به دست آمده در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس خشک شد و با الک ASTM به اندازه ذره‌های ۰/۸ تا ۱/۲ میلی متر در آمدند [۱۱، ۱۰].

تهیه بنتونیت اصلاح شده به وسیله روش اسیدی ــ گرمایی(۱)

در این روش ابتدا کلیه ناخالصی های فیزیکی موجود در نمونه رس بنتونیت مانند ذره‌های شن و ماسه، گچ و ... را به صورت چشمی جمع آوری شد. سپس ترکیب به دست آمده را در دمای ۴۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت در کوره گرما داده شد تا کلیه ناخالصی‌های موجود در ترکیب رس خام از قبیل ترکیب‌های کربوهیدراته از بین رود. در مرحله بعد توسط محلول ۱ مولار سدیم کلرید ، رس به مدت ۳ ساعت هم زده شد و در اون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شد. در مرحله بعد توسط سولفوریک اسید ۲ مولار به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۵ درجه سلسیوس هم زده شد و سپس با آب دو بار تقطیر چندین بار شسته و در دمای ۲۰۰ درجه سلسیوس در اون خشک شد. سپس ذره‌ها به اندازه ۰/۸ تا ۱/۲ میلی متر در آمدند و در کوره در دمای ۲۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند [۱۱، ۱۰].

تجزیه نمونه‌ها به‌روش پراش اشعه‌ایکس(۲)

در این پژوهش ساختار بنتونیت مورد بررسی در دو حالت اصلاح شده و طبیعی به منظور تعیین میزان عناصر موجود در آن با استفاده از پراش پرتو ایکس بررسی شد. با قرارگرفتن یک عنصر (هدف(۳)) در معرض پرتوهای ایکس و بمباران شدن آن توسط الکترون‌های پرانرژی، طیف خطی ویژه‌ای گسیل می‌شود که اساس فناوری پراش‌سنجی پرتو ایکس (XRD) می‌باشد. در واقع با بمباران هدف توسط یکی از منابع پرانرژی یاد شده یک الکترون از لایه‌های درونی آن خارج و جای خالی الکترون جداشده، توسط الکترونی از لایه‌های بالاتر پر می‌شود [۱۴].

شناسایی ساختار ترکیب‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

به منظور بررسی ریخت شناسی ترکیب‌ها در حالت اصلاح نشده و اصلاح شده و همچنین اندازه و چگونگی قرارگیری ذره‌ها در سطح جسم و بررسی سطح شکست تعیین ترکیب شیمیایی زمینه و تهیه آنالیز منطقه ای، نقطه ای، خطی و صفحه ای از میکروسکوپ الکترونی روبشی(۴) مدل TESCAN Mira3، ساخت کشور چک که مجهز به یک شناساگر تعیین عنصری مواد بود استفاده شد. نمونه ها پس از پودر شدن کامل با چسب ویژه بر روی صفحه‌های عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی چسبانده و با بزرگنمایی‌های بسیار تصویرهای زیادی از بخش‌های گوناگون ترکیب‌ها به منظور تغییرهای ساختاری گرفته شد. به منظور آنالیز عنصرهای موجود ترکیب‌ها از شناساگر متصل به میکروسکوپ الکترونی استفاده شد که با استفاده از پراش پرتو ایکس به تعیین درصد عنصرها پرداخت.

روش FT-IR

طیف سنجی فروسرخ بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. این روش به عنوان روشی پر قدرت و توسعه یافته برای تعیین ساختار و اندازه‌گیری گونه‌های شیمیایی به کار می‌رود. همچنین این روش به طور عمده برای شناسایی ترکیب‌های آلی به کار می‌رود، زیرا طیف‌های این ترکیب‌ها به‌طور معمول پیچیده هستند و تعداد زیادی پیک های بیشینه و کمینه دارند که می‌توانند برای اهداف مقایسه‌ایی به کار گرفته شوند[۱۵].

آزمون منطقه مهار رشد (روش دیسکی)

برای انجام آزمایش اندازه گیری منطقه مهار رشد باکتری از روش پورپلیت عمقی استفاده شد. بدین صورت که نخست از محیط کشت مولرهینتون آگار مطابق با دستورالعمل قید شده بر روی ظرف دارای محیط کشت تهیه و برای استریل اتوکلاو شد در ادامه از استوک لیوفیلیزه باکتری‌ها (استوک لیوفیلیزه باکتری *Streptococcus iniae* ،*Aeromonas hydrophila*, ATCC 7966 ATCC 29178 (تهیه شده از دانشگاه تهران) با تلقیح در لوله دارای ۵ میلی لیتر محیط استریل مولر هینتون براث و گرمخانه گذاری در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت، کشت شبانه

(۱) Acid Thermo activation Bentonite, ATB

(۲) XRD

(۳) Target

(۴) Field Emission Scanning Electron Microscope

تهیه شد [۱۶]. سپس از این کشت شبانه، سوسپانسیون میکربی معادل نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu/mL) با استفاده از اسپکتروفتومتری و خواندن جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر آماده سازی شد و به هر پلیت دارای آگار سرد شده (با دمای ۴۵–۵۰ درجه سلسیوس) ۱ میلیمتر از سوسپانسیون میکربی بالا افزوده شد در ادامه پیش از سرد شدن و بستن کامل ژل از هر کدام از ترکیب‌های اصلاح شده ضد میکربی (بنتونیت‌های اصلاح شده) به همراه کنترل شاهد (بنتونیت طبیعی بدون اصلاح و بدون خاصیت ضد میکربی) به اندازه ۲/. 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 گرمخانه گذاری شد. خاصیت ضد میکربی با تشکیل هاله‌ای شفاف و فاقد رشد باکتری در اطراف هر کدام از ترکیب‌ها که اندازه قطر این هاله با میزان خاصیت ضد میکربی رابطه مستقیم دارد ، نمایان می‌شود. تشکیل نشدن هاله شفاف در اطراف نمونه شاهد بیانگر انجام صحیح فرایند روی ترکیب‌های مورد آزمایش است. این آزمایش در سه تکرار صورت پذیرفت.

آزمون لوله آزمایش

در آزمایش آزمون لوله آزمایش طبق دستورالعمل NCCLS سال ۲۰۰۳ میلادی استفاده شد[۱۶]. به منظور بررسی و اندازه گیری توان ضد میکربی دو ترکیب بنتونیت اصلاح شده علیه باکتری‌های مورد بررسی از روش آزمون در لوله استفاده شد. بدین صورت که نخست دو مجموعه لوله ده تایی را به‌طور جداگانه از ترکیب‌های ضد میکربی بالا 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 پس از بستن کامل درب لوله‌ها برای استریل به اتوکلاو منتقل شدند. پساز استریل و سرد شدن لوله ها به هر لوله µ۱۰۰ (میکرولیتر) از سوسپانسیون میکربی با غلظتی معادل نیم مک فارلند افزوده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد و در ادامه برای بررسی و اندازه گیری توان ضد میکربی ترکیب‌های بالا در مدت زمان‌های ۱۰، ۳۰ ، ۶۰ دقیقه و ۱، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون به روش زیر عمل شد. چون میزان تلقیح اولیه باکتری به هر لوله به طور کامل معلوم است (با درنظر گرفتن ۱۰۰ میکرو لیتر از نیم مک فارلند و ریختن در ۷ میلی لیتر محیط کشت، غلظت نهایی سوسپانسیون میکربی در هر لوله ۲×۱۰^{۶} cfu/mL می‌شود) با شمارش باکتری‌ها پس از مجاور سازی با ترکیب‌های ضد میکربی و گذشت زمان‌های گوناگون می توان به میزان توان ضد میکربی ترکیب‌های بالا دست یافت درنتیجه به منظور توانایی شمارش کلنی‌ها از هر کدام از لوله‌ها در زمان‌های ذکر شده رقت‌های سریال[۱] از ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ... تهیه و از هر رقت به حجم ۱ میلی لیتر و با سه بار تکرار در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولرهینتون آگار پخش شد پس از جذب نمونه توسط محیط، پلیت‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت منتقل شدند. برای شمارش کلنی‌ها، پلیت دارای رقتی انتخاب می شود که کلنی‌های رشد کرده در آن‌ها پراکنده و قابل شمارش باشند سرانجام پس از شمارش کلنی ها تعداد آن‌ها را ضرب در عکس ضریب رقت کرده و تعداد واقعی کلنی‌ها به‌دست می‌آید. در هر مجموعه کنترل مثبت (پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون اگار به همراه سوسپانسیون میکربی بدون مجاور سازی با ترکیب‌های ضد میکربی) به منظور داشتن رشد بیشینه باکتری و مقایسه با اثرهای ضد باکتری ترکیب‌های مورد آزمایش و کنترل منفی (پلیت حاوی محیط کشت بدون تلقیح باکتری) به منظور کنترل شرایط استریل و اطمینان از نبود به‌روز آلودگی‌های ثانویه و کنترل شاهد (پلیت دارای محیط کشت به همراه ترکیب‌های ضد میکربی و بدون تلقیح باکتریایی) به منظور کنترل ترکیب‌های ضد میکربی مورد آزمایش از برای نبود آلودگی، گذاشته شد [۱۷، ۱۶]. این آزمایش‌ها در ۳ تکرار به منظور شمارش کلونی‌های در روی محیط کشت مولر هینتون اگار انجام شد.

برای تعیین MIC و MBC به روش زیر عمل شد. دو مجموعه لوله ده تایی که برای تعیین فعالیت ضد میکروبی دو ترکیب مورد آزمایش علیه باکتری‌های مورد مطالعه، مطابق قسمت بالا (آزمون لوله آزمایش) آماده سازی شده بود. در ادامه آزمایش، برای تعیین کم‌ترین غلظت بازدارندگی (MIC) و کم‌ترین غلظت کشندگی (MBC) استفاده شد بدین صورت که برای تعیین کم‌ترین غلظت بازدارندگی (MIC) لوله‌های حاوی مقدارهای گوناگون ترکیب ضد میکروبی (از ۰/۱ تا ۱ گرم) تلقیح شده با میزان ثابتی از باکتری به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه گرمخانه گذاری شد سپس کدورت محیط کشت مایع هر یک از لوله ها به‌طور چشمی دیده شد. کدورت دیده شده از اولین لوله دارای مقدارهای کم‌تر ترکیب ضد میکروبی تا لوله اخر، به تدریج کم و سرانجام در لوله‌ای دارای یکی از غلظت‌ها به بعد، به طور کامل بدون کدورت (بدون رشد میکربی) می‌شود درنتیجه

(۱) serial dilution

اولین لوله بدون کدورت به عنوان کم‌ترین غلظت بازدارندگی (MIC) ترکیب مورد آزمایش ثبت می‌شد در ادامه برای تعیین کم‌ترین غلظت کشندگی (MBC) و اطمینان از نبود باکتری زنده، از اولین لوله بدون کدورت تا آخرین لوله، مقدار ۱ میلیمتر نمونه برداشته و روی پلیت‌های دارای مولر هینتون آگار که پیش‌تر در شرایط استریل تهیه شده بود به صورت پورپلیت سطحی نمونه گذاری و پس از جذب نمونه‌ها توسط محیط ، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفته و سپس مورد بررسی قرار گرفتند غلظتی از نمونه که از کشت آن هیچگونه کلونی باکتریایی رشد نکرده بود به عنوان کم‌ترین غلظت کشندگی (MBC) آن ترکیب گزارش شد. به طور معمول میزان کم‌ترین غلظت کشندگی (MBC) یک ترکیب از نظر مقدار آن ترکیب از میزان گزارش شده برای کم‌ترین غلظت بازدارندگی (MIC) بیش‌تر است [۱۸].

روش‌های آماری مورد استفاده

این مطالعه در قالب یک طرح به طور کامل تصادفی با ۲ تیمار (مقدار ماده و زمان) و ۳ تکرار اجرا شد. تیمار شاهد در روش بررسی میکروبی بنتونیت بدون اصلاح و بدون خاصیت ضد میکروبی بود. میزان حذف باکتری‌ها توسط بنتونیت اصلاح شده توسط سورفکتانت و روش اسیدی ـ گرمایی در زمان‌های ۱۰، ۳۰، ۶۰، ۱۸۰، ۳۶۰، ۷۲۰ و ۱۴۴۰ دقیقه و مقدارهای ماده ضد میکروبی به صورت جداگانه و مستقل در ۳ تکرار مورد مطالعه واقع شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها، نتیجه‌ها با استفاده از نرم افزار به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) بررسی و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. این موارد در نرم افزار SPSS 13 ویندوز 7 اجرا شدند. رسم نمودارها نیز در نرم افزار Excel انجام شد.

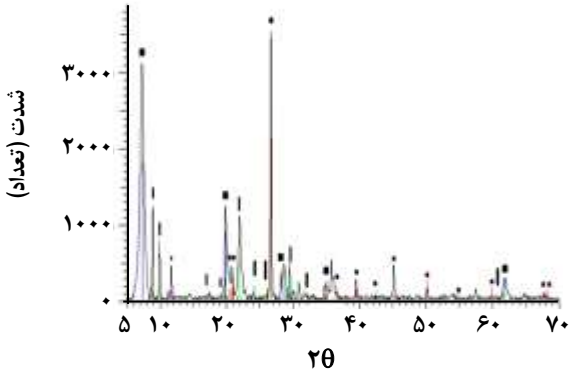
نتیجه‌ها و بحث

نتیجه‌های به دست آمده از XRD نمونه بنتونیت منطقه دیهوک طبس

منحنی به دست آمده از پراش پرتو ایکس موجود در شکل ۱ آورده شده است. نتیجه‌ها نشان داد که رس موجود دارای کانی‌های کوارتز (۴۱ درصد)، سیلیکات‌های آبدار سدیم، کلسیم، منیزیوم و آلومنیوم(۳۵/۵ درصد)، سدیم استرلیت (۱۰/۳ درصد)، ایلیت (۵/۹ درصد)، مسکوویت (۲/۲ درصد) و گچ (۱/۶درصد) می باشند (جدول ۱).

نتیجه‌های به دست آمده از XRD نمونه بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت

منحنی به دست آمده از پراش پرتو ایکس موجود در شکل ۲



شکل ۱ـ بررسی نتیجه‌های به دست آمده از XRD نمونه بنتونیت منطقه دیهوک طبس.

موید آن است که با روش اصلاحی موجود و با استفاده از فعال کننده سطحی تترا دسیل تری متیل آمونیوم برمید و سایر تیمارهای انجام شده تغییرهای اساسی در ساختار لایه ای و بلورین نمونه بنتونیت به دست آمده است. ترکیب به دست آمده دارای کانی‌های کریستوبالیت (۲۷/۸ درصد)، هیولاندیت (۹/۲ درصد)، کوارتز (۵/۱ درصد)، مونتموریلونیت (۲۳/۱ درصد)، کلسیت (۱۶/۲ درصد) و آلومینیوم سولفات هیدراته (۱۸/۵ درصد) می‌باشد (جدول ۲). نتیجه‌ها نشان داد که اعمال تیمارهای دمایی و نمکی سبب تغییر در ساختار لایه ای و سطحی رس بنتونیت و بهبود آن شد.

نتیجه‌های به دست آمده از XRD نمونه بنتونیت اصلاح شده توسط روش اسیدی– گرمایی

همانند تغییرهای ساختاری که در زمینه اصلاح بنتونیت توسط سورفکتانت دیده شد، در اصلاح توسط روش‌های اسیدی ـ گرمایی نیز تغییرهای عمده‌ای به‌ویژه در ساختار لایه ای و بلورین بنتونیت به دست آمد. در ترکیب به دست آمده کانی‌های کریستوبالیت (۲۴/۸ درصد)، هیولاندیت (۸/۵ درصد)، کوارتز (۱۸/۶ درصد)، منتموریولونیت (۸/۵ درصد)، آلومینیوم سولفات هیدراته (۲۹/۵ درصد) و سیلیکات‌های هیدراته سدیم، کلسیم، منزیوم، آلومینیوم (۱۰/۱ درصد) مشاهده شد (شکل۳، جدول ۳).

بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی (FE SEM) و طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)

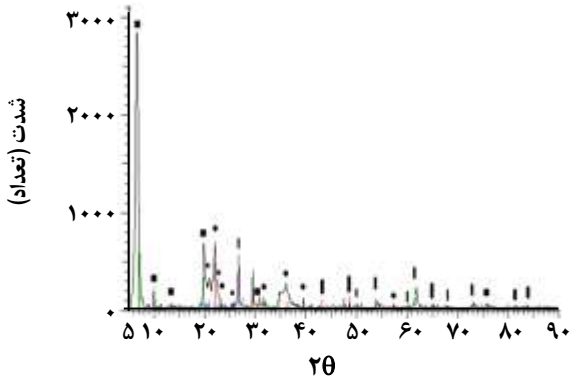
شکل ۴ بیانگر تصویر میکروسکوپ الکترونی بنتونیت‌های خام و اصلاح شده با دو روش اسیدی ـ گرمایی و سورفکتانت کاتیونی می‌باشد. در شکل ۴ تصویر بالا، صفحه بندی لایه ای که مشخصه

جدول ۱ـ آنالیز شیمیایی رس بنتونیت منطقه دیهوک طبس.

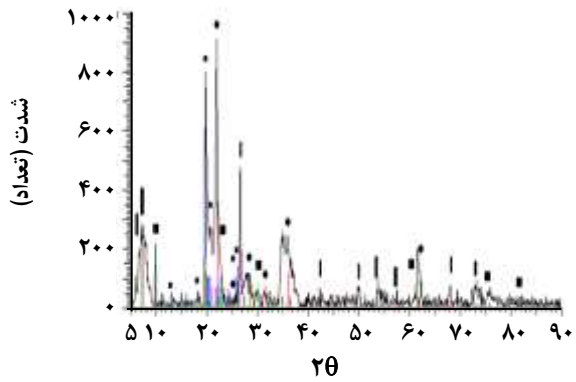
غلظت (%W/W)	فرمول شیمیایی	نام ترکیب
۴۱٫۴	SiO_2	Quartz, syn
۳۵٫۵	Na-Ca-Al-Mg-Si-O-H_2O	Sodium Calcium Magnesium Aluminum Silicate Hydrate
۱۰٫۳	$Na_2(A_{l2}Si_7)O_{18}\cdot 7H_2O$	Stellerite-(Na)
۱٫۶	$CaSO_4\cdot 2H_2O$	Gypsum, syn
۵٫۹	$[(NH_4),K](Si,Al)_4Al_2O_{10}(OH)_2$	Illite-1 ITM RG, ammonian
۲٫۲	$KAl_2Si_3AlO_{10}(OH)_2$	Muscovite 2M1, syn

جدول ۲ـ آنالیز شیمیایی رس بنتونیت احیا شده به وسیله‌ی سورفکتانت.

غلظت (%W/W)	فرمول شیمیایی	نام ترکیب
۲۷٫۸	SiO_2	Cristobalite, syn
۱۸٫۵	$Al_2(SO_4)_3.16H_2O$	Aluminum Sulfate Hydrate
۹٫۲	$Ca(Al_2Si_7O_{18}).6H_2O$	Heulandite
۵٫۱	SiO_2	Quartz, syn
۲۳٫۱	$Na_x(Al,Mg)_2Si_4O_{10}(OH)_2.zH_2O$	Montmorillonite
۱۶٫۲	$CaCO_3$	Calcite



شکل ۲ـ بررسی نتیجه‌های به دست آمده از XRD نمونه بنتونیت اصلاح شده توسط فعال کننده سطحی.



شکل ۳ـ بررسی نتیجه‌های به دست آمده از XRD نمونه بنتونیت اصلاح شده توسط روش اسیدی ـ گرمایی.

رس‌های بنتونیتی می‌باشد به طور کامل مشخص است. در شکل پایین سمت راست رس بنتونیت اصلاح شده توسط روش اسیدی ـ گرمایی آورده شده است که اعمال تیمارهای بسیار دما و اسیدی سبب برهم خوردن لایه بندی رس و شکل گیری حالت جدید (متخلخل) در نمونه شده است. در شکل مربوط به بنتونیت اصلاح شده با فعال کننده سطحی کاتیونی (پایین سمت چپ)، لایه بندی فعال کننده سطحی کاتیونی روی سطح و فضای بین لایه ای رس به خوبی قابل دیدن است. نتیجه‌های میکروسکوپ الکترونی نشان داد که تغییرهای متناسب با نوع روش اصلاحی در نمونه ها در مقایسه با نمونه خام اولیه ایجاد شد.

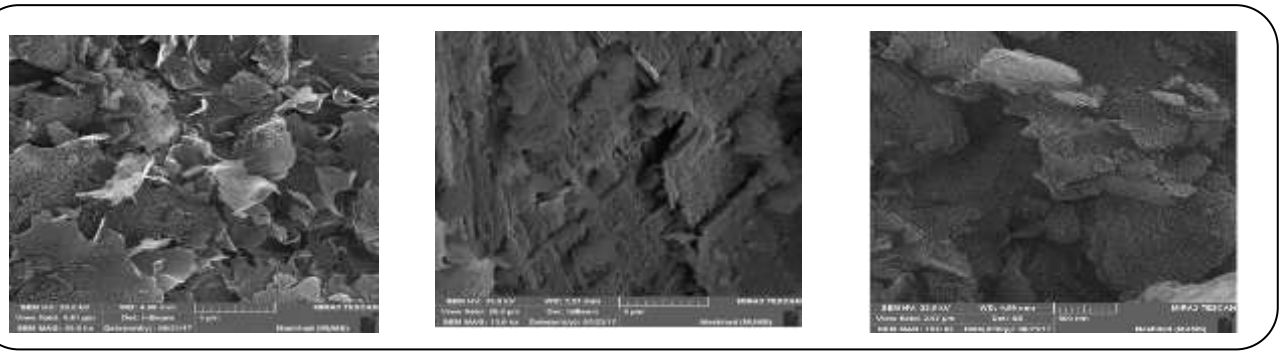
نتیجه‌های به دست آمده از طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) در جدول ۴ آورده شده است. در نمونه خام بنتونیت (بالا) عناصر سیلیسیم، الومینیوم، منیزیوم، سدیم، کلسیم و اکسیژن شناسایی شد که عناصر تشکیل دهنده و اولیه بیش‌تر

جدول ۳ـ آنالیز شیمیایی رس بنتونیت احیا شده توسط روش اسیدی- گرمایی.

غلظت (%W/W)	فرمول شیمیایی	نام ترکیب
۲۴٫۸	SiO_2	Cristobalite, syn
۲۹٫۵	$Al_2(SO_4)_3.16H_2O$	Aluminum Sulfate Hydrate
۸٫۵	$Ca(Al_2Si_7O_{18}).6H_2O$	Heulandite
۱۸٫۶	SiO_2	Quartz, syn
۸٫۵	$Na_x(Al,Mg)_2Si_4O_{10}(OH)_2.zH_2O$	Montmorillonite
۱۰٫۱	$Na\text{-}Ca\text{-}Al\text{-}Mg\text{-}Si\text{-}O\text{-}H_2O$	Sodium, Calcium,Magnesium, Aluminum, Silicate Hydrate

جدول ۴ـ نتیجه‌های طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس بنتونیت خام ، بنتونیت اصلاح شده با روش اسیدی-گرمایی و بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی.

نوع ترکیب	عناصر تشکیل دهنده(درصد)							
	اکسیژن	سدیم	منیزیوم	آلومینیوم	سیلیس	کلسیم	کربن	کلر
بنتونیت خام	۶۹٫۴۶	۰٫۲	۰	۱٫۴۹	۶٫۶۹	۲۲٫۱۶	۰	۰
بنتونیت اصلاح شده با روش اسیدی دمایی	۷۰٫۷۸	۰٫۲	۰	۳٫۶۶	۱۱٫۴۲	۱۱٫۱۳	۰	۲٫۸۱
بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت	۶۶٫۴۵	۰٫۲	۰	۴٫۹۲	۱۵٫۰۲	۱۰٫۹۹	۲٫۱	۰٫۳۲



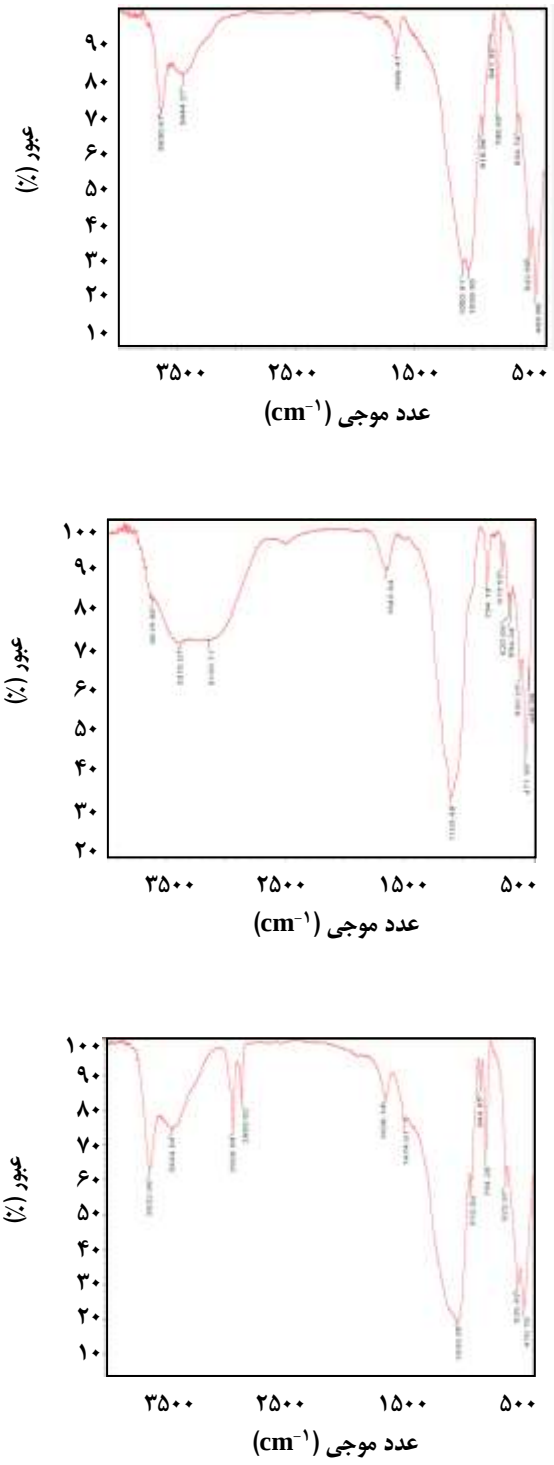
شکل ۴ـ تصویر میکروسکوپ الکترونی بنتونیت خام (بالا)، بنتونیت اصلاح شده با روش اسیدی- گرمایی (پایین سمت راست) و بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی (پایین سمت چپ).

ترکیب‌های رسی و به ویژه بنتونیت می باشند. در بنتونیت اصلاح شده با اسید (وسط) پس از اعمل تیمارهای اسیدی و گرمایی بسیار عنصرهایی چون کلر و نیتروژن به ساختار افزوده شد که وارد شدن این عناصر خود سبب ایجاد خاصیت ضد میکروبی ترکیب می‌شوند. در نمونه بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی (پایین) عنصرهای کربن و کلر در ترکیب شناسایی شدند که نشان دهنده ورود سورفکتانت به ساختار بنتونیت می باشد.

نتیجه‌های طیف فروسرخ[1]

شکل ۵ سمت بالا، طیف FT-IR نمونه بنتونیت طبیعی را نشان می‌دهد. باند جذب در ۳۶۳۰ سانتی متر به علت ارتعاش‌های کششی گروه‌های OH ساختاری بنتونیت است. یک نوار واضح در ۷۹۵ سانتی‌متر نشان دهنده کوارتز در نمونه است که توسط پراش پرتو ایکس به طور گسترده تایید شده است. باند در ۶۲۴ سانتی متر به دلیل تغییر شکل و باند خمشی پیوند Si-O است.

(۱) FT-IR



شکل ۵ ـ طیف فروسرخ بنتونیت خام (بالا)، بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی(راست) و بنتونیت اصلاح شده با روش اسیدی گرمایی(چپ).

باندها در ۵۲۲ و ۴۶۹ سانتی متر به ترتیب به علت ارتعاش‌های خمشی Al-Si-C و Si-C می‌باشند. باند مربوط به Al-Al-OH در ۹۱۸ سانتی متر دیده شده است. باند جذب بسیار قوی در ۱۰۳۹ سانتی متر به علت ارتعاش خمشی Si-O باند در ۳۶۳۰ مسئول هیدروکسیل‌های آزاد است. باند ۱۶۴۶ cm^{-1} مسئول ارتعاش خمشی H-O-H در آب است. نوارهای ۱۰۸۲ ، ۱۰۳۹، ۲۹۲۵، ۹۱۸، ۸۴۱ و ۷۹۵ به علت هیدروکربن های آلیفاتیک در بنتونیت هستند. شکل ۵ سمت راست پایین، طیف FT-IR بنتونیت اصلاح شده سورفکتانت را نشان داد. در طیف FT-IR، برخی از قله‌ها برای بنتونیت اصلاح شده سورفاکتانت وجود دارد که در حدود ۲۸۵۱ و ۲۹۲۸ سانتی متر است. این قله‌ها فرکانس‌های کشش متقارن و نامتقارن را برای C-H به ترتیب در مولکول‌های سورفاکتانت نشان داد. مولکول های سورفکتانت دارای دم‌های هیدروکربن هستند که شامل ۱۶ تعداد کربن در زنجیره‌ای آن‌ها است و این قسمت در سایت‌های بیرونی چارچوب بنتونیت قرار دارد. برای بنتونیت احیا شده با روش اسیدی گرمایی (پایین سمت چپ) طیف‌های واضحی مشخص است که با مقایسه با طیف بنتونیت خام تغییرها در جایگاه باندهای آن دیده می‌شود.

نتیجه‌های سطح ویژه نمونه ها

سطح نمونه‌های خاص با روش BET[۱] اندازه گیری شد[۱۹]. سطوح ویژه برای بنتونیت خام، بنتونیت اصلاح شده با روش اسیدی گرمایی و بنتونیت اصلاح شده سورفاکتانت، به ترتیب با روش محاسبه سطح ویژه، برابر با ۲۱/۵۵۰ ، ۳۰/۴۶۶ و ۱۶/۰۷۴ مترمربع بر گرم بود.

نتیجه‌های روش دیسکی

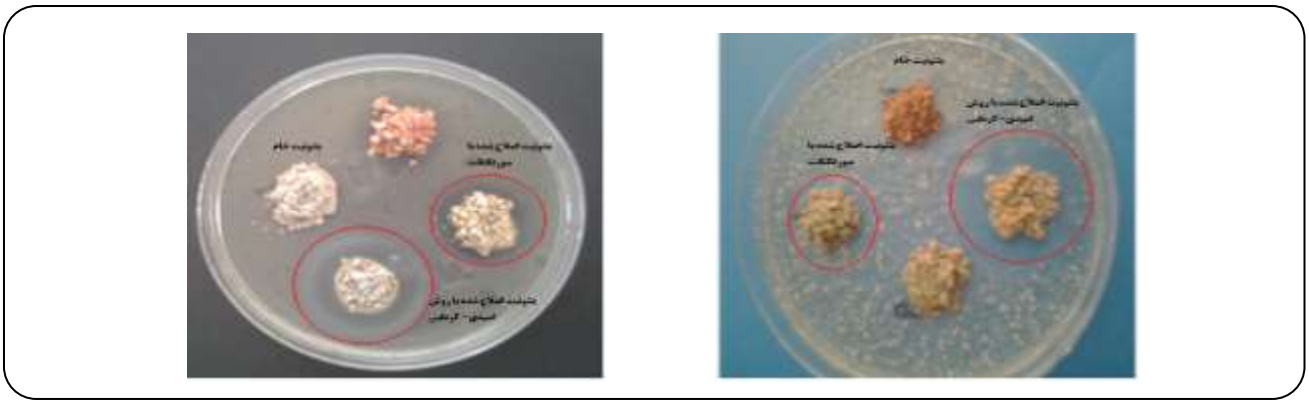
قطر ناحیه بازدارندگی (DIZ)[۲] میزان مهار رشد باکتری *A. hydrphila* و *S. iniae* را نسبت به بسترهای رسی محتوی ترکیب‌های ضد میکروبی نشان می‌دهد و هرچه این حساسیت بالاتر باشد، باکتری‌ها با فاصله‌ی بیش‌تری از بستر اجازه رشد می‌یابد (شکل ۶). میانگین مهار رشد باکتری در دو ترکیب ضد باکتری، در حالت اصلاح شده با سورفکتانت کاتیونی تترادسیل تری متیل آمونیوم برمید و روش اسیدی گرمایی در جدول ۴ آورده شده است، ولی در گروه‌های شاهد و بسترهای بدون تیمار مهار رشد باکتری دیده نشد.

(۱) Brunauer–Emmett–Teller

(۲) Diameter of Inhibition Zone

جدول ۴ـ نتیجه‌های به دست آمده از هاله عدم رشد برای دو باکتری مورد بررسی (بر حسب میلی متر).

گونه باکتریایی	قطر هاله عدم رشد(میانگین ± انحراف استاندارد)	
	بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت	بنتونیت اصلاح شده با روش اسیدی–گرمایی
آئروموناس هیدروفیلا	۴٫۶۷۷ ±۰٫۴۰۴	۱۵٫۱۷۰ ± ۰٫۲۳۳
استرپتوکوکوس اینیایی	۴٫۳۴۳ ± ۰٫۱۸۸	۱۲٫۷۸۰ ± ۰٫۱۱۵

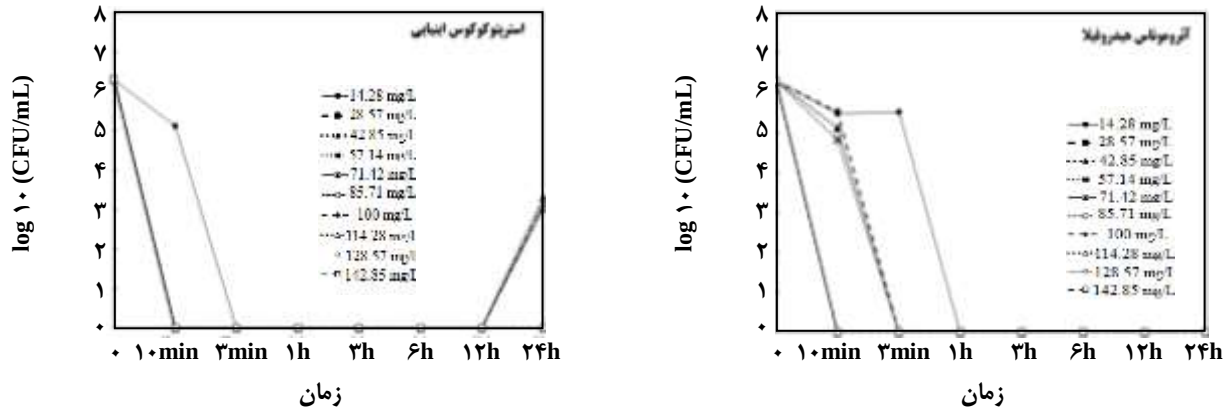


شکل ۶ ـ بررسی میزان هاله رشد نیافتگی مواد در برابر باکتری‌های ائروموناس هیدروفیلا(سمت راست) و استرپتوکوکوس اینیایی (سمت چپ).

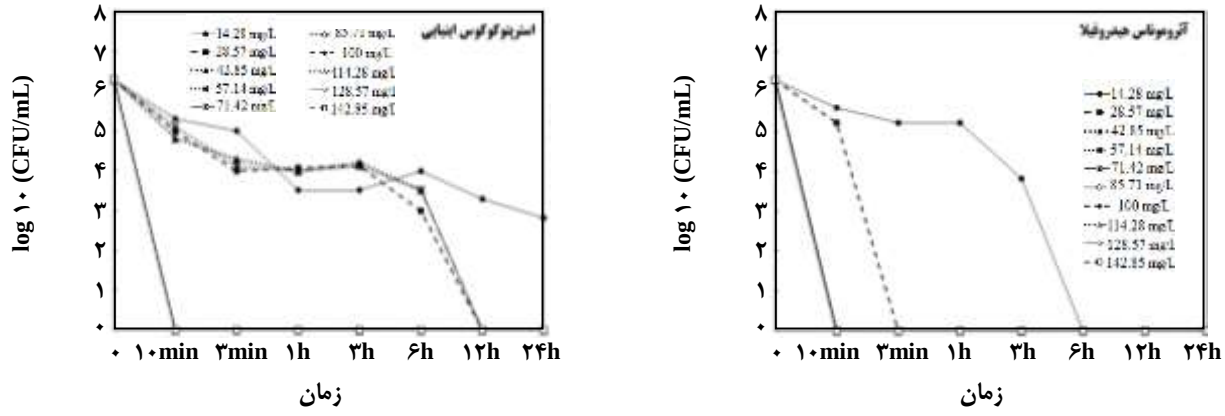
تعیین میزان کم‌ترین میزان بازدارندگی (MIC و کم‌ترین میزان کشندگی (MBC)

در لوله‌های دارای بسترهای بنتونیت اصلاح شده توسط سورفکتانت کاتیونی و اصلاح شده توسط روش اسیدی گرمایی تراکم باکتری پس از ۲۴ ساعت از لگاریتم ۶ به صفر در میلی لیتر برای *Streptococcus iniae* در زمانهای گوناگون رسید. در نتیجه بسترهای بنتونیتی اصلاح شده توسط دو روش دارای قابلیت بالایی در تمام حالت‌ها قادر به کنترل کامل رشد باکتری و همچنین از بین بردن باکتری‌ها بودند (شکل‌های ۷ و ۸). نتیجه‌های پژوهش‌های همانند بر روی رس‌های اصلاح شده توسط ترکیب‌های سورفکتانی دیگر نشان داد که فعال سطحی قرار گرفته روی ساختار سطحی و لایه ای بنتونیت سبب اتصال باکتری‌ها به آن‌ها و سرانجام از بین رفتن آن‌ها می‌شود [۱۳]. در مورد بنتونیت اصلاح شده توسط روش اسیدی ـ گرمایی تا کنون گزارشی مبنی بر چگونگی عملکرد ضد میکروبی آن در منابع گزارش نشده است ولی به نظر می رسد که اصلاح توسط تیمارهای بسیار اسید و گرما سبب ایجاد سایت های ضد میکروبی اسیدی و همچنین ایجاد تخلخل بسیار بالا در سطح بنتونیت شده [۲۱، ۲۰] و از طریق این تخلخل‌ها باکتری‌های مورد بررسی به دام افتاده و از بین رفته‌اند.

بیماری استرپتوکوکوزیس به عنوان مهم‌ترین بیماری و بیماری آئروموناس در رده‌های بعدی به عنوان عامل‌های بیماری‌زای باکتریایی شایع با تلفات بالا در سامانه‌های پرورش ماهی در ایران محسوب می‌شوند [۲۲]. استفاده از ترکیب‌های آنتی بیوتیکی سبب ایجاد سویه‌های مقاوم در این گونه‌ها شده است، از این رو اتخاذ یک سیاست موثر برای کنترل این گونه باکتری‌ها احساس می‌شود. استفاده از ضد عفونی کننده‌های بسیار سبب ایجاد مقاومت دارویی در باکتری‌های بیماری‌زا شده و منجر به افزایش مرگ و میر و افزایش هزینه‌های مراقبت بهداشتی می‌شود [۲۰]. نبود موفقیت در درمان بسیاری از بیماری‌های مزمن و حاد، همچنین اثرهای مضر داروهای شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم در کشور و مقاومت روز افزون باکتری‌های گوناگون در برابر بسیاری از داروها، سبب گرایش پژوهشگران به مطالعه در زمینه استفاده از ترکیب‌های نوین با قابلیت بالاتر حذف عامل‌های بیماریزای باکتریایی را سبب شده است. استفاده از عصاره‌های گیاهی به دلیل تأثیر گذاری بهتر و عارضه‌های جانبی کم‌تر در صنعت آبزی پروری افزایش داده است [۲۴، ۲۳]. استفاده از ترکیب‌های معدنی مانند بنتونیت و زئولیت اصلاح شده و نشده در صنعت آبزی پروری بیش‌تر برای حذف آمونیاک و برخی از آنیون‌ها



شکل ۷ ـ بررسی روند کاهشی میزان لگاریتم باکتریایی در غلظت‌ها و زمان‌های گوناگون برای آئروموناس هیدروفیلا و استرپتوکوکوس اینیایی بنتونیت اصلاح شده توسط روش اسیدی-گرمایی.



شکل ۸ ـ بررسی روند کاهشی میزان لگاریتم باکتریایی در غلظت‌ها و زمان‌های گوناگون برای آئروموناس هیدروفیلا و استرپتوکوکوس اینیایی توسط بنتونیت اصلاح شده با سورفکتانت.

مورد استفاده قرار گرفته است [۱۲، ۱۱]. استفاده از زئولیت اصلاح شده توسط ترکیب‌های فلزی در کنترل بیماریهای قارچی ماهیان سردابی [۲۵]، و باکتریایی میگوها [۲۶] توسط پژوهشگران صورت پذیرفته است. مشکل عمده در مطالعه‌های یاد شده امکان آزاد شدن ترکیب‌های فلزی سمی از قبیل نقره و جذب آن توسط آبزی می باشد که می تواند در اندام‌های گوناگون انباشته شود. استفاده از ترکیب‌های رس بنتونیت اصلاح شده در مطالعه اخیر تا کنون در صنعت آبزی پروری گزارش نشده است. ترکیب‌های سطحی فعال می‌توانند با غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها ارتباط برقرار کنند و به عنوان عامل‌های ضدباکتری عمل کنند. از سورفکتان‌ها انواع گوناگونی به صورت کاتیونی، آنیونی و غیر یونی وجود دارد. مواد فعال سطحی کاتیونی به عنوان مولکول‌هایی که اثرهای ضد میکروبی را نشان می‌دهند، شناخته می‌شوند. پژوهش‌ها نشان داد که فعالیت ضد میکروبی مواد فعال سطحی بستگی به ساختار این مواد دارد [۲۸، ۲۷]. مواد فعال سطحی اثرهای ضد باکتریایی را در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نشان داده اند، اما کارایی زیستی با طول زنجیر ارتباط داشت. سورفکتان‌های با ۱۲ کربن در دم هیدروکربن دارای بهترین فعالیت ضد باکتری بود. مولکول‌های ماده میان سطحی تمایل دارند دو لایه روی سطح ترکیب‌های حامل آن‌ها ایجاد کنند و سپس بار منفی مواد معدنی به مثبت تغییر می‌دهند [۲۹]. استفاده از روش اصلاحی با تیمار اسیدی و گرمایی سبب ایجاد تغییرهایی در ساختار و عملکرد ترکیب‌های رسی می‌شود. استفاده از اسیدهای گوناگون سبب ایجاد سایت‌های اسیدی فعال و ورود

ترکیب‌ها با خاصیت ضد میکروبی به ساختار رس بنتونیت شد [۳۱، ۳۰]. نتیجه‌های این پژوهش نشان داد که ترکیب‌های اصلاح شده معدنی مورد استفاده قابلیت مناسبی در حذف باکتری‌های مورد بررسی از خود نشان دادند و می توانند به عنوان یک ابزار نوین ارزان قیمت و با کارایی بالا در صنعت آبزی‌پروری مورد استفاده قرار گیرند. از انجایی که ترکیب‌های مورد استفاده در ساخت مواد ضد میکروبی در مقیاس فراوان در معادن متعددی در کشور وجود دارد، می‌توان از آن‌ها به عنوان ترکیب‌های جایگزین ترکیب‌های شیمیایی ضد عفونی کننده دیگر که دارای عارضه‌های خطرناک برای آبزیان و انسان هستند، استفاده نمود.

نتیجه گیری

در این پژوهش با استفاده از دو ترکیب رسی احیا شده با ماده فعال سطحی کاتیونی و روش اسیدی گرمایی به بررسی ویژگی ضد میکروبی علیه دو باکتری بیماری‌زای در سامانه‌های پرورشی آبزیان پرداخته شد. نتیجه‌ها نشان داد تیمارهای اعمال شده توسط ماده فعال سطحی کاتیونی و روش اسیدی گرمایی سبب ایجاد تغییرهای در سطح لایه‌ای بنتونیت شدند و با این تغییرها ویژگی ضد میکروبی به دست آمد. در بنتونیت احیا شده توسط ماده فعال سطحی کاتیونی، دولایه فعال سطحی تشکیل شده در شبکه بنتونیت سبب ایجاد خاصیت ضد باکتریایی شد. در بنتونیت اصلاح شده توسط تیمارهای اسیدی و گرمایی تغییرهای ساختاری مانند ایجاد حالت متخلخل، تشکیل سایت های اسیدی فعال و قرارگیری برخی عامل‌های ضد میکروبی پس از اعمال تیمارها سبب ایجاد خاصیت ضد میکروبی شد. استفاده از این دو ترکیب برای اولین بار علیه باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان صورت گرفته است. نتیجه‌های نشان داد با توجه به ارزان و فراهم بودن مواد اولیه (رس بنتونیت) در کشور این دو ترکیب را می توان به عنوان جایگزین ترکیب‌های شیمیایی با عارضه‌های بسیار در سامانه‌های پرورشی استفاده نمود.

قدردانی

بدین وسیله از زحمت‌های سرکار خانم دکتر معصومه بحرینی که در انجام این پژوهش همکاری نمودند سپاس‌گزاری و قدردانی می‌شود

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۹

مراجع

[1] Milani C.J.E., Aziz R.K., Locke J.B., Dahesh S., Nizet V., Buchanan J.T., The Novel Polysaccharide Deacetylase Homologue Pdi Contributes to Virulence of the Aquatic Pathogen Streptococcus iniae, *Microbiology journal*, **156**(2): 543-554 (2010).

[2] Austin B., Austin D.A., "Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish". 4th Ed. Springer Pub. New York, (2007).

[3] Akhlaghi M., Keshavarz M., Occurring Streptococcosis Salmon in Farms Province, *Iranian Journal of Veterinary Research*, **3**(2):183-189 (2002).

[4] Handy R., Kammer F., Lead J., Hassellov, M., Owen R., Crane M., The Ecotoxicology and Chemistry of Manufactured Nanoparticles, *Ecotoxicology*, **17**(4): 287-314(2008).

[5] Yousr A.H., Napis S., Rusul G.R.A., Son R., Detection of Aerolysin and Hemolysin Genes in Aeromonas spp. Isolated from Environmental and Shellfish Sources by Polymerase Chain Reaction. *ASEAN Food Journal*, **14**(3): 115-122 (2007).

[6] Ormen O., Granum P.E., Lassen J., Figueras M.J., Lack of Agreement between Biochemical and Genetic Identification of Aeromonas Spp, *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, **113**(3): 203-207(2005).

[7] Austin B., Adams C., "Fish pathogens. In: Austin B, Altwegg M, Gosling PJ, Joseph S (eds) The Genus Aeromonas", John Wiley & Sons, Inc., Chichester, p 197–243(1996).

[8] Yogananth N., Bhakyaraj R., Chanthuru, A., Anbalagan, T., Nila K.M., Detection of Virulence Gene in Aeromonashydrophila Isolated from Fish Samples Using PCR Technique, *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, **4**(1): 51-53 (2009).

[9] Moshtaqi B., Nezami S.H, Khara H., Pazhand Z., ShenaverMasuleh E., Halajian E., Determining of Fatal Density of KmNo4 and $CuSo_4.H_2o$ in Acipenser Persionbordin, *Biology Magazine*, **3**(2): 67-78 (2009).

[۱۰] شکوه سلجوقی، ظ؛ رفیعی، غ؛ ایمانی، ا؛ بختیاری، م؛ کاربرد بنتونیت احیا شده به روش اسیدی– گرمایی و سورفکتانت کاتیونی کاهش آلاینده‌های زیست محیطی فسفاته و سولفاته در پساب آبزی پروری، *مجله محیط شناسی*، (۳۸)**۳۰**: ۳۱ تا ۴۰ (۱۳۹۱) .

[۱۱] شکوه سلجوقی، ظ؛ رفیعی، غ؛ ایمانی، ا؛ بختیاری، م، حذف آلاینده های نیتریت و نیترات از پساب سیستم مدار بسته آبزی پروری توسط بنتونیت های اصلاح شده. *مجله آب و فاضلاب*، (۲)**۱۴**: ۵۴ –۴۶ (۱۳۹۱).

[12] Sengco M.R., Hagström J.A., Graneli E., Anderson D.M., Removal of Prymnesium Parvum (Haptophyceae) and Its Toxins Using Clay Minerals, *Harmful Algae*, **4**(2): 261–274(2005).

[13] Malek N.A., NurAzalisa, W., Yieh Lin C., Antibacterial Activity of Cetyltrimethylammonium Bromide Modified Silver-Bentonite, *Applied Clay Science*, **45**(4): 265-272 (2016).

[14] Goldstein J. (2003). "Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis". Springer. Retrieved 26 May 2012.pp. 563.

[15] Skoog D. A., West Holt., D. M. 1994. "Principle of Instrumental Analysis", Saunders College Publishing, Sixth edition. Pp. 325.

[16] NCCLS. "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 (2003).

[17] Jain P., Pradeep T., Potential of Silver Nanoparticle-Coated Polyurethane Foam as an Antibacterial Water Filter, *Biotechnology and Bioengineering*, **90**(1): 59-63 (2005).

[18] Schwalbe R., Steele-Moore L., Goodwin A. C., "Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols". CRC Press. Taylor & Francis Group. London (2007).

[19] Barrett E.P., Joyner L.G., Halenda P.P., The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substance I Computations from Nitrogen Isotherms, *Journal of American Chemistry Society*, **73**(1): 373-380 (1951).

[20] Lv Y., Liu H., Wang Z., Liu S., Hao L., Sang Y., Boughton R. I., Silver Nanoparticle-Decorated Porous Ceramic Composite for Water Treatment, *Journal of Membrane Science*, **331**(3): 50-56 (2009).

[21] Malek N.A., Ramli N.I., Characterization and Antibacterial Activity of Cetylpyridinium Bromide (CPB) Immobilized on Kaolinite with Different CPB Loadings, *Applied Clay Science*, **110**(2): 8–14 (2015).

[22] Rodriguez I., Novoa B., Figueras A., Immune Response of Zebrafish (Danio rerio) Against a Newly Isolated Bacterial Pathogen (*Aeromonas hydrophila*), *Fish & Shellfish Immunology*, **25**(3): 239-249 (2008).

[23] Zorriehzahra M.J., Hassan H.M.D., Nazari A., Gholizadeh M., Farahi A., Assessment of Environmental Factors Effects on Enteric Redmouth Disease Occurrence in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Farms in Hamedan Province, Iran, *Journal of Comparative Clinical Pathology Research*, **3**(1): 79-85 (2012).

[24] Soltani M., Ghodratnama M., Taheri Mirghaed A., Zargar A., Rooholahi S., The Effect of Zataria Multiflora Boiss and Rosmarinus Officinalis Essential oil on Streptococcus Iniae Isolated from Rainbow Trout Farms, *Journal of Veterinary Microbiology*, **9**(26): 1-11(2013).

[25] Johari1 S.A., Kalbassi M. R., Yu J., Inhibitory Effects of Silver Zeolite on in Vitro Growth of Fish Egg Pathogen, Saprolegnia sp, *Journal of Coastal Life Medicine*, **2**(5): 357-361(2014).

[26] Sarkheil M., Sourinejadad I., Mirbakhsh M., Kordestanid D., Joharie S.A., Application of Silver Nanoparticles Immobilized on TEPA-Den-SiO_2 as Water Filter Media for Bacterial Disinfection in Culture of Penaeid Shrimp Larvae, *Aquacultural Engineering*, **74**(5): 17–29 (2016).

[27] Aiad I.A., Badawi A.M., El-Sukkary M.M., El-Sawy A.A., Adawy A.I., Synthesis and Biocidal Activity of Some Naphthalene-Based Cationic Surfactants, *Journal of Surfactants and Detergents*, **15**(3): 223-234(2012).

[28] Zhi L., Li Q., Li Y., Sun Y., Self-Aggregation and Antimicrobial Activity of Saccharide-Cationic Surfactants, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **456**(4): 231-237(2014).

[29] Li Z., Bowman R.S., Sorption of Perchloroethylene by Surfactant-Modified Zeolite as Controlled by Surfactant Loading, *Environmental Science and Technology*, **32**(5): 2278-2281(1998).

[29] Sun Kou1 M.R., Mendioroz S., Guijarro M.I., A thermal Study of Zr-Pillared Montmorillonite, *Thermochimica Acta*, **323**(1-2): 145-157(1998).

[30] Onal M., Changes in Crystal Structure, Thermal Behavior and Surface area of Bentonite by Acid Activation, *Commun Science Journal*, **53**(3): 1-14 (2007).