

## مقاله علمی - پژوهشی:

## ارزیابی برون‌تنی فعالیت ضد میکروبی ترکیب بنز آلکانیوم کلراید و گلو تار آلدهید (REMOVE) بر آبهای با شوری متفاوت

دنیا نیک آئین\*<sup>۱</sup>، احمد عرفان منش<sup>۳</sup>، رضا مردانپور<sup>۱</sup>

\*dnikaein@ut.ac.ir

۱ - گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، 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 پذیرش: تیر ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۸

### چکیده

پایداری ضد عفونی کننده‌ها در آب یکی از ویژگی‌های مطلوب این ترکیبات محسوب می‌شود. شرایط فیزیکی و شیمیایی آب مانند سختی، pH، شوری و ... می‌تواند بر عملکرد ضد عفونی کننده‌ها تأثیر بگذارد. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر شوری‌های مختلف آب بر خاصیت ضد میکروبی ضد عفونی کننده تجاری REMOVE (ترکیب بنز آلکانیوم کلراید و گلو تار آلدهید) علیه برخی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای حقیقی و فرصت طلب آبزیان طراحی و اجرا گردید. ابتدا چهار باکتری / استرپتوکوکوس اینیایی، آئروموناس سالمونیسیدا، ویبریو هاروئی و استرپتوکوکوس آگالاکتیه و سه قارچ آسپرژیلوس نایجر، فوزاریوم اوکسیسپوروم و جنس ساپروولگنیا انتخاب و در شرایط مناسب دمایی در محیط مناسب کشت داده شدند. سپس رقت‌های  $10^6 \times 3-1$  از هر میکروارگانیسم تهیه شد و عملکرد ضد عفونی کننده REMOVE (در دو غلظت ۲۰ و ۱۰ ppm) در غلظت‌های مختلف شوری (۰، ۲۰، ۴۰ ppt) در دو بازه زمانی ۴۰ و ۲۰ min بر ماندگاری میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به دو روش انتشار دیسک و در محیط مایع در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی گردید. بین دو غلظت ۲۰ و ۱۰ ppm ضد عفونی کننده در شوری‌های مختلف، اختلاف آماری معنی‌داری بر شمارش میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه مشاهده نگردید ( $p > 0.05$ ). لیکن افزایش میزان شوری به ۴۰ و ۲۰ ppt، تأثیر معنی‌داری بر ماندگاری جمعیت میکروارگانیسم‌ها در مقایسه با شوری ۰ ppt داشت ( $p < 0.05$ ). در غلظت ۴۰ ppt، بیشترین مقدار CFU/ml مربوط به باکتری و. هاروئی بود. گرچه در شرایط شوری نیز ضد عفونی کننده قادر به کاهش جمعیت میکروارگانیسم‌ها می‌باشد، لیکن در مقایسه با غلظت ۰ ppt این کاهش چندان مؤثر نخواهد بود. بنابراین، بر اساس نتایج مطالعه حاضر، احتمالاً می‌توان از این ضد عفونی کننده 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 ضد میکروبی، شوری، ضد عفونی کننده ریموو، بنز آلکانیوم کلراید، گلو تار آلدهید

\*نویسنده مسئول

## مقدمه

منابع آبی، یکی از راه‌های مهم ورود و انتشار عوامل عفونی در آبی‌پروری هستند (Kasai *et al.*, 2002; Villar-Navarro *et al.*, 2019) به طوری که منبع آبی فاقد عوامل بیماری‌زا یک اصل مهم در موفقیت آبی‌پروری می‌باشد (Middlemiss *et al.*, 2015). از آنجایی که در سیستم‌های آبی‌پروری 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<sup>1</sup> یکی از روش‌های معمول کنترل و پیش‌گیری از بیماری‌ها در آبی‌پروری 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, 2017; Jia *et al.*, 2012; Mainous *et al.*, 2006). اصول کلی ضدعفونی در آبی‌پروری استفاده از ترکیبات شیمیایی با غلظت و به مدت مناسب برای از بین بردن تمامی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زاست (Ismail *et al.*, 2017). در سیستم‌های آبی‌پروری، 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 ضدعفونی‌کننده 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). گلوئارآلدهید 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.*, 2017; Lin *et al.*, 2015). این ترکیب با اتصال پروتئین‌ها و لیپیدهای سطح غشاء خارجی سلول‌ها عمل می‌کند (Vikram *et al.*, 2015). بنزالکانیوم کلراید یکی از ترکیبات چهارتایی آمونیوم بر پایه نیتروژن است که طیف ضد میکروبی 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. ضدعفونی‌کننده تجاری ریموو (DT REMOVE 180، ساخت کشور ایتالیا) حاوی گلوئارآلدهید و بنزالکانیوم 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، پروتوزواها و نیز اسپور قارچ‌ها و باکتری‌ها مؤثر می‌باشد. از این ضدعفونی‌کننده 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 ضدعفونی‌کننده ترکیب بنزالکانیوم کلراید و گلوئارآلدهید با نام تجاری ریموو بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای ماهی (قارچ و باکتری) در آبهای با شوری متفاوت طراحی و اجرا گردید.

<sup>1</sup> Disinfection

**مواد و روش کار****تهیه ضد عفونی کننده**

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

**تهیه میکروارگانیسم‌ها**

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر، شامل استرپتوکوکوس اینیایی، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، آئروموناس سالمونیسیدا، ویبریو هاروئی، اسپیریلیوس نایجر (ATCC:1004)، فوزاریوم اکسیسپوروم (PTCC:5115) و جنس ساپروولگنیا 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 ساپورو دکستروز براث (SB) برای کشت سویه‌های قارچی استفاده گردید. تمامی سویه‌ها پس از تلقیح در محیط‌های کشت مذکور، به مدت ۲۴-۴۸ 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 به دست آمد (Ataimehr et al., 2010). تمامی آنها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ min اتوکلاو گردیدند و در ظروف شیشه‌ای با حجم ۵۰۰ ml تقسیم شدند.

**بررسی خاصیت ضد میکروبی ضد عفونی کننده 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 مولر هینتون 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 ضد میکروبی****ضد عفونی کننده**

برای بررسی خاصیت ضد میکروبی ریموو بر باکتری‌ها از روش Mon-On و همکاران (۲۰۱۸) با کمی تغییرات استفاده شد. برای بررسی تأثیر ریموو بر قارچ‌های مورد مطالعه برای ساپروولگنیا از روش Macchioni و همکاران (۱۹۹۹) و برای گونه‌های فوزاریوم و اسپرژیلوس 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  $10^6 \times 3-1$  cells/ml تنظیم گردید. سپس میزان ۱ ml از سوسپانسیون باکتری یا قارچ به هر یک از تیمارهای آب افزوده شد. ضد عفونی کننده ریموو به میزان ppm ۲۰ و

### بررسی تأثیر شوری بر خاصیت ضد میکروبی ضد عفونی کننده

نتایج مربوط به اثر ضد عفونی کننده ریموو در دو غلظت ۲۰ و ۴۰ ppm، در دو بازه زمانی ۱۰ و ۲۰ min بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در جداول ۱ و ۲ ارائه شده است. در بازه زمانی ۲۰ min، غلظت ۲۰ ppm ریموو در مقایسه با غلظت ۱۰ ppm ضد عفونی کننده تنها در شوری ۲۰ ppt، اختلاف آماری معنی داری در CFU ی آ. نایجر و ف. اکسیسپوروم در مقایسه با مقدار اولیه میکروارگانیسم نشان داد ( $p < 0.05$ ) و در سایر شوری‌ها افزایش غلظت ضد عفونی کننده تأثیر معنی داری بر CFU میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بعد از ۲۰ min مواجهه نداشت ( $p > 0.05$ ). مقادیر ۴۰ و ۲۰ ppt شوری به جز در مورد اس. اینیایی، در هر دو غلظت مورد استفاده ریموو، توانسته بودند تأثیر معنی داری بر جمعیت میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در مقایسه با شوری ۰ ppt در مدت زمان ۲۰ min مواجهه بگذارند ( $p < 0.05$ ). در بازه زمانی ۴۰ min، مقایسه تأثیر غلظت ضد عفونی کننده بر جمعیت میکروارگانیسم‌ها در شوری‌های مختلف نشان داد که تنها در شوری ۴۰ و ۲۰ ppt، در مورد و. هاروئی و شوری ۰ ppt در مورد ف. اکسیسپوروم، اختلاف آماری معنی داری بین غلظت ۲۰ ppm و ۱۰ ppm در کاهش جمعیت میکروبی وجود دارد ( $p < 0.05$ ). در مدت زمان ۴۰ min مواجهه نیز غلظت‌های مختلف شوری توانسته بودند در مقادیر ۲۰ و ۱۰ ppm ریموو به طور معنی داری جمعیت میکروارگانیسم‌ها را به جز در اس. اینیایی (شوری ۲۰ ppt) و ف. اکسیسپوروم (شوری ۴۰ و ۲۰ ppt) در مقایسه با شوری ۰ ppt افزایش دهند ( $p < 0.05$ ). 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 ضد عفونی کننده ریموو در مدت ۲۰ min مواجهه بوده است و بعد از آن اختلاف آماری معنی داری بین Log جمعیت میکروارگانیسم‌ها مشاهده نمی‌شود ( $p > 0.05$ ). علاوه بر این، در شوری‌های ۴۰ و ۲۰ ppt نیز ترکیب ضد عفونی کننده توانسته است جمعیت میکروبی را در مقایسه با زمان صفر به میزان قابل توجهی کاهش دهد.

۱۰ و برای زمان‌های ۴۰ و ۲۰ min 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 ۰/۵ ml 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 ۳۰-۳۰۰ 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 نرم‌افزار 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 معنی دار در نظر گرفته شد. داده‌ها به صورت  $\pm SE$  میانگین ارائه شده‌اند.

### نتایج

#### بررسی خاصیت ضد میکروبی ضد عفونی کننده به روش انتشار دیسک

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

جدول ۱: نتایج تأثیر شوری‌های مختلف آب بر میزان (CFU/ml) میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه پس از ۲۰ دقیقه مواجهه با ضدعفونی کننده ریموو (۲۰ و ۱۰ ppm 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)**

ppm (CFU/ml)۲۰			ppm (CFU/ml)۱۰			میکروارگانیسم
ppt۴۰	ppt۲۰	ppt۰	ppt۴۰	ppt۲۰	ppt۰	
۱۰.۳±۳۹۶/۹×۵/۵ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۱۷/۳۲×۸/۹ <sup>ab</sup>	۶/۶±۳/۳۳ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۴۹۶×۷ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۷۵/۸×۱/۱ <sup>b</sup>	۸/۷۵±۵ <sup>a*</sup>	<i>Streptococcus iniae</i>
۱۰.۳±۹۹۸/۷×۶/۶ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۱۱/۵۵×۳/۳ <sup>b</sup>	۵/۳±۰/۶۶ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۱۲۴۸/۴×۸/۳ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۶/۲۵×۳/۷ <sup>b</sup>	۵±۱/۲۵ <sup>a</sup>	<i>S. agalactiae</i>
۱۰.۳±۱۷۷۷/۶×۷/۸۵ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۴۳/۷۲×۳/۵	۲/۶±۰/۶۶ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۲۲۲۲×۹/۸ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۳۱/۲۵×۴ <sup>b</sup>	۳/۷۵±۰/۶۶ <sup>a</sup>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
۱۰.۳±۴۷۷×۱/۳ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۳۹/۳×۵/۷ <sup>b</sup>	۴/۶±۱/۳ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۵۹۶/۲×۱/۷ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۱۶/۵۳×۸ <sup>b</sup>	۸/۷۵±۲/۵ <sup>a</sup>	<i>Vibrio harveyi</i>
۱۰.۳±۹۹۹×۳/۶ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۳۵/۱۲×۶/۵ <sup>b</sup>	۲۰±۲/۰۲ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۱۲۴۸/۴×۴/۵ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۵۷/۳×۹/۴ <sup>b</sup>	۲۵±۴/۵ <sup>a</sup>	<i>Saprolegnia spp</i>
۱۰.۳±۱۷۳/۲×۴/۳ <sup>d</sup>	۱۰.۳±۴۲/۵۶×۹/۳ <sup>b</sup>	۳۷/۶±۳/۸۴ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۲۱۶/۵×۵/۴ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۸۱/۲۵×۱/۳ <sup>b</sup>	۳/۲±۴/۷ <sup>a</sup>	<i>Aspergillus niger</i>
۱۰.۳±۱۳۸۹/۲×۶/۱ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۳۵/۱۲×۹ <sup>d</sup>	۳۸±۷/۲۳ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۱۷۳۶/۵×۷/۶ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۲۲/۵×۱/۴ <sup>b</sup>	۳/۸±۵ <sup>a</sup>	<i>Fusarium Oxysporum</i>

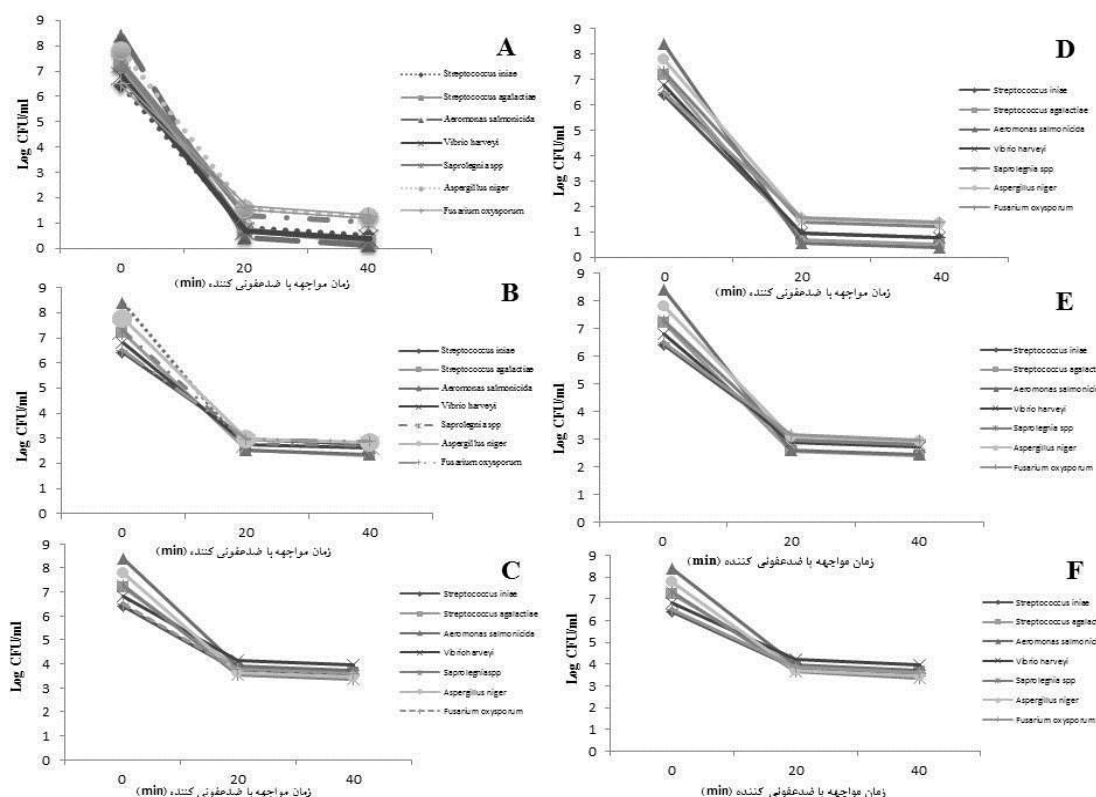
\*حروف متفاوت در هر ردیف صرف نظر از غلظت ضدعفونی کننده، نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار بین گروه‌هاست (p<۰/۰۵). مقایسه معنی داری بین هر دو غلظت ۲۰ ppm و ۱۰ ریموو و شوری‌های مختلف آب صورت گرفته است. به عنوان مثال در مورد باکتری اس/اینیایی، میزان CFU این باکتری در شوری ۰ ppt و غلظت ۱۰ ppm با شوری ۱۰ ppt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

ppm (CFU/ml)۲۰			ppm (CFU/ml)۱۰			میکروارگانیسم
ppt۴۰	ppt۲۰	ppt۰	ppt۴۰	ppt۲۰	ppt۰	
۱۰.۳±۲۶۴×۳/۷ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۴۰/۴×۵/۹ <sup>ab</sup>	۳/۳±۳/۳ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۳۳۰/۷×۴/۶ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۵۰/۵×۷/۳ <sup>b</sup>	۵/۸±۳/۳ <sup>a</sup>	<i>Streptococcus iniae</i>
۱۰.۳±۶۶۵/۸×۴/۴ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۳/۳×۱/۹ <sup>b</sup>	۱/۶۷±۰/۸ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۸۳۲/۳×۵/۵ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۴/۱×۲/۴ <sup>b</sup>	۳/۳±۰/۸ <sup>a</sup>	<i>S. agalactiae</i>
۱۰.۳±۱۱۸۵×۵/۳ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۱۶/۶×۲/۱ <sup>b</sup>	۱/۳۳±۰/۳ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۱۴۸۱×۶/۵ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۲۰/۸×۲/۷ <sup>b</sup>	۲/۵±۰ <sup>a</sup>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
۱۰.۳±۳۱۷/۹×۹ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۸/۸×۴/۳ <sup>d</sup>	۲/۳۳±۰/۶ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۳۹۷/۵×۱/۱ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۱۱/۰×۵/۳ <sup>b</sup>	۵/۸±۱/۶ <sup>a</sup>	<i>Vibrio harveyi</i>
۱۰.۳±۶۶۵/۸×۲/۴ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۳۰/۵×۵ <sup>b</sup>	۱۰/۳۳±۰/۸ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۸۳۲/۳×۳ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۳۸/۱×۶/۳ <sup>b</sup>	۱۶/۶±۳ <sup>a</sup>	<i>Saprolegnia spp</i>
۱۰.۳±۱۱۵×۲/۹ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۴۳×۶/۷۳ <sup>b</sup>	۱۷±۲/۵ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۱۴۴/۳×۳/۶ <sup>c</sup>	۱۰.۳±۵۴/۱×۸/۴ <sup>b</sup>	۲۱/۲۵±۳/۱ <sup>a</sup>	<i>Aspergillus niger</i>
۱۰.۳±۹۲۶×۴/۱ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۱۲×۷/۵۶ <sup>ab</sup>	۱۷/۶۷±۴/۹ <sup>b</sup>	۱۰.۳±۱۱۵۷×۵/۱ <sup>a</sup>	۱۰.۳±۱۵/۰×۹/۴ <sup>a</sup>	۲۵/۸±۳/۳ <sup>a</sup>	<i>Fusarium Oxysporum</i>

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



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

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

مطالعات زیادی بر تأثیر شوری‌های مختلف آب بر خاصیت ضد میکروبی ترکیبات ضدعفونی کننده در آبزیان در ایران و جهان انجام نشده است. در مطالعه حاضر، ریموو در شوری ۰ ppt در هر دو بازه زمانی بیشترین تأثیر را بر باکتری‌های *اس. سالمونیسیدا* و *قارچ آ. نارویجی* و کمترین تأثیر را بر باکتری‌های *اس. اینیایی* و *هاروئی* و *قارچ ساپروگلنیا* داشت. این اختلاف در اثر می‌تواند به علت مثبت بودن باکتری *اس. اینیایی* و دیواره سلولزی *قارچ ساپروگلنیا* باشد. اما در مورد باکتری *و. هاروئی* نیاز به مطالعات بیشتری در خصوص مکانیسم عمل این ضدعفونی کننده است.

## 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 کارایی ضدعفونی کننده‌ها 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

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 ضدعفونی کردن 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 ضدعفونی‌کننده مورد مطالعه کاهش یافت به‌گونه‌ای که در شوری ۴۰ ppt، غلظت‌های مورد استفاده ضدعفونی‌کننده 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 ضدعفونی‌کننده واکنش و عملکرد ضدعفونی‌کننده را کاهش دهند.

Day و همکاران (۲۰۰۹) اثر آنتی‌بیوتیک‌ها از جمله بنزالکانیوم 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 بنزالکانیوم 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 بنزالکانیوم کلراید دارای بیشترین خاصیت قارچ‌کشی بود (Stupar *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر نیز بنزالکانیوم کلراید در ترکیب با گلوآرالدهید در شوری ۰ ppt، اثر قارچ‌کشی مناسبی علیه دو قارچ *ف. اکسیسپوروم* و *آ. نایجر* داشت و در

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 گلوآرالدهید و بنزالکانیوم کلراید در غلظت‌های مورد استفاده به‌خوبی قادر به مهار رشد باکتری اس. اینیایی می‌باشد (شوری ۰ ppt)؛ لیکن با بالا رفتن میزان شوری عملکرد ضدعفونی‌کننده به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد.

phadee و Areechon (۱۹۹۷) اثر دو ضدعفونی‌کننده بنزالکانیوم کلراید و گلوآرالدهید 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 به ترتیب ۱۲۸-۳۲، ۶۴-۱۶ و ۳۲-۸ به دست آمد. بهترین عملکرد ضدعفونی‌کننده‌ها در شوری ۵ ppt بود و با افزایش شوری (۲۰، ۳۰، ۴۰ ppt) عملکرد هر سه ضدعفونی‌کننده کاهش یافت (Phadee and Areechon, 1997) که نتایج این تحقیق با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

گلوآرالدهید و بنزالکانیوم 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 ساپروولگنیا (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 کارایی روش‌های ضدعفونی مورد استفاده نداشت، لیکن دزهای بالاتری از اشعه UV برای از بین بردن ویروس

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 ضد عفونی کننده می‌بایست مطالعات بیشتری با غلظت‌های بالاتر ضد عفونی کننده 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 آبیان 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. تأثیر متقابل سطوح مختلف شوری و مواجهه با آفت‌کش کلرپیرفوس بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم و موکوس ماهی کپور معمولی (*Cyprinu carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۹(۲): ۳۷-۴۴. 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.

شوری‌های بالاتر (۴۰ و ۲۰ ppt) 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 ضد عفونی کننده زمان مواجهه کاهش می‌یابد (Ashworth *et al.*, 2001). در مطالعه حاضر بیشترین تأثیر ضد عفونی کننده در مدت زمان ۲۰ min مشاهده گردید و افزایش زمان مواجهه به ۴۰ min تأثیری بر عملکرد ضد میکروبی ریموو نداشت که این مسئله می‌تواند به پایداری ضد عفونی کننده 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 ضد عفونی کننده نیز اثر چندانی بر افزایش عملکرد ضد میکروبی ریموو در شوری‌های مختلف نخواهد داشت. از آنجایی که غلظت‌های انتخابی بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انتخاب شده بودند و میزان LD<sub>50</sub> این ضد عفونی کننده حدود ۱۳۴ ppm برآورد شده است، می‌توان در آینده غلظت‌های بالاتری از ضد عفونی کننده 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 عفونی کننده ریموو در شوری ۰ ppt عملکرد بسیار خوبی علیه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه مربوط به آبیان دارد. ولی با افزایش میزان شوری، عملکرد ضد عفونی کننده کاهش می‌یابد و افزایش غلظت و زمان مواجهه تأثیر چندانی بر بهبود عملکرد ضد عفونی کننده ندارند. برای بروز بیماری در آبیان تراکم (میزان) میکروارگانیسم‌ها در آب اهمیت دارد. بنابراین، با توجه به نتایج مطالعه حاضر، می‌توان از این ضد عفونی کننده برای کم کردن جمعیت میکروارگانیسم‌ها در آبهای شور استفاده کرد، لیکن این کاهش جمعیت به تنهایی مؤثر نخواهد بود و لازم است در کنار استفاده از این ضد عفونی کننده، 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 ضد عفونی کننده در آب



- 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 Riaz, 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 Ibsouda, 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 Efraimssen, 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-didecyltrimethylammonium 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.<sup>1&2\*</sup>; Erfanmanesh A.<sup>3</sup>; Reza Mardanpour R.<sup>1&2</sup>

\*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 benzalkonium 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 *Saprologenia* 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