

مقایسه تأثیر محلول کلوییدی نانونقره و بیوساید صنعتی E-265 بر تنفس و تشکیل بیوفیلم باکتریایی به روش میکروتیتراپلیت

سمانه شاهرخ^۱ گیتی امتیازی^۲

(دریافت ۸۹/۹/۱۰) پذیرش ۹۰/۸/۱۲

چکیده

نانوذرات نقره به دلیل خواص ضد میکروبی بی نظیر و سمیت کم نسبت به سلول‌های پستانداران به یکی از رایج‌ترین نانوذرات در محصولات مصرفی تبدیل گشته‌اند. امروزه در زمینه تصفیه آب از نانوذرات به منظور تشخیص و حذف مواد بیولوژیکی و شیمیایی استفاده می‌شود. بنابراین به دنبال استفاده روز افزون از نانوذرات، لازم است که مطالعات بیشتری در ارتباط با اثرات این ذرات صورت گیرد. در این تحقیق اثرات ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم محلول کلوییدی نانونقره (میانگین اندازه 40 ± 10 نانومتر) به روش میکروتیتراپلیت بر رشد، تنفس سلولی و تشکیل بیوفیلم سویه‌های پاتوژن و ایزوله‌های جداسازی شده (A_1 و A_2) از سیستم خنک کننده پالایشگاه نفت اصفهان با بیوساید E-265، مقایسه شد. نتایج نشان دادند که غلظت‌های مختلف بیوساید E-265 اثر ضد باکتریایی معنی‌داری بر رشد باکتری‌های مورد مطالعه نداشت و حتی در غلظت‌های ۲۰ ppm و ۴۰ ppm سبب افزایش صد درصدی تشکیل بیوفیلم در ایزوله A_1 شد. همچنین مشخص شد که غلظت‌های پایینی از نانونقره (۱-۲ ppm)، فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم بی نظیری نشان می‌دهند و بنابراین می‌توان آن را به عنوان یک بیوساید مناسب به منظور استفاده در سیستم‌های گردش آب پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات نقره، فعالیت ضد باکتریایی، فعالیت ضد بیوفیلم، میکروتیتراپلیت

A Comparative Study of the Effects of Colloidal Nanosilver and Industrial Biocide E-265 on Bacterial Respiration and Biofilm Formation Using Microtiterplate Method

Samaneh Shahrokh¹

Giti Emtiazi²

(Received Dec. 1, 2010 Accepted Nov. 3, 2011)

Abstract

Silver nanoparticles have become one of the most commonly used nanomaterials in consumer products because of their effective antimicrobial properties and low toxicity toward mammalian cells. In the area of water purification, today nanoparticles are widely used for detection and removal of chemical and biological substances. Therefore by the growing use of nanoparticles, further research is certainly needed to study the behavior of them. In this study, the antibacterial and antibiofilm activities of colloidal nanosilver (average size: 40 ± 10 nm) on the growth, cellular respiration and biofilm formation of pathogenic strains and the isolates from the cooling water of Isfahan Oil Refinery (A_1 and A_2) were compared with biocide E-265 which generally used in this refinery by microtiterplate method. The results showed that different concentration of biocide E-265 had no significant effects on the bacterial growth and even at 20 and 40 ppm showed 100% increase in the biofilm formation of the isolate A_1 . Also it is detected that low concentration of nanosilver (1-2 ppm) showed unique antibacterial and antibiofilm activities and can be suggested as a suitable biocide for the recirculating water systems.

Keywords: Silver Nanoparticles, Antibacterial Activity, Antibiofilm Activity, Microtiter Plate.

1. M.Sc. Student of Microbiology, Isfahan University, Isfahan, (Corresponding Author) 09130139120 s.shahrokh143@yahoo.com

2. Prof. of Biology, Faculty of Microbiology, Isfahan University, Isfahan

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، (نویسنده مسئول) s.shahrokh143@yahoo.com ۰۹۱۳۰۱۳۹۱۲۰

۲- استاد گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان

ویروس‌ها آسیب می‌رسانند مثل ZnO ، TiO_2 و فولرول^۵، آسیب به پوشش سلولی باکتریایی مثل پپتیدها، کیتوزان، کربوکسی فولرن^۶، نانولوله‌های کربنی، ZnO و نانوذرات نقره (nAg)، اختلال در انتقال انرژی مثل نانوذرات نقره (nAg) و نانوذرات فولرن آبی و جلوگیری از فعالیت آنزیم و سنتز DNA مثل کیتوزان است. اگرچه برخی از این نانومواد به‌عنوان عوامل ضد میکربی در محصولات مصرفی نظیر سیستم‌های خانگی تصفیه کننده آب استفاده شده‌اند، پتانسیل عفونت‌زدایی و کنترل میکربی آنها در سطح تیمار آب به‌طور دقیق ارزیابی نشده است. در میان همه نانومواد ضد میکربی، نانوذرات نقره (nAg) به‌صورت گسترده استفاده می‌شوند. این ذرات به‌عنوان عوامل ضد میکربی در بیش از ۱۰۰ محصول مصرفی از مکملهای غذایی گرفته تا پوشش دهندگان سطوح به‌کار رفته‌اند. گزارش شده که سیستم‌های خانگی تصفیه کننده آب که حاوی غشاها یا سطوح پوشش داده شده با نقره هستند قادر به حذف پاتوژن‌ها تا ۹۹/۹۹ درصد هستند [۳].

پالایشگاه نفت اصفهان یکی از کارخانجاتی است که دارای سیستم گردشی آب است. این پالایشگاه با مشکل بار میکربی بالا و مسائلی نظیر تشکیل بیوفیلم در نقاط مختلف سیستم و به‌خصوص در خنک‌کننده‌ها به‌ویژه خنک‌کننده A، رو به رو است و برای رفع این مشکل از بیوسایدی با نام تجاری E-265 استفاده می‌کند. سؤالی که در اینجا مطرح می‌شود این است که آیا بیوساید مصرفی کارایی لازم را در مهار کردن و از بین بردن باکتری‌ها داراست؟ با توجه به اینکه اخیراً به استفاده از نانوذرات و به‌خصوص نانوذرات نقره در سیستم‌های تیمار پساب به‌منظور حذف فلزات و یا به‌عنوان یک بیوساید کارا توجه ویژه‌ای می‌شود، در این تحقیق اثرات بیوساید E-265 با محلول کلوییدی نانونقره بر رشد، تنفس سلولی و تشکیل بیوفیلم ایزوله‌ها و سویه‌های شاخص پاتوژن مقایسه شد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- تهیه باکتری‌های پاتوژن و جداسازی و شناسایی ایزوله‌ها از آب خنک‌کننده پالایشگاه
باکتری‌های پاتوژن انسان شامل *اشریشیاکلی*^۷ و *استافیلوکوکوس آرتوس*^۸ از آزمایشگاه میکرب شناسی دانشگاه اصفهان تهیه شدند. به‌منظور جداسازی باکتری از نمونه آب خنک‌کننده A پالایشگاه نفت اصفهان، رفته‌های مناسب از آن تهیه شد و ۱۰۰

کمبود آب در مناطق خشک و نیمه خشک به‌صورت گسترده سبب استفاده مجدد از پساب شده است. استفاده مجدد اگر به درستی برنامه‌ریزی شود، می‌تواند یک راه‌حل اقتصادی کارا برای کنترل آلودگی آب فراهم آورد. هزینه بالای فرایندهای پیشرفته تیمار آب به‌منظور حذف آلاینده‌ها، اغلب توجه‌کننده طرهای استفاده مجدد از حجم بالای آب احیا شده است. سیستم‌های خنک‌کننده بزرگ‌ترین مصرف‌کنندگان آب در بسیاری از صنایع هستند. بنابراین پساب احیا شده برای این منظور می‌تواند سبب صرفه‌جویی قابل توجهی در مصرف آب شود. کیفیت آب در سیستم‌های خنک‌کننده با سه مسئله مهم شامل جرم‌گرفتگی^۱، خوردگی^۲ و مسدود شدگی^۳ مواجه است. در این سیستم‌ها اغلب از بیوسایدها در آب گردشی خنک‌کننده‌ها به‌منظور کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها، جلبک‌ها و ماکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. همچنین بسیاری از تسهیلات صنعتی، برجهای خنک‌کننده و دیگهای بخار به آب بسیار تمیز و خالص برای انجام فرایندها نیاز دارند و به همین منظور از بیوسایدها در پیش تیمار آب قبل از استفاده بهره‌گرفته می‌شود.

بیوساید یک ترکیب شیمیایی است که قادر به کشتن ارگانیسم‌های زنده از طریق مسیر انتخابی است. بیوسایدها به‌طور معمول در پزشکی، کشاورزی، جنگلداری و صنعت به‌کار می‌روند. در زمینه تیمار آب، بیوساید ماده‌ای است که از رشد ارگانیسم‌هایی نظیر جلبک‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها جلوگیری می‌کند. بیوسایدها در بسیاری از سیستم‌های خنک‌کننده آب به‌منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها که می‌توانند از انتقال گرما از طریق سطوح تبادل‌کننده جلوگیری کنند، استفاده می‌شوند. این ترکیبات همچنین به‌منظور جلوگیری از رشد گسترده ارگانیسم‌ها که سبب مسدود شدگی پایپ‌ها^۴، لوله‌ها و سایر تجهیزات سیستم و نیز منجر به جریان غیر کارای آب در خنک‌کننده‌ها می‌شوند، به‌کار می‌روند [۱ و ۲].

چالش دستیابی به عفونت‌زدایی مناسب و مؤثر بدون تشکیل محصولات جانبی خطرناک و همچنین افزایش نیاز به تیمار آب و وجود سیستم‌های گردش، تکنولوژی‌های جدید را برای عفونت‌زدایی کارا و کنترل میکربی به کمک فرا می‌خواند. چندین نانو مواد طبیعی و مهندسی شده، فعالیت ضد میکربی بالایی را از طریق مکانیسم‌های متنوع نمایان کرده‌اند. این مکانیسم‌ها شامل تولید فتوکاتالیتیک گونه‌های اکسیژن فعال که به اجزای سلولی و

⁵ Fullerol

⁶ Carboxyfullerene

⁷ *Escherichia coli* ATCC 1339

⁸ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

¹ Scaling

² Biocorrosion

³ Biofouling

⁴ Pipes

و پلیت‌ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای مناسب انکوبه شدند [۴ و ۵].

۲-۴- تعیین پتانسیل بیوسایدهای مورد نظر در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم

برای سنجش اثر بیوسایدهای مورد نظر در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه، مشابه مراحل ذکر شده در بالا و پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون، چاهکها تخلیه شدند و سه بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی استریل شستشو و به شدت تکان داده شدند. پس از شستشو به چاهکها ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه به منظور تثبیت سلولها اضافه گردید. در مرحله بعدی اتانول چاهکها خالی شد و اجازه داده شد تا در مجاورت هوا خشک شوند. پس از خشک شدن چاهکها، ۲۰۰ میکرولیتر محلول کریستال یوله ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه به آنها افزوده شد. پس از این مرحله رنگ چاهکها با آب شهری مورد شستشو قرار گرفت و در دمای محیط خشک شد. برای خواندن جذب هر یک از چاهکها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر، ۲۰۰ میکرولیتر محلول اسید استیک ۳۳ درصد به هر یک از چاهکها اضافه گردید. در ضمن برای هر باکتری سه تکرار در نظر گرفته شد [۶]. لازم به ذکر است که سنجش تشکیل بیوفیلم در *S. aureus* مشابه همین روش ولی در محیط TSB انجام گرفت. سنجش کارایی بیوسایدها یا درصد کاهش بیوفیلم را می‌توان از طریق جذب نوری چاهکهای تیمار شده، کنترل و شاهد با توجه به رابطه زیر محاسبه کرد

$$\text{Percentage reduction} = \left[\frac{(C - B) - (T - B)}{(C - B)} \right] \times 100 \quad (1)$$

که در این رابطه

C میانگین جذب نوری چاهکهای کنترل، B میانگین جذب نوری چاهکهای شاهد و T میانگین جذب نوری چاهکهای تیمار شده است.

۲-۵- بررسی تأثیر غلظتهای مختلف بیوسایدهای مورد نظر بر میزان تنفس سلولی باکتری‌ها

تأثیر غلظتهای مختلف بیوسایدهای مورد نظر بر میزان تنفس سلولی باکتری‌های مورد مطالعه با احیای رنگ تنفسی تری فنیل تترازولیوم کلراید^۵ مشخص گردید. TTC محلول در آب و پتانسیل کاهش آن در حدود ۰/۰۸۷- است و می‌تواند به‌عنوان یک پذیرنده الکترون برای هیدروژنازهای متفاوت عمل کند. تقریباً تمام

میکرولیتر از هر رقت به‌روش پخش^۱ در محیط نوترینت آگار تلقیح گردید و در ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه شد. سپس کلونی‌های رشد یافته بر روی این محیطها خالص‌سازی شدند. پس از بررسی‌های اولیه ریخت‌شناسی و واکنش گرم باکتری‌ها، با استفاده از جداول تشخیصی کتاب مرجع برگی، آزمون‌های میکروبی مورد نیاز برای تشخیص جنس باکتری‌ها انتخاب و انجام شدند.

۲-۲- تهیه بیوساید و محلول ضد میکروبی مورد استفاده

در این تحقیق بیوساید E-265 از پالایشگاه نفت اصفهان و محلول کلوییدی نانونقره با غلظت ۲۰۰۰ ppm از شرکت نانوسید تهیه شدند.

۲-۳- تعیین میزان حداقل غلظت مهارکننده^۲ و حداقل غلظت کشندگی^۳ نانونقره روی باکتری‌ها

برای سنجش اثر نانوذرات نقره در جلوگیری از رشد باکتری‌ها، بعد از آماده‌سازی کشت ۱۸ تا ۲۰ ساعته و فعال‌سازی باکتری‌ها، سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از هر کدام از باکتری‌ها تهیه شد. در ابتدا به تمام چاهکهای میکروتیتر پلیت ۸۰ میکرولیتر محیط نوترینت برات افزوده شد و سپس ۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده به هر ستون افزوده شد و در نهایت ۴۰ میکرولیتر از محلولهای نانونقره تهیه شده با غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ ppm یا بیوساید E-265، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ ppm به ترتیب به ردیفهای دوم تا هفتم میکروپلیت افزوده شد به این معنی که هر ردیف یک تیمار مشابه دریافت کرد (حجم نهایی هر چاهک معادل ۲۰۰ میکرولیتر). ردیف اول به‌عنوان شاهد مثبت، حاوی محیط کشت و باکتری و ردیف هشتم به‌عنوان شاهد منفی، ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت در نظر گرفته شد. چاهکهایی نیز به‌عنوان شاهد کدورت در نظر گرفته شدند. در ضمن برای هر باکتری سه تکرار در نظر گرفته شد و پس از گذشت انکوباسیون ۲۴ ساعت در دمای مناسب رشد باکتری مورد نظر، کدورت چاهکها در طول موج ۶۳۰ نانومتر و توسط دستگاه الایزا ریدر^۴ خوانده شد.

پس از تعیین حداقل غلظتی از ذرات نانونقره که برای باکتری‌ها مهارکننده است، به‌منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی آن در برابر باکتری از چاهکهای فاقد کدورت که در آنها رشد مهار شده است، ذرات به‌روش drop plate بر روی محیط نوترینت آگار تلقیح شدند

¹ Spread

² Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

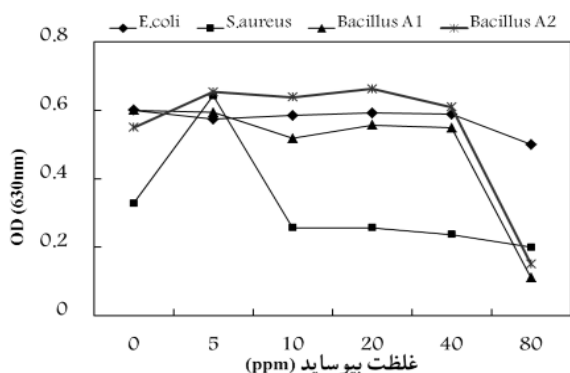
³ Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

⁴ Elisa Reader

⁵ Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC)

هر دو سویه از جنس *باسیلوس*^۴ بودند که با توجه به مشخصات متفاوت کلونی بر روی پلیت به صورت سویه‌های *باسیلوس* A_۱ و A_۲ نامگذاری شدند.

۲-۳- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف بیوساید E-265 و محلول کلوییدی نانونقره بر رشد و تنفس سلولی سویه‌های جداسازی شده از آب سیستم خنک کننده، *E. coli* و *S. aureus*
از آنجا که ایزوله‌های جداسازی شده از آب خنک کننده پالایشگاه بهترین گزینه برای سنجش اثرات بیوساید مصرفی در سیستم و همچنین بیوساید مورد نظر هستند، لذا اثر غلظت‌های مختلف بیوساید بر رشد و تنفس سلولی ایزوله‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین در آزمایشی دیگر این اثرات بر روی دو باکتری پاتوژن شناخته شده گرم منفی و گرم مثبت یعنی *E. coli* و *S. aureus* ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل ۱ ملاحظه می‌گردد و بررسی‌های آماری نیز نشان می‌دهند غلظت‌های مختلف بیوساید (۵ تا ۴۰ ppm) نه تنها کاهش معنی‌داری در رشد ایزوله‌ها نشان ندادند بلکه غلظت‌های ۵ تا ۴۰ ppm آن در ایزوله A_۲، سبب افزایش معنی‌دار رشد نسبت به شاهد شد. در هر دو ایزوله، غلظت ۸۰ ppm بیوساید سبب توقف رشد شد. همچنین غلظت‌های مختلف بیوساید (۵ تا ۸۰ ppm) سبب کاهش معنی‌داری در رشد *E. coli* نسبت به شاهد شد اما میزان



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف بیوساید بر رشد ۲۴ ساعته ایزوله‌های جداسازی شده از سیستم خنک کننده و سویه‌های پاتوژن

^۴ *Bacillus*

میکروارگانیزم‌ها توانایی احیای TTC به تری فنیل فورمازان (TPF) را دارند که جذب آن می‌تواند از طریق رنگ سنجی در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شود. به منظور تهیه محلول TTC ابتدا بافر آن تهیه شد به این صورت که ۱۲/۱ گرم از ترکیب تریس هیدروکسی آمینومتان^۱ در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل و pH آن روی ۷/۸ تنظیم شد و حجم نهایی آن توسط آب مقطر استریل به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۲ گرم پودر TTC در ۸۰ میلی‌لیتر از بافر تهیه شده حل گردید و حجم نهایی آن توسط همان بافر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. قابل توجه است که محلول TTC تهیه شده به نور حساس است و در نور زیاد غیرفعال می‌شود و به همین دلیل باید اطراف ظرف حاوی محلول آن فویل آلومینیومی پیچیده شود و یا یک ظرف با جداره تاریک برای نگهداری آن انتخاب گردد.

به منظور بررسی تأثیر بیوساید‌های مورد نظر بر میزان تنفس سلولی باکتری‌ها، مشابه مراحل ذکر شده همانند آزمایش تعیین MIC و پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون، به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از محلول TTC اضافه و میکروپلیت برای سه ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شد و در نهایت تغییر رنگ حاصله توسط هر یک از چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد [۷].

۲-۶- بررسی‌های آماری

ترسیم نمودارهای حاصل از داده‌های آزمایش‌های بالا با استفاده از نرم افزار EXCEL 2007 و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در صورت لزوم، با استفاده از نرم افزار SPSS (آنالیز واریانس یک طرفه^۲ و آزمون دانکن^۳) انجام شد و معنی‌داری داده‌ها در سطح ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

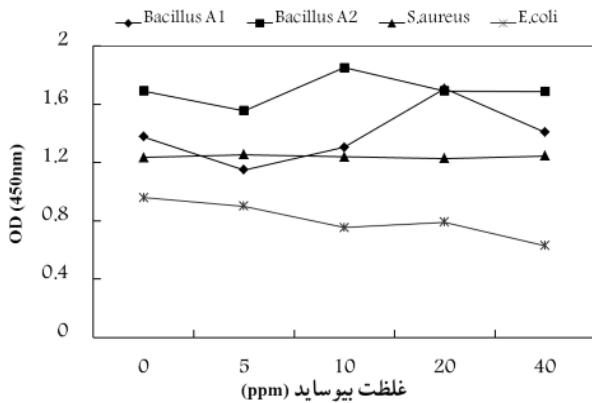
۳-۱- شناسایی ایزوله‌های جداسازی شده از سیستم خنک کننده پالایشگاه

با توجه به تست‌های انجام شده و نتایج به دست آمده مطابق جدول ۱

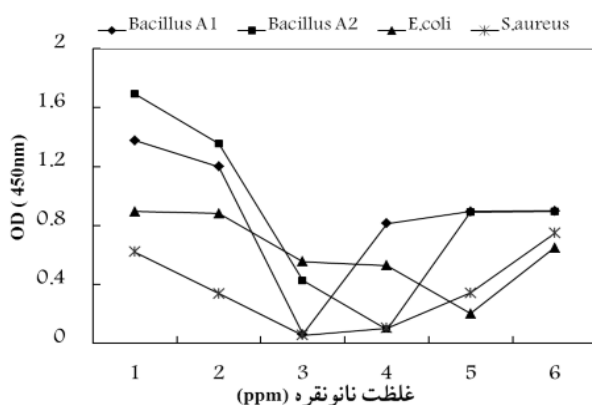
^۱ Tris(hydroxyl methyl)-amino Methane
^۲ One Way ANOVA
^۳ Duncan test

جدول ۱- شناسایی اولیه باکتری‌های گرم مثبت

سویه‌های جداسازی شده	شکل	اسید فاست	اسپور	حرکت	رشد هوازی بی‌هوازی	رشد هوازی	کاتاز	اکسیداز	تولید اسید از گلوکز
ایزوله A _۱	میله‌ای	-	+	-	+	-	+	-	+
ایزوله A _۲	میله‌ای	-	+	-	+	-	+	-	+



شکل ۳- سنجش تنفس سلولی در ایزوله‌های جداسازی شده از سیستم خنک کننده و سویه‌های پاتوژن در حضور مختلف بیوساید



شکل ۴- سنجش تنفس سلولی در ایزوله‌های جداسازی شده از سیستم خنک کننده و سویه‌های پاتوژن در حضور غلظت‌های مختلف نانوفیلتر

۳-۳- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف بیوساید E-265 و محلول کلوییدی نانوفیلتر بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه به منظور سنجش میزان کارایی بیوسایدهای مورد نظر، اثرات آنها بر تشکیل بیوفیلم باکتریایی مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۵ درصد افزایش تشکیل بیوفیلم را در حضور غلظت‌های مختلف بیوساید صنعتی در ایزوله‌های A₁ و A₂ نشان می‌دهد. نتایج نشان دهنده این مطلب است که حتی غلظت‌های بالای این بیوساید (۲۰ ppm و ۴۰ ppm) سبب افزایش صد درصدی تشکیل بیوفیلم در ایزوله A₁ شده است.

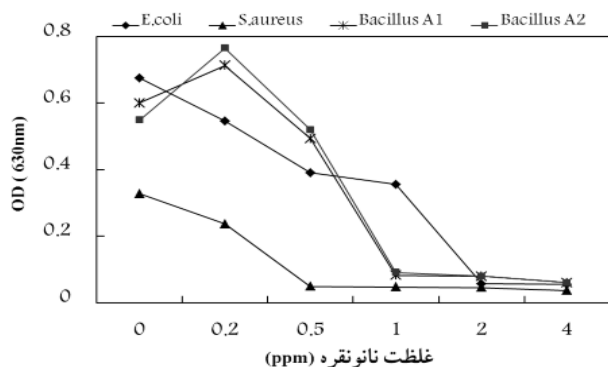
شکل‌های ۶ تا ۸ نشان می‌دهند که غلظت ۰/۲۵ ppm نانوفیلتر نه تنها سبب افزایش رشد در ایزوله‌ها می‌شود بلکه تحریک کننده تشکیل بیوفیلم در آنها نیز است. بررسی‌های آماری نشان می‌دهند که این افزایش تشکیل بیوفیلم در حضور ۰/۲۵ ppm و ۰/۵ ppm نانوفیلتر نسبت به شاهد معنی دار است. همان‌طور که انتظار می‌رود غلظت‌های بالاتر نانوفیلتر سبب کاهش معنی دار تشکیل بیوفیلم نسبت به شاهد شده‌اند. در مورد *S.aureus* مشخص می‌شود که

کاهش رشد در غلظت‌های مختلف، تفاوت معنی داری نسبت به هم نداشتند. جالب اینکه در *S.aureus* غلظت ۵ ppm سبب تحریک و افزایش معنی دار رشد نسبت به شاهد گردیده و غلظت‌های بالاتر کاهش رشد را نشان داد.

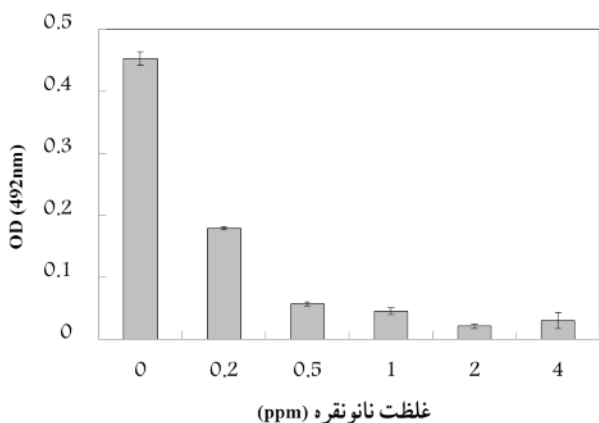
به منظور تعیین فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره در محلول کلوییدی، میزان رشد دو باکتری پاتوژن رایج *E.coli* و *S.aureus* همچنین ایزوله‌ها در حضور غلظت‌های مختلف این ذرات ارزیابی شد. نتایج حاصل از تعیین MIC و MBC محلول کلوییدی نانوفیلتر در جدول ۲ آورده شده است. همچنین اثرات محلول کلوییدی نانوفیلتر بر رشد ۲۴ ساعته باکتری‌های مورد مطالعه ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود، غلظت‌های مختلف محلول کلوییدی نانوفیلتر (۰/۲۵ تا ۴ ppm) سبب کاهش معنی دار رشد در *E.coli* و *S.aureus* و ایزوله‌ها در محیط نوترینت برآش شده است. در قسمت دیگری از این آزمایش، تنفس سلولی به‌عنوان نمادی از زنده بودن باکتری‌های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های مختلف هر دو بیوساید مورد سنجش قرار گرفت. مشابه با اثر غلظت‌های مختلف بیوساید بر رشد ایزوله‌ها و در تأیید این نتایج، همان‌طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌گردد این غلظت‌ها اثر معنی داری بر کاهش تنفس سلولی این ایزوله‌ها نشان نمی‌دهد. در ارتباط با غلظت‌های مختلف نانوفیلتر نیز به‌طور کلی نمودارها در شکل ۴ الگوی مشابهی را نشان می‌دهند به این صورت که در غلظت MIC نانوفیلتر برای هر باکتری، میزان تنفس سلولی به کمترین حد خود رسیده و سپس در غلظت‌های بالاتر دوباره افزایش یافته است.

جدول ۲- تعیین MIC و MBC نانوفیلتر بر روی باکتری‌های مورد مطالعه

باکتری‌ها	MIC (ppm)	MBC (ppm)
<i>E.coli</i>	۲	۸
<i>S.aureus</i>	۰/۵	۲
<i>Bacillus A₁</i>	۱	۲
<i>Bacillus A₂</i>	۱	۲



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف نانوفیلتر بر رشد ۲۴ ساعته ایزوله‌های جداسازی شده از سیستم خنک کننده و سویه‌های پاتوژن

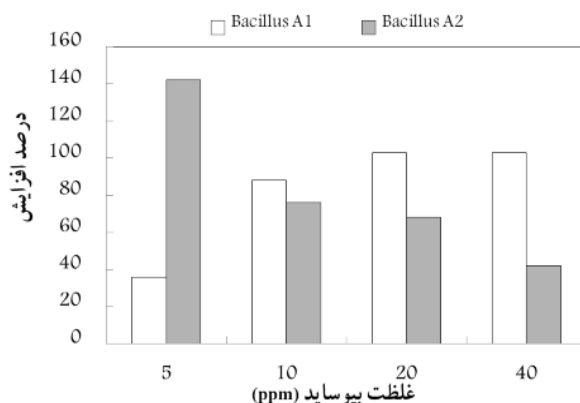


شکل ۸- روند کاهش تشکیل بیوفیلم در *S.aureus* در حضور غلظتهای مختلف نانوقره در محیط TSB. (بررسیهای آماری نشان می دهند که کاهش تشکیل بیوفیلم در غلظتهای ۰/۲ ppm به بالا نسبت به شاهد معنی دار است).

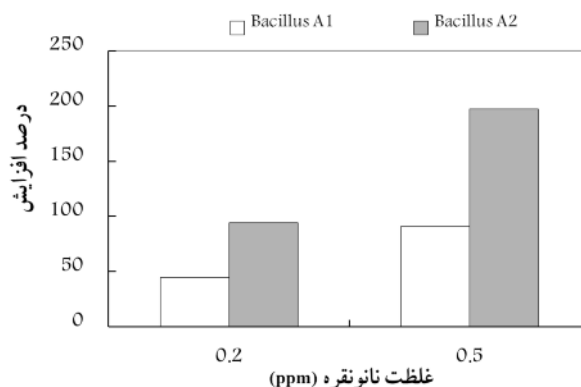
۴- نتایج و بحث

محلولهای کلوییدی نقره به دلیل خواص ضد میکروبی و کاربرد گسترده آنها در داروسازی، پزشکی و دامپزشکی، صنایع غذایی، تصفیه آب و غیره دارای جذابیت فوق العاده زیادی هستند. پتیکا و همکاران^۱ در سال ۲۰۰۸ نشان داده اند که محلولهای حاوی بیش از ۳۵ ppm نقره خواص ضد میکروبی و ضد قارچی بسیار خوبی دارند [۸]. چو و همکاران^۲ در سال ۲۰۰۵، MIC نانوذرات نقره را برای *S.aureus* و *E.coli* به ترتیب ۵ و ۱۰ ppm به دست آورده اند [۹]. کیم^۳ در سال ۲۰۰۷ اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره، نانوذرات نقره حاوی یون نقره و یونهای نقره را علیه *E.coli* و *S.aureus* ارزیابی کرده است و به این نتیجه رسیده که نانوذرات نقره حاوی یون نقره، فعالیت میکرب کشی بالاتری را نسبت به این باکتری ها نشان می دهند [۱۰]. چویی و همکاران^۴ در سال ۲۰۰۸ نشان داده اند که ۰/۵ میلی گرم در لیتر نقره در فرم نانوذرات نقره، یونهای نقره و کلویدهای کلرید نقره به ترتیب با ۵۵ درصد، ۱۰۰ درصد و ۶۶ درصد سبب جلوگیری از رشد *E.coli* می شود [۱۱]. به طور کلی نتایج نشان می دهند که باکتری های گرم منفی نسبت به باکتری های گرم مثبت در مقابل اثرات مهارکنندگی و کشندگی نانوذرات نقره مقاومت بیشتری از خود نشان می دهند. این مسئله احتمالاً به ساختار متفاوت دیواره باکتری های گرم منفی نسبت به باکتری های گرم مثبت ارتباط دارد. در این باکتری ها پورین ها سبب جذب و انتشار فلزات به غشاء خارجی و فضای پری پلاسمیک

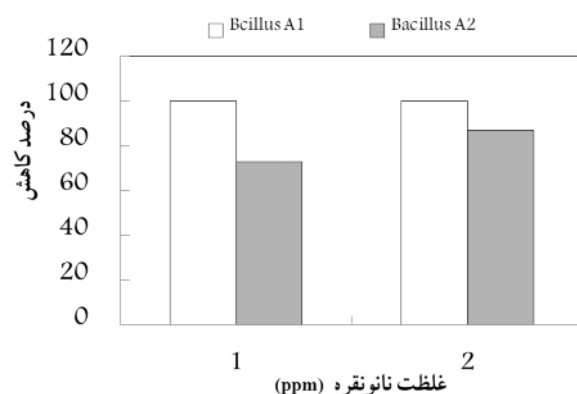
تشکیل بیوفیلم در غلظتهای مختلف نانوقره کاهش یافته و در غلظتهای بالا (۲ تا ۸) به طور کامل متوقف گردیده است.



شکل ۵- درصد افزایش تشکیل بیوفیلم ایزوله های جداسازی شده از سیستم خنک کننده در حضور غلظتهای مختلف بیوساید



شکل ۶- درصد افزایش تشکیل بیوفیلم در ایزوله های جداسازی شده از سیستم خنک کننده در حضور غلظتهای ۰/۲ ppm و ۰/۵ ppm نانوقره



شکل ۷- درصد کاهش تشکیل بیوفیلم در ایزوله های جداسازی شده از سیستم خنک کننده در حضور غلظتهای ۱ ppm و ۲ ppm نانوقره

¹ Petica et al.

² Cho et al.

³ Kim

⁴ Choi et al.

می شوند. فلزات جذب شده می توانند به گروههای عاملی موجود (شامل گروههای کربنات، فسفات و آمین) متصل شوند و به این صورت کمتر وارد سلول شده و یا با پروتئین های غشایی (آنزیم های دارای گروههای سولفیدریل) واکنش دهند [۱۲].

چوبی و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثرات ممانعتی نانوذرات نقره (Ag NPs) را بر روی رشد میکروبی با استفاده از روش تنفس و روش اتوماتیک میکروتیتر فلورسنس ارزیابی کرده اند و نشان داده اند که نانوذرات نقره با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر سبب جلوگیری از تنفس به میزان ۸۶ درصد در باکتری های نیتروفاایر می شود. بنابراین آنها دریافته اند که باکتری های نیتروفیه کننده به جلوگیری توسط نانوذرات نقره حساس هستند و تجمع نانوذرات نقره در تیمار پساب می تواند اثرات مضر بر روی میکروارگانیسم ها داشته باشد. مطابق با نتایج این محققان، غلظت ۱ ppm نانوذرات سبب جلوگیری از تنفس به میزان ۸۰ درصد در *S.aureus* شد، همچنین این غلظت، تنفس را در ایزوله ها متوقف نمود. در مورد *E.coli* غلظت ۲ ppm نانوذرات سبب جلوگیری از تنفس به میزان ۶۵ درصد گردیده است. بنابراین نتایج حاصل از سنجش تنفس سلولی در حضور غلظتهای مختلف نانوذرات نقره در گروههای مختلف باکتریایی یک الگوی مشابه را مطرح می کند و آن کاهش تدریجی میزان تنفس سلولی به موازات افزایش غلظت نانوذرات است تا اینکه در غلظت MIC نانوذرات برای هر باکتری میزان تنفس به پایین ترین حد خود رسیده و پس از آن دوباره افزایش می یابد. افزایش دوباره و غیر طبیعی میزان تنفس در غلظتهای بالاتر نانوذرات را می توان به فعالیت کاتالیزوری و اکسیدکنندگی نانوذرات نسبت داد [۱۳]. با توجه به اینکه غلظتهای بالاتر از غلظت MIC به تدریج سبب مرگ کامل باکتری می شود لذا این افزایش دوباره می تواند به دلیل انجام واکنش های اکسیداسیون شیمیایی در باکتری ها و اثرات کاتالیزوری نانوذرات مرتبط باشد.

لیلوک و همکاران^۱ در سال ۲۰۰۹ نشان داده اند که تشکیل بیوفیلم در *E.coli* در حضور غلظتهای مختلف نانوذرات فلئوئورید منیزیم در یک روش وابسته به غلظت کاهش یافته است و سرانجام منجر به کاهش ۷۵ درصدی تشکیل بیوفیلم در بالاترین غلظت این ذرات یعنی ۱/۵ میلی گرم در میلی لیتر شده است [۱۴]. آنها با بررسی های بیشتر دریافته اند که نانوذرات فلئوئورید منیزیم به سلول متصل شده و به داخل آن نفوذ می کنند، در پتانسیل غشاء تداخل ایجاد کرده و سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و اتصال به DNA می شوند. این فرایندها در مجموع توانایی باکتری ها را در تشکیل بیوفیلم مختل می کند. مطابق با یافته های این محققان در

این تحقیق، غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر محلول کلوییدی نانوذرات نقره به طور کامل از تشکیل بیوفیلم در *S.aureus* جلوگیری می کند.

در مطالعه حاضر اثر محلول کلوییدی نانوذرات نقره بر تشکیل بیوفیلم باکتری ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت ۰/۲۵ ppm نانوذرات نقره تنها سبب افزایش معنی دار رشد در ایزوله ها نسبت به شاهد شد بلکه در غلظتهای ۰/۲۵ و ۰/۵ ppm منجر به افزایش معنی داری در تشکیل بیوفیلم این ایزوله ها گردید. افزایش رشد و متعاقب آن افزایش تشکیل بیوفیلم در این غلظتهای پایین را می توان به اثرات کاتالیزوری نقره در فعل و انفعالات سلولی که سبب افزایش رشد و اتصالات سلولی می شود، نسبت داد. با افزایش غلظت نانوذرات تا ۲ ppm به طور همزمان از رشد و تشکیل بیوفیلم جلوگیری شد به طوری که در غلظت ۲ ppm به ترتیب سبب کاهش ۱۰۰ درصد و ۹۰ درصدی تشکیل بیوفیلم در ایزوله ها و در غلظت ۰/۵ ppm سبب کاهش ۹۰ درصدی تشکیل بیوفیلم در *S.aureus* گردید.

از طرف دیگر افزایش تشکیل بیوفیلم در حضور غلظتهای مختلف بیوساید نسبت به شاهد مبین این مطلب است که بیوساید مصرفی در این سیستم نه تنها کارایی لازم را در جلوگیری از رشد باکتری ها ندارد بلکه سبب افزایش تشکیل بیوفیلم نیز می شود و تنها در غلظت کامل بیوساید (احتمالاً این غلظت به اندازه ای برای باکتری ها سمی است که رشدی صورت نمی گیرد) سبب حذف بیوفیلم می گردد. بنابراین در مجموع، اثرات نانوذرات نقره بر تشکیل بیوفیلم را می توان با اثرات این ذرات بر رشد باکتری ها مرتبط دانست به این معنی که جلوگیری از رشد باکتری ها موجب عدم تشکیل بیوفیلم گردیده و افزایش و تحریک رشد (در غلظت ۰/۲۵ ppm) با افزایش میزان تشکیل بیوفیلم متناسب بوده است.

۵- نتیجه گیری

به طور کلی نتایج حاصل از مقایسه اثرات بیوساید E-265 و محلول کلوییدی نانوذرات نقره بر رشد، تنفس سلولی و تشکیل بیوفیلم باکتریایی حداقل بیانگر سه مطلب است:

۱- انتخاب بیوساید مصرفی در سیستم ها باید بر اساس اطلاعات و آگاهی کافی از ماهیت و ساختار آنها و همچنین غلظت مؤثر آن بر باکتری های سیستم صورت گیرد.

۲- در یک سیستم گردش، استفاده متناوب از بیوسایدها ضروری است و استفاده مکرر و طولانی مدت از یک نوع بیوساید احتمالاً سبب مقاوم شدن باکتری های سیستم به آن و متعاقباً ایجاد مشکلاتی از قبیل افزایش بار میکروبی، خوردگی و مسدود شدن در نقاط مختلف سیستم می گردد.

¹ Lellouche et al

۳- در این تحقیق محلول کلوییدی نانونقره، فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم بی نظیری را در غلظتهای پایین از خود نشان داد. به کارگیری این نانوذرات در شکل محلول یا به صورت فیلتر می تواند به عنوان یک بیوساید مؤثر و کارا در سیستم های گردش آب معرفی شود.

۶- قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولان دانشگاه اصفهان برای حمایت های مالی این پروژه و همچنین مسئولان پالایشگاه نفت اصفهان به دلیل همکاری در این تحقیق و در اختیار قرار دادن نمونه آب خنک کننده و بیوساید مصرفی تشکر و قدردانی می نمایند.

۷- منابع

- 1- Rebhun, M., and Engel, G. (1988). "Reuse of wastewater for industrial cooling systems." *Res. J. of Water Pollut. C.*, 60, 237-241.
- 2- Veil, J.A., Rice, J.K., and Raivel, M.E.S. (1997). *Biocide usage in cooling towers in the electric power and petroleum refining industries*, U.S. Department of Energy, Office of Fossil Energy, Argonne National Laboratory, Washington, DC.
- 3- Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D.Y., Brunet, L., Liga, M.V., Li, D., and Alvarez, P.J.J. (2008). "Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control, Potential applications and implications." *J. of Water Res.*, 42, 4591-4602.
- 4- Dizman, B., Elasri, M.O., and Mathias, L.J. (2004). "Synthesis and antimicrobial activities of new water-soluble bis-quaternary ammonium methacrylate polymers." *J. of Appl. Polym. Sci.*, 94, 635-642.
- 5- Lorian, V. (2005). *Antibiotics in laboratory medicine*, 5th Ed., Williams and Wilkins, Philadelphia.
- 6- Shakeri, S., Kermanshahi, R., Moghaddam, M., and Emtiazi, G. (2007). "Assessment of biofilm cell removal and killing and biocide efficacy using the microtiter plate test." *J. of Biofouling.*, 23, 79-86.
- 7- Alef, K., and Nanniper, P. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*, Academic Press. New York.
- 8- Petica, A., Gavrilu, S., Lungu, M., Buruntea, N., and Panzaru, C. (2008). "Colloidal silver solutions with antimicrobial properties." *J. of Mat. Sci. Eng. R.*, 152, 22-27.
- 9- Cho, K.H., Park, J.E., Osaka T., and Park, S.G. (2005). "The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient." *J. of Electrochimica Acta.*, 51, 956-960.
- 10- Kim, J. (2007). "Antibacterial activity of Ag⁺ ion-containing silver nanoparticles prepared using the reduction method." *Ind. J. of Eng. Chem. Res.*, 4, 718-722.
- 11- Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.J., Surampalli, L.R., and Hu, Z. (2008). "The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth." *J. of Water Res.*, 9, 1-9.
- 12- Landkammer, L.L., Honeyman, B.D., Figueroa, L.A., Dodge, C.J., and Francis, A.J. (2000). "Effect of cell structure and environmental parameters on sorption of heavy metals to bacteria: An experimental and modeling study." *America Chemical Society*, 2, 467-470.
- 13- Dung, T.T.N., Buu, N.Q., Quang, D.V., Ha, H.T., Bang, L.A., Chau, N.H., Ly, N.T., and Trung, N.V. (2009). "Synthesis of nanosilver particles by reverse micelle method and study of their bactericidal properties." *J. of Phys.*, 187, 1-9.
- 14- Lellouche, J., Kahana, E., Elias S., Gedanken, A., and Banin, E. (2009). "Antibiofilm activity of nanosized magnesium fluoride." *Biomaterials*, 30, 5969-5978.