مقاله علمی – پژوهشی:

ارزیابی برون‌تنی فعالیت ضد میکربی ترکیب بنزآلکانیوم کلراید و گلوتارآلدهید (REMOVE) بر آبهای با شوری متفاوت

دنیا نیک آئین*[۱و۲]، احمد عرفان‌منش[۳]، رضا مردانپور[۱و۲]

*dnikaein@ut.ac.ir

۱ – گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- گروه پژوهشی فرآورده‌های بیولوژیک دامی، سازمان جهاددانشگاهی تهران، جهاددانشگاهی، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۹

چکیده

پایداری ضدعفونی‌کننده‌ها در آب یکی از ویژگی‌های مطلوب این ترکیبات محسوب می‌شود. شرایط فیزیکوشیمیایی آب مانند سختی، pH، شوری و ... می‌تواند بر عملکرد ضدعفونی‌کننده‌ها تأثیر بگذارد. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر شوری‌های مختلف آب بر خاصیت ضدمیکربی ضدعفونی کننده تجاری REMOVE (ترکیب بنزآلکانیوم کلراید و گلوتارآلدهید) علیه برخی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای حقیقی و فرصت‌طلب آبزیان طراحی و اجرا گردید. ابتدا چهار باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*، *آئروموناس سالمونیسیدا*، *ویبریو هاروئی* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و سه قارچ *آسپرجیلوس نایجر*، *فوزاریوم اوکسیسپوروم* و جنس *ساپرولگنیا* انتخاب و در شرایط مناسب دمایی در محیط مناسب کشت داده شدند. سپس رقت‌های $۱۰^{۶}\times۳$-۱ از هر میکروارگانیسم تهیه شد و عملکرد ضدعفونی کننده REMOVE (در دو غلظت ppm ۲۰ و ۱۰) در غلظت‌های مختلف شوری (ppt ۴۰، ۲۰، ۰) در دو بازه زمانی min ۴۰ و ۲۰ بر ماندگاری میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به دو روش انتشار دیسک و در محیط مایع در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی گردید. بین دو غلظت ppm ۲۰ و ۱۰ ضدعفونی‌کننده در شوری‌های مختلف، اختلاف آماری معنی‌داری بر شمارش میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه مشاهده نگردید ($p>۰/۰۵$). لیکن افزایش میزان شوری به ppt ۴۰ و ۲۰، تأثیر معنی‌داری بر ماندگاری جمعیت میکروارگانیسم‌ها در مقایسه با شوری ppt ۰ داشت ($p<۰/۰۵$). در غلظت ppt ۴۰، بیشترین مقدار CFU/ml مربوط به باکتری *و. هاروئی* بود. گرچه در شرایط شوری نیز ضدعفونی‌کننده قادر به کاهش جمعیت میکروارگانیسم‌ها می‌باشد، لیکن در مقایسه با غلظت ppt ۰ این کاهش چندان مؤثر نخواهد بود. بنابراین، بر اساس نتایج مطالعه حاضر، احتمالاً می‌توان از این ضدعفونی‌کننده برای کم کردن جمعیت باکتری‌ها در شرایط شوری آب استفاده کرد، لیکن این کم کردن در عمل به تنهایی نتیجه بخش نخواهد بود و در کنار آن نیاز به استفاده از برنامه‌های کنترلی دیگری نیز می‌باشد.

لغات کلیدی: فعالیت ضدمیکربی، شوری، ضدعفونی‌کننده ریموو، بنزآلکانیوم کلراید، گلوتارآلدهید

*نویسنده مسئول

مقدمه

منابع آبی، یکی از راه‌های مهم ورود و انتشار عوامل عفونی در آبزی‌پروری هستند (Kasai *et al*., 2002; Villar-Navarro *et al*., 2019) به‌طوری‌که منبع آبی فاقد عوامل بیماری‌زا یک اصل مهم در موفقیت آبزی‌پروری می‌باشد (Middlemiss *et al*., 2015). از آن‌جایی که در سیستم‌های آبزی‌پروری میزبان و عامل بیماری‌زا در یک محیط مشترک (آب) قرار دارند و این محیط حاوی مقدار زیادی مواد آلی برای رشد میکروارگانیسم‌هاست، کنترل تکثیر عوامل بیماری‌زا چالش برانگیز است (Assefa and Abunna, 2018; Dewulf and Van Immerseel, 2019). ضدعفونی[1] یکی از روش‌های معمول کنترل و پیش‌گیری از بیماری‌ها در آبزی‌پروری است (De Schryver and Vadstein, 2014) . استفاده از ضدعفونی‌کننده‌ها در برنامه‌های امنیت زیستی نیز برای جلوگیری از بیماری‌های خاص و نیز به عنوان یکی از روش‌های معمول بهداشتی برای کاهش بروز و حذف بیماری‌ها در مزارع اهمیت دارد (Danner and Merrill, 2006; Mainous *et al*., 2012; Jia *et al*., 2017). اصول کلی ضدعفونی در آبزی‌پروری استفاده از ترکیبات شیمیایی با غلظت و به مدت مناسب برای از بین بردن تمامی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زاست (Ismail *et al*., 2017).

در سیستم‌های آبزی‌پروری، آلودگی متقاطع نسبتاً شایع است. علاوه بر این، به دلیل تأثیر مواد شیمیایی بر آبهای طبیعی و نیز در موارد آب دریا، خطر ایجاد باقی‌مانده‌های اکسیدانی به علت واکنش ترکیبات شیمیایی با نمک‌های موجود در آب دریا، استفاده از ضدعفونی‌کننده‌ها در سیستم‌های پرورشی محدودیت دارد (Close *et al*., 2006). ضدعفونی‌کننده‌ها بر اساس ترکیب شیمیایی دارای طیف اثر متفاوتی بر میکروارگانیسم‌ها (باکتری، ویروس، قارچ و انگل‌ها) هستند. یک ضدعفونی کننده مناسب بایستی دارای طیف فعالیت وسیعی علیه گونه‌های مختلف میکروارگانیسم‌های مضر باشد و سریع عمل کند. همچنین عملکرد ضدعفونی‌کننده نباید تحت تأثیر باقی‌مانده‌های مواد آلی در آب و نیز شرایط کیفی آب مانند سختی، pH و شوری قرار گیرد (Huyben *et al*., 2018، حسنخانی و همکاران، ۲۰۲۰).

گلوتارآلدهید ترکیبی است که بر آن مطالعات زیادی صورت گرفته و نسبتاً ارزان قیمت است. این ترکیب علیه اشکال رویشی طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها و اسپور آنها مؤثر بوده لیکن فعالیت آن بر مایکوباکتریوم‌ها اندک است (Rutala and Weber, 2013; Grasteau *et al*., 2015; Lin *et al*., 2017). این ترکیب با اتصال پروتئین‌ها و لیپیدهای سطح غشاء خارجی سلول‌ها عمل می‌کند (Vikram *et al*., 2015). بنزآلکانیوم کلراید یکی از ترکیبات چهارتایی آمونیوم بر پایه نیتروژن است که طیف ضدمیکروبی وسیعی دارد. این ضدعفونی‌کننده با اتصال به غشاء سیتوپلاسمی و تغییر در نفوذپذیری آن باعث خارج شدن اجزاء سیتوپلاسمی و در نهایت مرگ سلول می‌گردد (Abdelaziz *et al*., 2019).

یک ترکیب ضدعفونی‌کننده می‌تواند حاوی یک یا بیشتر مواد شیمیایی باشد. ضدعفونی کننده تجاری ریموو (DT 180 REMOVE، ساخت کشور ایتالیا) حاوی گلوتارآلدهید و بنزآلکانیوم کلراید (هریک به میزان ۱۰٪ (۱۰۰ ml/lit)) است که بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، مایکوپلاسماها، مایکوباکتری‌ها، انواع ویروس‌ها، قارچ‌های مخمری و رشته‌ای، جلبک‌ها، پروتوزوآها و نیز اسپور قارچ‌ها و باکتری‌ها مؤثر می‌باشد. از این ضدعفونی کننده می‌توان برای ضدعفونی سطوح و تجهیزات و نیز ضدعفونی حوضچه‌های پرورش آبزیان استفاده کرد (Shah and Naseby, 2017).

از آن‌جایی که غلظت نمک می‌تواند بر عملکرد ضدعفونی‌کننده‌ها مؤثر باشد، مطالعه حاضر، با هدف تعیین عملکرد ضدعفونی کننده ترکیب بنزآلکانیوم کلراید و گلوتارآلدهید با نام تجاری ریموو بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای ماهی (قارچ و باکتری) در آبهای با شوری متفاوت طراحی و اجرا گردید.

[1] Disinfection

مواد و روش کار

تهیه ضدعفونی‌کننده

ضدعفونی کننده تجاری ریموو حاوی بنزآلکانیوم کلراید و گلوتارآلدهید (هریک به میزان ml/lit ۱۰۰ و خلوص ۱۰٪ در محصول نهایی) از شرکت ORPC ایتالیا (شرکت واردکننده توسعه آبزیان کاسپین نیل) تهیه گردید و تا زمان مصرف در دمای محیط نگه‌داری شد. این ضدعفونی کننده بر اساس دستورالعمل سازنده در دو غلظت ppm ۲۰ و ۱۰ (ppm ۱ از هر ترکیب در غلظت ppm ۱۰ و ppm ۲ از هر ترکیب در غلظت ppm ۲۰) و در دو بازه زمانی min ۴۰ و ۲۰ علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه استفاده شد.

تهیه میکروارگانیسم‌ها

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر، شامل *استرپتوکوکوس اینیایی*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، *آئروموناس سالمونیسیدا*، *ویبریو هاروئی*، *آسپرجیلوس نایجر* (ATCC:1004)، *فوزاریوم اکسیسپوروم* (PTCC:5115) و جنس *ساپرولگنیا* بودند که از گروه پژوهشی فرآورده‌های بیولوژیک دامی سازمان جهاددانشگاهی تهران (نمونه‌های باکتریایی) و آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (نمونه‌های قارچی) تهیه گردیدند. تمامی گونه‌های مورد مطالعه از ماهی قزل‌آلا یا منابع آبی جدا شده بودند و جنس و یا گونه آنها به روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی را مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران (PTCC) تأیید کرده بود. محیط تریپتیک سوی براث (TSB) با و بدون ۱/۵٪ کلرید سدیم (NaCl) (در خصوص باکتری *ویبریو هاروئی*) برای کشت سویه‌های باکتریایی و محیط سابورو دکستروز براث (SB) برای کشت سویه‌های قارچی استفاده گردید. تمامی سویه‌ها پس از تلقیح در محیط‌های کشت مذکور، به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند و تا زمان استفاده در یخچال نگه‌داری گردیدند.

تهیه غلظت‌های شوری

سه غلظت شوری معادل ppt ۴۰، ۲۰، ۰ برای انجام مطالعه حاضر در نظر گرفته شد تا بیانگر میزان شوری آب از رودخانه تا دریا باشند. بدین منظور آب رودخانه و آب دریا (خلیج فارس) تهیه گردید و میزان شوری آنها با دستگاه شوری سنج اندازه‌گیری شد. با استفاده از رقیق سازی آب دریا، شوری آب معادل ppt ۲۰ به‌دست آمد (Ataimehr *et al*., 2010). تمامی آبها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت min ۱۲ اتوکلاو گردیدند و در ظروف شیشه‌ای با حجم ml ۵۰۰ تقسیم شدند.

بررسی خاصیت ضد میکروبی ضدعفونی‌کننده به روش انتشار دیسک

در این آزمون، مقادیر ppm ۲۰ و ۱۰ از ضد عفونی کننده ریموو در داخل گوده‌های تهیه شده در محیط کشت حاوی میکروارگانیسم ریخته شد. ابتدا از میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش کدورت نیم مک‌فارلند تهیه و سپس با استفاده از سوآب استریل در محیط مولرهینتون آگار کشت داده شدند. هر آزمایش سه بار تکرار گردید و نمونه‌ها به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت میزان هاله ممانعت از رشد اندازه‌گیری گردید (Balouiri *et al*., 2016).

بررسی تأثیر شوری بر خاصیت ضدمیکروبی ضدعفونی کننده

برای بررسی خاصیت ضدمیکروبی ریموو بر باکتری‌ها از روش Mon-On و همکاران (۲۰۱۸) با کمی تغییرات استفاده شد. برای بررسی تأثیر ریموو بر قارچ‌های مورد مطالعه برای *ساپرولگنیا* از روش Macchioni و همکاران (۱۹۹۹) و برای گونه‌های *فوزاریوم* و *آسپرژیلوس* از روش Day و همکاران (۲۰۰۹) با تغییراتی استفاده گردید. به طور خلاصه، ابتدا میزان میکروارگانیسم‌ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و کدورت نیم مک‌فارلند در $۱-۳\times۱۰^{۶}$ cells/ml تنظیم گردید. سپس میزان ml ۱ از سوسپانسیون باکتری یا قارچ به هر یک از تیمارهای آب افزوده شد. ضد عفونی کننده ریموو به میزان ppm ۲۰ و

۱۰ و برای زمان‌های min ۴۰ و ۲۰ به تیمارها اضافه گردید. کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند. پس از طی بازه زمانی مورد نظر، از نمونه‌ها رقت‌های سریال ۱۰ تایی تهیه گردید و میزان ml ۰/۵ از هر رقت در محیط‌های بلاد آگار، بلاد آگار حاوی ۱/۵٪ کلرید سدیم (NaCl) (برای کشت باکتری *ویبریو هاروئی*) و سابورودکستروز آگار (SDA) (در مورد گونه‌های قارچی) کشت داده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند، رقت‌های دارای ۳۰۰-۳۰ کلونی شمارش گردیدند و تعداد میکروارگانیسم‌های زنده بر اساس CFU/ml تعیین گردید. نتایج به صورت CFU/ml یا LogCFU/ml بیان شدند.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای آنالیز آماری نتایج از نرم‌آفزار SPSS ورژن ۲۱ و آزمون آنالیز واریانس ANOVA و تست تکمیلی Tukey(در صورت برابر بودن واریانس‌ها) یا Tamhane (در صورت عدم برابری واریانس‌ها) استفاده شد. ارزش p کوچک‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت SE ± میانگین ارائه شده‌اند.

نتایج

بررسی خاصیت ضد میکروبی ضدعفونی‌کننده به روش انتشار دیسک

در مطالعه حاضر، از فرمالدهید در رقت‌های ppm ۲۰ و ۱۰ به عنوان شاهد استفاده شد. نتایج آزمون انتشار دیسک نشان داد که در مقایسه با فرمالدهید، ضدعفونی کننده ریموو قادر به مهار رشد میکروارگانیسم‌های باکتریایی مورد مطالعه است. در مورد قارچ‌ها این ضدعفونی‌کننده دارای اثرات کمتری در مقایسه با فرمالدهید می‌باشد به‌گونه‌ای که در پلیت‌های حاوی فرمالین رشدی مشاهده نشد، لیکن در پلیت‌های حاوی ضدعفونی کننده ریموو، قطر هاله ممانعت از رشد کمتر بود. کم‌ترین میزان ممانعت از رشد مربوط به قارچ *ساپرولگنیا* بود که اندازه هاله نسبت به فرمالین ۳۰٪ کوچک‌تر بود.

بررسی تأثیر شوری بر خاصیت ضدمیکروبی ضدعفونی کننده

نتایج مربوط به اثر ضدعفونی کننده ریموو در دو غلظت ppm ۲۰ و ۱۰، در دو بازه زمانی min ۴۰ و ۲۰ بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در جداول ۱ و ۲ ارائه شده است. در بازه زمانی min ۲۰، غلظت ppm ۲۰ ریموو در مقایسه با غلظت ppm ۱۰ ضدعفونی‌کننده تنها در شوری ppt ۲۰، اختلاف آماری معنی‌داری در CFU ی *آ. نایجر* و *ف. اکسیسپوروم* در مقایسه با مقدار اولیه میکروارگانیسم نشان داد ($p<۰/۰۵$) و در سایر شوری‌ها افزایش غلظت ضدعفونی کننده تأثیر معنی‌داری بر CFU میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بعد از min ۲۰ مواجهه نداشت ($p>۰/۰۵$). مقادیر ppt ۴۰ و ۲۰ شوری به‌جز در مورد *اس. اینیایی*، در هر دو غلظت مورد استفاده ریموو، توانسته بودند تأثیر معنی‌داری بر جمعیت میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در مقایسه با شوری ppt ۰ در مدت زمان min ۲۰ مواجهه بگذارند ($p<۰/۰۵$). در بازه زمانی min ۴۰، مقایسه تأثیر غلظت ضدعفونی‌کننده بر جمعیت میکروارگانیسم‌ها در شوری‌های مختلف نشان داد که تنها در شوری ppt ۴۰ و ۲۰، در مورد *و. هاروئی* و شوری ppt ۰ در مورد *ف. اکسیسپوروم*، اختلاف آماری معنی‌داری بین غلظت ppm ۲۰ و ppm ۱۰ در کاهش جمعیت میکروبی وجود دارد ($p<۰/۰۵$). در مدت زمان min ۴۰ مواجهه نیز غلظت‌های مختلف شوری توانسته بودند در مقادیر ppm ۲۰ و ۱۰ ریموو به طور معنی‌داری جمعیت میکروارگانیسم‌ها را به‌جز در *اس. اینیایی* (شوری ppt ۲۰) و *ف. اکسیسپوروم* (شوری ppt ۴۰ و ۲۰) در مقایسه با شوری ppt ۰ افزایش دهند ($p<۰/۰۵$).

میزان (Log CFU/ml) میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه را در غلظت‌های مختلف شوری با گذشت زمان در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس این تصویر، بیشترین تأثیر ضدعفونی کننده ریموو در مدت min۲۰ مواجهه بوده است و بعد از آن اختلاف آماری معنی‌داری بین Log جمعیت میکروارگانیسم‌ها مشاهده نمی‌شود ($p>۰/۰۵$). علاوه بر این، در شوری‌های ppt ۴۰ و ۲۰ نیز ترکیب ضدعفونی‌کننده توانسته است جمعیت میکروبی را در مقایسه با زمان صفر به میزان قابل توجهی کاهش دهد.

جدول ۱: نتایج تأثیر شوری‌های مختلف آب بر میزان (CFU/ml) میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه پس از ۲۰ دقیقه مواجهه با ضدعفونی کننده ریموو (۲۰ ppm و ۱۰ از محلول ضدعفونی کننده نهایی) (داده‌ها به صورت Mean±SE بیان شده‌اند.)

Table 1: The effect of water with different salinities on CFU of studied microorganisms after 20 min. challenge with Remove disinfectant (10 & 20 ppm) (data are shown as Mean±SE)

میکروارگانیسم	ppm (CFU/ml)۱۰			ppm (CFU/ml)۲۰		
	ppt۰	ppt۲۰	ppt۴۰	ppt۰	ppt۲۰	ppt۴۰
Streptococcus iniae	۸/۷۵±۵^{a*}	۱۰^{۳}±۷۵/۸×۱/۱^{b}	۱۰^{۳}±۴۹۶×۷^{c}	۶/۶±۳/۳۳^{a}	۱۰^{۲}±۱۷/۳۲×۸/۹^{ab}	۱۰^{۳}±۳۹۶/۹×۵/۵^{c}
S. agalactiae	۵±۱/۲۵^{a}	۱۰^{۲}±۶/۲۵×۳/۷^{b}	۱۰^{۳}±۱۲۴۸/۴×۸/۲^{c}	۵/۳±۰/۶۶^{a}	۱۰^{۲}±۱۱/۵۵×۳/۳^{b}	۱۰^{۳}±۹۹۸/۷×۶/۶^{c}
Aeromonas salmonicida	۳/۷۵±۰/۶۶^{a}	۱۰^{۲}±۳۱/۲۵×۴^{b}	۱۰^{۳}±۲۲۲۲×۹/۸^{c}	۲/۶±۰/۶۶^{a}	۱۰^{۲}±۴۳/۷۲×۳/۵	۱۰^{۳}±۱۷۷۷/۶×۷/۸۵^{c}
Vibrio harveyi	۸/۷۵±۲/۵^{a}	۱۰^{۲}±۱۶/۵۳×۸^{b}	۱۰^{۴}±۵۹۶/۲×۱/۷^{c}	۴/۶±۱/۳^{a}	۱۰^{۲}±۳۹/۳×۵/۷^{b}	۱۰^{۴}±۴۷۷×۱/۳^{c}
Saprolegnia spp	۲۵±۴/۵^{a}	۱۰^{۲}±۵۷/۳×۹/۴^{b}	۱۰^{۳}±۱۲۴۸/۴×۴/۵^{c}	۲۰±۲/۰۲^{a}	۱۰^{۲}±۳۵/۱۲×۶/۵^{b}	۱۰^{۳}±۹۹۹×۳/۶^{c}
Aspergillus niger	۳/۲±۴/۷^{a}	۱۰^{۳}±۸۱/۲۵×۱/۳^{b}	۱۰^{۳}±۲۱۶/۵×۵/۴^{c}	۳۷/۶±۳/۸۴^{a}	۱۰^{۲}±۴۲/۵۶×۹/۲^{b}	۱۰^{۳}±۱۷۳/۲×۴/۳^{d}
Fusarium Oxysporum	۳/۸±۵^{a}	۱۰^{۳}±۲۲/۵×۱/۴^{b}	۱۰^{۳}±۱۷۳۶/۵×۷/۶^{c}	۳۸±۷/۲۳^{a}	۱۰^{۲}±۳۵/۱۲×۹^{d}	۱۰^{۳}±۱۳۸۹/۲×۶/۱^{c}

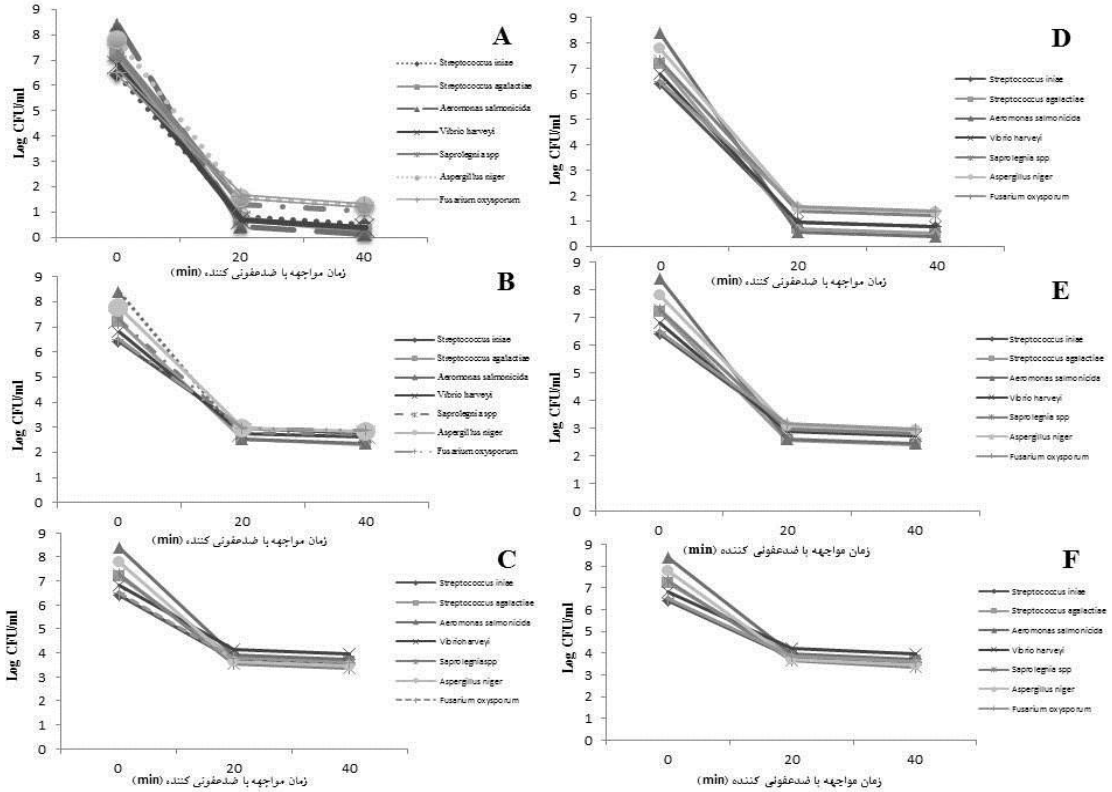
*حروف متفاوت در هر ردیف صرف نظر از غلظت ضدعفونی کننده، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌هاست (p<۰/۰۵). مقایسه معنی-داری بین هر دو غلظت ۲۰ppm و ۱۰ ریموو و شوری‌های مختلف آب صورت گرفته است. به عنوان مثال در مورد باکتری *اس. اینیایی*، میزان CFUی این باکتری در شوری ۰ppt و غلظت ۱۰ppm با شوری ۲۰ppt و ۴۰ در غلظت ۱۰ppm ریموو و شوری ۴۰ppt در غلظت ۲۰ppm ریموو اختلاف آماری معنی‌دار دارد (p<۰/۰۵).

جدول ۲: نتایج تأثیر شوری‌های مختلف آب بر میزان (CFU/ml) میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه پس از ۴۰ دقیقه مواجهه با ضدعفونی کننده ریموو (۲۰ppm و ۱۰ از محلول ضدعفونی کننده نهایی) (داده‌ها به صورت Mean±SE بیان شده‌اند.)

Table 2: The effect of water with different salinities on CFU of studied microorganisms after 40 min. challenge with Remove disinfectant (10 & 20 ppm) (data are shown as Mean±SE).

میکروارگانیسم	ppm (CFU/ml)۱۰			ppm (CFU/ml)۲۰		
	ppt۰	ppt۲۰	ppt۴۰	ppt۰	ppt۲۰	ppt۴۰
Streptococcus iniae	۵/۸±۳/۳^{a}	۱۰^{۲}±۵۰/۵×۷/۳^{b}	۱۰^{۳}±۳۳۰/۷×۴/۶^{c}	۳/۳۳±۳/۳^{a}	۱۰^{۲}±۴۰/۴×۵/۹^{ab}	۱۰^{۳}±۲۶۴×۳/۷^{c}
S. agalactiae	۳/۳±۰/۸^{a}	۱۰^{۲}±۴/۱×۲/۴۵^{b}	۱۰^{۳}±۸۳۲/۳×۵/۵^{c}	۱/۶۷±۰/۸^{a}	۱۰^{۲}±۳/۳×۱/۹۶^{b}	۱۰^{۳}±۶۶۵/۸×۴/۴^{c}
Aeromonas salmonicida	۲/۵±۰^{a}	۱۰^{۲}±۲۰/۸×۲/۷^{b}	۱۰^{۳}±۱۴۸۱×۶/۵^{c}	۱/۳۳±۰/۳^{a}	۱۰^{۲}±۱۶/۶×۲/۱^{b}	۱۰^{۳}±۱۱۸۵×۵/۲^{c}
Vibrio harveyi	۵/۸±۱/۶^{a}	۱۰^{۲}±۱۱/۰×۵/۳^{b}	۱۰^{۴}±۳۹۷/۵×۱/۱^{c}	۲/۳۳±۰/۶^{a}	۱۰^{۲}±۸/۸×۴/۲^{d}	۱۰^{۳}±۳۱۷/۹×۹^{e}
Saprolegnia spp	۱۶/۶±۳^{a}	۱۰^{۲}±۳۸/۱×۶/۲^{b}	۱۰^{۳}±۸۳۲/۳×۳^{c}	۱۰/۳۳±۰/۸^{a}	۱۰^{۲}±۳۰/۵×۵^{b}	۱۰^{۳}±۶۶۵/۸×۲/۴^{c}
Aspergillus niger	۲۱/۲۵±۳/۱^{a}	۱۰^{۲}±۵۴/۱×۸/۴^{b}	۱۰^{۳}±۱۴۴/۳×۳/۶^{c}	۱۷±۲/۵^{a}	۱۰^{۲}±۴۳×۶/۷۳^{b}	۱۰^{۳}±۱۱۵×۲/۹^{c}
Fusarium Oxysporum	۲۵/۸±۳/۳^{a}	۱۰^{۲}±۱۵/۰×۹/۴۵^{a}	۱۰^{۳}±۱۱۵۷×۵/۱^{a}	۱۷/۶۷±۴/۹^{b}	۱۰^{۲}±۱۲×۷/۵۶^{ab}	۱۰^{۳}±۹۲۶×۴/۱^{a}

*حروف متفاوت در هر ردیف صرف نظر از غلظت ضدعفونی کننده، نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌هاست (p<۰/۰۵). مقایسه معنی‌داری بین هر دو غلظت ۲۰ppm و ۱۰ ریموو و شوری‌های مختلف آب صورت گرفته است. به عنوان مثال در مورد باکتری *اس. اینیایی*، میزان CFUی این باکتری در شوری ۰ppt و غلظت ۱۰ppm با شوری ۴۰ppt و ۲۰ در غلظت ۱۰ppm ریموو و شوری ۴۰ppt در غلظت ۲۰ppm ریموو اختلاف آماری معنی‌دار دارد (p<۰/۰۵).



شکل ۱: میزان میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه (Log CFU/ml) با گذشت زمان در درجات مختلف شوری و دو غلظت ppm ۲۰ و ۱۰ مورد استفاده ضدعفونی کننده ریموو. A. غلظت ppm ۲۰ ضدعفونی کننده و شوری ppt ۰؛ B. غلظت ppm ۲۰ ضدعفونی کننده و شوری ppt ۲۰؛ C. غلظت ppm ۲۰ ضدعفونی کننده و شوری ppt ۴۰؛ D. غلظت ppm ۱۰ ضدعفونی کننده و شوری ppt ۰؛ E. غلظت ppm ۱۰ ضدعفونی کننده و شوری ppt ۲۰؛ F. غلظت ppm ۱۰ ضدعفونی کننده و شوری ppt ۴۰

Figure 1: Amount of the studied microorganisms (Log CFU / ml) over the time in different degrees of salinity and two concentrations of REMOVE (10 & 20 ppm). A: 20ppm disinfectant concentration and salinity of 0ppt; B: 20ppm disinfectant concentration and salinity of 20ppt; C: 20ppm disinfectant concentration and salinity of 40ppt; D: 10ppm disinfectant concentration and salinity of 0ppt; E: 10ppm disinfectant concentration and salinity of 20ppt; F: 10ppm disinfectant concentration and salinity of 40ppt

بحث

از آنجایی که در سیستم‌های پرورش در قفس، امکان خارج کردن تجهیزات از آب وجود ندارد و ضدعفونی می‌بایست در درون آب صورت پذیرد (Liu *et al*., 2017) و عوامل متعددی نیز از جمله مدت زمان مواجهه، دما، pH، حضور مواد جامد معلق و ترکیبات آلی و غیر آلی بر کارآیی ضدعفونی‌کننده‌ها مؤثرند (Danner and Merrill, 2006, Mainous *et al*., 2010)، مطالعه حاضر با هدف بررسی عملکرد یک ضدعفونی کننده تجاری ریموو بر میزان میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فرصت طلب آبزیان در شوری‌های مختلف آب طراحی و اجرا گردید. بر اساس مرور منابع صورت گرفته، تاکنون مطالعات زیادی بر تأثیر شوری‌های مختلف آب بر خاصیت ضدمیکروبی ترکیبات ضدعفونی‌کننده در آبزیان در ایران و جهان انجام نشده است.

در مطالعه حاضر، ریموو در شوری ppt ۰ در هر دو بازه زمانی بیشترین تأثیر را بر باکتری *آ. سالمونیسیدا* و قارچ *آ. نایجر* و کم‌ترین تأثیر را بر باکتری‌های *اس. اینیایی* و. *هاروئی* و قارچ *ساپرولگنیا* داشت. این اختلاف در اثر می‌تواند به علت گرم مثبت بودن باکتری *اس. اینیایی* و دیواره سلولزی قارچ *ساپرولگنیا* باشد. اما در مورد باکتری *و. هاروئی* نیاز به مطالعات بیشتری در خصوص مکانیسم عمل این ضدعفونی کننده است.

Tabande و Akhlaghi (۲۰۰۷) تأثیر ضدعفونی‌کننده‌های معمول را بر باکتری بیماری‌زای *اس. اینیایی* بررسی کردند. یافته‌های آنها نشان داد که کلرهگزیدین و هیپوکلریت سدیم مؤثرترین ضدعفونی‌کننده از نظر غلظت و زمان بر باکتری *اس. اینیایی* بودند. علاوه بر این، آنها نیز نشان دادند که عوامل مداخله‌گر در محیط تأثیر بالایی بر عملکرد ضدعفونی‌کننده‌ها دارند (Tabandeh and Akhlaghi, 2007). پژوهش حاضر نیز نشان داد که ترکیب گلوتارآلدهید و بنزآلکانیوم کلراید در غلظت‌های مورد استفاده به‌خوبی قادر به مهار رشد باکتری *اس. اینیایی* می‌باشد (شوری ppt ۰)؛ لیکن با بالارفتن میزان شوری عملکرد ضدعفونی‌کننده به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد.

phadee و Areechon (۱۹۹۷) اثر دو ضدعفونی کننده بنزآلکانیوم کلراید و گلوتارآلدهید را جداگانه و در ترکیب با هم (نسبت ۴ به ۱) بر گونه‌های *ویبریو* از جمله *و. هاروئی* در شوری‌های مختلف مطالعه کردند. بر اساس یافته‌های آنها، حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) ترکیبات مورد مطالعه به‌ترتیب ppm ۱۲۸-۳۲، ۶۴-۱۶ و ۳۲-۸ به‌دست آمد. بهترین عملکرد ضدعفونی‌کننده‌ها در شوری ppt ۵ بود و با افزایش شوری (ppt ۴۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰) عملکرد هر سه ضدعفونی‌کننده کاهش یافت (Phadee and Areechon, 1997) که نتایج این تحقیق با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

گلوتارآلدهید و بنزآلکانیوم کلراید دو ضدعفونی‌کننده مناسب برای استفاده در هچری‌ها و ضدعفونی تخم مطرح هستند (Jantrakajorn and Wongtavatchai, 2015). در پژوهش حاضر نیز ضدعفونی‌کننده ریموو عملکرد مناسبی علیه قارچ *ساپرولگنیا* (یکی از عوامل اصلی آلوده کننده تخم ماهی)، داشت.

Liltved و همکاران (۱۹۹۳) اثر اوزون و اشعه UV را بر پاتوژن‌های باکتریایی و ویروسی ماهی در آب با شوری‌های مختلف بررسی کردند. در این مطالعه شوری آب اثری بر کارآیی روش‌های ضدعفونی مورد استفاده نداشت، لیکن دزهای بالاتری از اشعه UV برای از بین بردن ویروس IPN مورد نیاز بود (Liltved *et al*., 1995). در مطالعه Chan و Killick (۱۹۹۴) تأثیر شوری، نور و دما بر میزان باکتری *اشریشیا کلی* بعد از مواجهه با اشعه UV بررسی شد. آنها نتیجه‌گیری کردند که میزان دما و درجه شوری آب بر از بین بردن باکتری *اشریشیا کلی* با اشعه UV موثر است (Chan and Killick, 1995). Li و همکاران (۲۰۰۲) از یک ضدعفونی‌کننده الکتروشیمیایی برای ضدعفونی‌کردن ضایعات آب شور استفاده کردند و نتایج موفقیت‌آمیزی در از بین بردن کلی‌فرم‌ها مشاهده کردند (Li *et al*., 2002; Ganzi *et al*., 2019). از آنجایی که باکتری *ای. کولای* به عنوان یک عامل بیماری‌زا در آبزیان مطرح نمی‌باشد، در مطالعه حاضر از این میکروارگانیسم استفاده نشد. لیکن نگاه کلی به نتایج نشان می‌دهد که در مطالعه ما نیز با افزایش میزان شوری عملکرد ضدعفونی کننده مورد مطالعه کاهش یافت به‌گونه‌ای که در شوری ppt ۴۰، غلظت‌های مورد استفاده ضدعفونی کننده تأثیر قابل توجهی بر میزان باکتری *و. هاروئی* در مقایسه با غلظت اولیه باکتری نداشت و افزایش زمان مواجهه و غلظت ضدعفونی‌کننده نیز نتوانستند این کاهش عملکرد را جبران نمایند. این امر نشان می‌دهد که املاح موجود در آب می‌توانند با ترکیبات ضدعفونی کننده واکنش و عملکرد ضدعفونی کننده را کاهش دهند.

Day و همکاران (۲۰۰۹) اثر آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بنزآلکانیوم کلراید را بر گونه‌های *فوزاریوم* و *آسپرژیلوس* جدا شده از موارد کراتیت انسانی مطالعه و مشاهده کردند که بنزالکانیوم کلراید با کمترین میزان غلظت ممانعت از رشد، دارای اثر قارچ‌کشی قوی علیه گونه‌های *فوزاریوم* و *آسپرژیلوس* است (Day *et al*., 2009). علاوه بر این، Stupur و همکاران (۲۰۱۴) تأثیر بنزآلکانیوم کلراید (محلول ۱۰٪ حجمی/حجمی) و برخی اسانس‌ها را بر گونه‌های *آسپرژیلوس* از جمله *آ. نایجر* و سایر قارچ‌ها بررسی کردند و در مطالعه آنها نیز بنزآلکانیوم کلراید دارای بیشترین خاصیت قارچ‌کشی بود (Stupar *et al*., 2014). در مطالعه حاضر نیز بنزآلکانیوم کلراید در ترکیب با گلوتارآلدهید در شوری ppt ۰، اثر قارچ‌کشی مناسبی علیه دو قارچ *ف. اکسیسپوروم* و *آ. نایجر* داشت و در

شوری‌های بالاتر (ppt ۴۰ و ۲۰) نیز اگرچه میزان کاهش جمعیت قارچ‌ها کم‌تر بود، لیکن باز هم در میزان CFU، کاهش قابل توجهی نسبت به مقدار اولیه تلقیح مشاهده شد.

بر اساس مطالعات مختلف، با افزایش غلظت ضدعفونی کننده زمان مواجهه کاهش می‌یابد (Ashworth *et al*., 2001). در مطالعه حاضر بیشترین تأثیر ضدعفونی کننده در مدت زمان min ۲۰ مشاهده گردید و افزایش زمان مواجهه به min ۴۰ تأثیری بر عملکرد ضدمیکربی ریموو نداشت که این مسئله می‌تواند به پایداری ضدعفونی‌کننده در محیط مربوط باشد که با گذشت زمان ترکیبات تجزیه شده و خاصیت اولیه را نخواهند داشت. علاوه بر این، بر اساس نتایج مطالعه حاضر، افزایش غلظت ضدعفونی کننده نیز اثر چندانی بر افزایش عملکرد ضدمیکربی ریموو در شوری‌های مختلف نخواهد داشت. از آنجایی که غلظت‌های انتخابی براساس دستورالعمل شرکت سازنده انتخاب شده بودند و میزان LD_{50} این ضدعفونی کننده حدود ppm ۱۳۴ برآورد شده است، می‌توان در آینده غلظت‌های بالاتری از ضدعفونی‌کننده ریموو را نیز آزمایش نمود تا عملکرد غلظت‌های بالاتر و تأثیر شرایط مختلف آب بر این ترکیب سنجیده شود.

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که ضد عفونی‌کننده ریموو در شوری ppt ۰ عملکرد بسیار خوبی علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه مربوط به آبزیان دارد. ولی با افزایش میزان شوری، عملکرد ضدعفونی‌کننده کاهش می‌یابد و افزایش غلظت و زمان مواجهه تأثیر چندانی بر بهبود عملکرد ضدعفونی کننده ندارند. برای بروز بیماری در آبزیان تراکم (میزان) میکروارگانیسم‌ها در آب اهمیت دارد. بنابراین، با توجه به نتایج مطالعه حاضر، می‌توان از این ضدعفونی کننده برای کم‌کردن جمعیت میکروارگانیسم‌ها در آبهای شور استفاده کرد، لیکن این کاهش جمعیت به تنهایی مؤثر نخواهد بود و لازم است در کنار استفاده از این ضدعفونی‌کننده، سایر برنامه‌های کنترلی مانند استفاده از اوزون یا اشعه UV یا روش‌های فیزیکی مانند فیلتراسیون را نیز در نظر گرفت. شایان ذکر است، در ماهیانی با اوزان بالاتر که مقاومت بیشتری نسبت به بیماری‌ها دارند، استفاده از این ضدعفونی کننده در آب شور نیز احتمالاً برای کنترل بیماری‌ها مؤثر واقع گردد. علاوه بر این، برای درک بهتر تأثیر شوری و سایر مواد آلی و غیرآلی موجود بر آب بر عملکرد ضدعفونی کننده می‌بایست مطالعات بیشتری با غلظت‌های بالاتر ضدعفونی‌کننده و نیز در شرایط *in vivo* صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهش و فناوری دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و شرکت توسعه آبزیان کاسپین نیل جهت حمایت مالی این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

حسن خانی، م.، هدایتی، س. ع. ا.، مازندرانی، م.، باقری، ط. و جافر نوده، ع. ۲۰۲۰. تاثیر متقابل سطوح مختلف شوری و مواجهه با آفت‌کش کلرپیریفوس بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم و موکوس ماهی کپور معمولی (*Cyprinu carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۹(۲): ۴۴-۳۷. DOI: 10.22092/ISFJ.2020.121671

Abdelaziz, A., Sonbol, F., Elbanna, T. and EL-Ekhnawy, E., 2019. Exposure to sublethal concentrations of benzalkonium chloride induces antimicrobial resistance and cellular changes in Klebsiellae pneumoniae clinical isolates. *Microbial Drug Resistance*, 25(5): 631-638. DOI:10.1089/mdr.2018.0235.

Ashworth, D., Benz, A. and Zeller, D., 2001. Reducing the level of bacteria and viruses in aquaculture. US Application US20050145564A1.

Assefa, A. and Abunna, F., 2018. Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Veterinary Medicine International*, 10: 1-10. DOI: 10.1155/2018/5432497

Ataimehr, B., Mojazi Amiri, B., Mirvaghefi, A., Nezami, S. and Riazi, G., 2010. Effect of different salinity on ions, osmolarity, water concentration of body tissue, gill chloride cells and mortality percentage of juveniles of Caspian roach (Rutilus frisii kutum Kamensky 1901). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 19(2): 115-130. DOI: 10.22092/isfj.2017.109947

Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2): 71-79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005

Chan, Y. and Killick, E., 1995. The effect of salinity, light and temperature in a disposal environment on the recovery of *E. coli* following exposure to ultraviolet radiation. *Water Research*, 29, 1373-1377. DOI: 10.1016/0043-1354(94)00226-W

Close, J., Ip, J. and Lam, K.H., 2006. Water recycling with PV-powered UV-LED disinfection. *Renewable Energy*, 31(11): 1657-1664. DOI: 10.1016/j.renene.2005.08.034

Danner, G.R. and Merrill, P., 2006. Disinfectants, disinfection and biosecurity in aquaculture. Aquaculture biosecurity: Prevention, control, and eradication of aquatic animal disease**,** Blackwell, London, UK, 91-128. DOI:10.1002/9780470376850

Day, S., Lalitha, P., Haug, S., Fothergill, A.W., Cevallos, V., Vijayakumar, R., Prajna, N.V., Acharya, N.R., Mcleod, S.D. and Lietman, T.M., 2009. Activity of antibiotics against *Fusarium* and *Aspergillus*. *British Journal of Ophthalmology*, 93(1): 116-119. DOI: 10.1136/bjo.2008.142364

De Schryver, P. and Vadstein, O., 2014. Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *The ISME Journal*, 8(12): 2360-2368. DOI: 10.1038/ismej.2014.84

Dewulf, J. and Van Immerseel, F., 2019. Biosecurity in Animal Production and Veterinary Medicine. CABI, Boston, USA.500P . DOI:10.1038/ismej.2014.84

Ganzi, G. C., Griffis, J., Dukes, S., Liang, L.-S., Dale, D. A., Shaw, M., Beddoes, P. and Gu, G., 2019. Treatment of saline water for agricultural and potable use and for generation of disinfectant solution. Google Patents.

Grasteau, A., Guiraud, T., Daniel, P., Calvez, S., Chesneau, V. and Le Hénaff, M., 2015. Evaluation of glutaraldehyde, chloramine-T, Bronopol, Incimaxx Aquatic® and hydrogen peroxide as biocides against *Flavobacterium psychrophilum* for sanitization of rainbow trout eyed eggs. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 6(382): 10.4172. DOI: 10.4172/2155-9546.1000382

Huyben, D., Bevan, D., Stevenson, R., Zhou, H. and Moccia, R., 2018. Evaluation of membrane filtration and UV irradiation to control bacterial loads in recirculation aquaculture systems. *Aquaculture International*, 26 (6): 1531-1540. DOI:10.1007/s10499-018-0301-z

Ismail, T., Laban, S., El-kabany, N. and Badawy, M., 2017. Efficacy of some disinfection methods on the microbial load of eggs and equipment of tilapia hatchery. *Veterinary Medical Journal (Giza):* 63(4): 25-31. DOI: 10.21608/vmjg.2017.7646

Jantrakajorn, S. and Wongtavatchai, J., 2015. Egg surface decontamination with bronopol increases larval survival of Nile tilapia, Oreochromis niloticus. *Czech Journal of Animal Science*, 60(10): 436-442. DOI: 10.17221/8523-CJAS

Jia, B., St-Hilaire, S., Singh, K. and Gardner, I.A., 2017. Biosecurity knowledge, attitudes and practices of farmers culturing yellow catfish (Pelteobagrus fulvidraco) in Guangdong and Zhejiang provinces, China. *Aquaculture*, 471, 146-156. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.01.016

Kasai, H., Yoshimizu, M. and Ezura, Y., 2002. Disinfection of water for aquaculture. *Fisheries Science*, 68 (sup1): 821-824. DOI: 10.2331/fishsci.68.sup1_821

Li, X.Y., Ding, F., Lo, P.S.Y. and Sin, S.H.P., 2002. Electrochemical disinfection of saline wastewater effluent. *Journal of Environmental Engineering*, 128(8): 697-704. DOI: 10.1061/(ASCE)0733-9372(2002)128:8(697)

Liltved, H., Hektoen, H. and Efraimsen, H., 1995. Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacultural Engineering*, 14(2): 107-122. DOI: 10.1016/0144-8609(94)P4430-J

Lin, W., Guan, X., Cao, J., Niu, B. and Chen, Q., 2017. Bactericidal mechanism of glutaraldehyde-didecyldimethylammonium bromide as a disinfectant against *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 122(3): 676-685. DOI: 10.1111/jam.13384

Liu, D., Pedersen, L.F., Straus, D.L., Kloas, W. and Meinelt, T., 2017. Alternative prophylaxis/disinfection in aquaculture-Adaptable stress induced by peracetic acid at low concentration and its application strategy in RAS. *Aquaculture*, 474: 82-85. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.03.027

Macchioni, F., Perrucci, S., Flamini, G., Cioni, P.L. and Morelli, I., 1999. Antimycotic activity against *Saprolegnia ferax* of extracts of *Artemisia verlotorum* and *Santolina etrusca*. *Phytotherapy Research*, 13(3): 242-244. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1573(199905)13:3<242::AID-PTR422>3.0.CO;2-3

Mainous, M.E., Smith, S.A. and Kuhn, D.D., 2010. Effect of common aquaculture chemicals against *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 22(4): 224-228. DOI: 10.1577/H10-020.1

Mainous, M.E., Kuhn, D.D. and Smith, S.A., 2012. Efficacy of common aquaculture compounds for disinfection of *Flavobacterium columnare* and F. psychrophilum. *Journal of Applied Aquaculture*, 24(3): 262-270. DOI: 10.1080/10454438.2012.708291

Middlemiss, K.L., Daniels, C.L., Urbina, M.A. and Wilson, R.W., 2015. Combined effects of UV irradiation, ozonation, and the probiotic *Bacillus* spp. on growth, survival, and general fitness in European lobster (Homarus gammarus). *Aquaculture*, 444: 99-107. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.03.028

Mon-On, N., Surachetpong, W., Mongkolsuk, S. and Sirikanchana, K., 2018. Roles of water quality and disinfectant application on inactivation of fish pathogenic *Streptococcus agalactiae* with povidone iodine, quaternary ammonium compounds and glutaraldehyde. *Journal of Fish Diseases*, 41(5): 783-789. DOI: 10.1111/jfd.12776

Shah, N. and Naseby, D.C., 2017. efficacy of benzalkonium chloride against bioluminescent *P. aeruginosa* ATCC9027 constructs. *Biosensors and Bioelectronics*, 97: 8-15. DOI: 10.1016/j.bios.2017.04.029

Phadee, P. and Areechon, N., 1997. Application of Benzalkonium Chloride, Glutaraldehyde and Their Mixture to Control *Vibrio spp.* and Their Toxicities in *Penaeus monodon* (Fabricius) Larvae. In Proceedings of the 35th Kasetsart University Annual Conference: Fisheries, Science, Engineering, Environmental Management, Home Economics, Education and Economics. Bangkok (Thailand): Ministry of University Affairs, Bangkok (Thailand). pp. 56-67

Rutala, W.A. and Weber, D.J., 2013. Disinfection and sterilization: an overview. *American Journal of Infection Control*, 41(5): S2-S5. DOI: 10.1016/j.ajic.2012.11.005

Stupar, M., Grbić, M.L., Džamić, A., Unković, N., Ristić, M., Jelikić, A. and Vukojević, J., 2014. Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. *South African Journal of Botany*, 93: 118-124. DOI: 10.1016/j.sajb.2014.03.016

Tabandeh, M.R. and Akhlaghi, M., 2007. Efficacy of conventional disinfectants on isolated *Streptococcus iniae* from diseased rainbow trout in laboratory and culture tank conditions. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 16(3): 29-38. DOI: 10.22092/isfj.2007.115049

Vikram, A., Bomberger, J.M. and Bibby, K.J., 2015. Efflux as a glutaraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59 (6): 3433-3440. DOI: 10.1128/AAC.05152-14.

Villar-Navarro, E., Levchuk, I., Rueda-Márquez, J.J. and Manzano, M., 2019. Combination of solar disinfection (SODIS) with H2O2 for enhanced disinfection of marine aquaculture effluents. *Solar Energy*, 177: 144-154. DOI: 10.1016/j.solener.2018.11.018.

In vitro evaluation of antimicrobial activity of Benzalkonium chloride and Glutaraldehyde combination (REMOVE) on waters with different salinities

Nikaein D.[1&2*]; Erfanmanesh A.[3]; Reza Mardanpour R.[1&2]

[*]dnikaein@ut.ac.ir

1-Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

2-Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3-Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR): Tehran Organization, Tehran, Iran

Abstract

The stability of disinfectants in water is one of the desirable features of these compounds. The physicochemical conditions of water, such as hardness, pH, salinity, and etc., can affect the performance of disinfectants. The present study was designed to evaluate the effect of different water salinities on the antimicrobial properties of commercial REMOVE disinfectant (combination of benzalkenium chloride and glutaraldehyde) against some true and opportunistic pathogenic microorganisms of fish. First, four bacterial strains including *Streptococcus iniae*, *Aeromonas Salmonisida*, *Vibrio Harveyi*, and *Streptococcus agalactiae*, and three fungi including *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, and *Saprolgenia* spp. were selected and cultured on appropriate condition. Then, 1-3$\times 10^6$ dilutions of each microorganism were prepared and REMOVE activity was evaluated (in two concentrations of 20 ppm and 10 ppm) in different salinity concentrations (0, 20, 40 ppt) in two time periods of 20 and 40 min. The viability of the studied microorganisms was assessed by disc diffusion and in a liquid medium under laboratory conditions. There was no significant differences in viability of studied microorganisms between the two concentrations of 10 and 20 ppm in different salinities ($p>0.05$). However, increasing the salinity to 20 and 40 ppt had a significant effect on the viability of the microorganisms in comparison with 0 ppt salinity ($p<0.05$). At 40 ppt concentrations, the highest amount of CFU/ml was observed in *V. harveyi*. Although disinfectant is able to reduce the population of microorganisms in different salinities, however this reduction is not very effective compared to 0 ppt concentration. Therefore, based on the results of the present study, it is possible that this disinfectant can be used to reduce the population of microbes in salty waters, but this reduction in practice alone will not be effective enough and requires the use of other controlling programs besides.

Keywords: Antimicrobial activity, Salinity, Remove disinfectant, Benzalkonium chloride, Glutaraldehyde

[*]Corresponding author