**مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران**
**سال هشتم، شماره 4، زمستان 1392، صفحات 92-83**

# اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره تولید شده به روش احیای شیمیایی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی*

مهداد اسدی اسدآباد[1]، کیانوش خسروی دارانی[2]، علی مرتضوی[3]، نسرین حاج سید جوادی[4]، ابراهیم آزادنیا[5]، آیت الله کیانی هرچگانی[6]، نگین احمدی[7]

1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی- صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، ایران

2- نویسنده مسئول: دانشیار گروه تحقیقات علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: k.khosravi@sbmu.ac.ir

3- استاد گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

4- کارشناس گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

5- کارشناس گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

6- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شیمی- فیزیک، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، ایران

7- کمیته پژوهشی دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/7/2 تاریخ پذیرش: 92/10/15

## چکیده

**سابقه و هدف:** در پی ایجاد مقاومت میکروبی در برابر عوامل ضدمیکربی شیمیایی، اخیراً اثرات نانوذرات نقره و فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها مورد توجه ویژه محققان قرار گرفته است. در این تحقیق اثر ضدمیکروبی نانوذرات‌نقره تولید شده به روش احیای شیمیایی در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف بر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** نانوذرات نقره به روش احیای شیمیایی تولید شدند. محیط‌های کشت مانیتول سالت آگار و ائوزین متیلن‌بلو به‌ترتیب به‌عنوان محیط کشت‌های اختصاصی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* و محیط مولرهینتون‌آگار به عنوان محیط کشت برای بررسی خواص ضد-میکروبی استفاده شد. برای بررسی اثر ضدمیکروبی از طرح آزمایشی عاملی کامل استفاده و تیمارها در قالب کاملا تصادفی با 6 تکرار و در سطح معنی داری 0/05 انجام شدند. متغیر کیفی دو سطحی نوع باکتری انتخاب شد و دو فاکتور کمی دیگر زمان تماس نانوذرات‌نقره با باکتری‌ها (1، 12، 24 و 48 ساعت) و غلظت نانوذرات (5، 10، 25 و 50 ppm) لحاظ شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که هر سه متغیر مورد مطالعه تأثیر معنی‌دار بر مهار رشد میکربی داشتند، اما متغیرهای نوع باکتری و غلظت نانوذره در مقایسه با زمان تماس تاثیر بیشتری نشان دادند. *اشرشیا کلی* در مقایسه با *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت کم مقاومت بیشتری نسبت به حضور نانوذره نشان داد. غلظت 5 و 10ppm از نانوذرات نقره کمترین غلظت بازدارندگی نانوذرات نقره برای هر دو باکتری *استافیلوکوکوس-اورئوس* و *اشرشیاکلی* است. همچنین کمترین غلظت برای کشتن باکتری‌های مورد مطالعه حدود 50 ppm به دست آمد.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد متغیرهای مورد بررسی یعنی نوع باکتری، زمان تماس و غلظت نانوذرات نقره عوامل مؤثر بر بروز خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره است. باکتری *اشرشیا کلی* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقابل نانوذرات نقره سنتز شده به روش احیای الکتروشیمیایی مقاومت بیشتری نشان داد.

**واژگان کلیدی:** نانوذرات‌نقره، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، اثر ضدمیکروبی، احیا شیمیایی

## • مقدمه

در بین فلزات طبیعی یون‌های نقره دارای خواص ضدمیکروبی شدیدی علیه بسیاری از گونه‌های باکتریایی است (3-1). به دلیل ویژگی ضدمیکروبی فوق العاده‌ی نقره و سمیت اندک یون‌های آزاد آن برای سلول های پستانداران، علاقه برای استفاده از این نانوذرات جهت کاربردهای غذایی در حال افزایش است (4). با این حال قوانین اتحادیه‌ی اروپا

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

حد مجاز یون‌های نقره در مواد غذایی را به mg Ag/Kg 0/05 محدود کرده است (5). سمیت یون‌های نقره و ترکیبات آن در بسیاری از ریزسازواره‌ها شناخته شده است (6). در 1000 سال قبل از میلاد مسیح مردم نقره را برای پاکسازی آب استفاده می‌کردند (9-7). در دهه 1940 میلادی بعد از کشف پنی‌سیلین استفاده از نقره به حداقل رسید (12-10). هنگامی‌که Moyer نقره را در غلظت 0/5 درصد به صورت نیترات نقره برای درمان سوختگی استفاده کرد، این فلز مجدداً در دهه 1960 میلادی به صحنه آمد (14، 13). در پی افزایش بیماری‌های عفونی و افزایش غیر منتظره مقاومت ریزسازواره‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، بسیاری از محققان به فکر استفاده از روش‌های جدیدی برای مهار رشد آن‌ها افتادند به نحوی که استفاده از این روش‌ها در ریزسازواره‌ها ایجاد مقاومت نکند (15، 7، 1). گسترش فناوری نانو باعث افزایش توجه محققان به نانو ذرات نقره جهت مهار رشد میکروبی شد. نانوذرات‌نقره به‌علت ابعاد کوچکی که دارند دارای خصوصیات منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی هستند، این کاهش در ابعاد، باعث بالا رفتن نسبت سطح به حجم در نانوذرات شده و در نتیجه سطح تماس با ریزسازواره‌ها نیز افزایش می‌یابد. به همین دلیل نانوذرات‌نقره دارای اثر میکروب‌کشی بالاتری نسبت به توده فلز نقره هستند (18-16).

سازوکار دقیق اثر نانوذرات‌نقره بر ریزسازواره‌ها دقیقاً مشخص نیست اما سه مکانیسمی که به طور معمول توسط محققان مختلف پیشنهاد شده است عبارتند از: 1- آزادسازی تدریجی یون‌های نقره و در نتیجه مهار تولید ATP و رونویسی DNA 2- آسیب مستقیم به غشای سلولی توسط نانوذرات نقره 3- ایجاد رادیکال‌های اکسیژن فعال توسط نانوذرات نقره و یون‌های نقره (19). یون‌های نقره می‌توانند به گروه‌های دهنده‌ی الکترون مثل گوگرد، اکسیژن یا نیتروژن در مولکول‌های زیستی متصل شوند (20). Cho و همکاران در سال 2005 کمترین غلظت بازدارندگی نانوذرات نقره و نانوذرات‌پلاتین را بر روی توقف رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* مطالعه کردند (6). همچنین Ruparelia و همکاران در سال 2006 اثر نانوذرات نقره را علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* بررسی کردند (21).

روش‌های بسیار متنوع فیزیکی و شیمیایی برای سنتز نانوذرات وجود دارد که به‌طور مثال می‌توان به روش‌های احیای شیمیایی، الکتروشیمیایی، نورشیمیایی، صوت شیمیایی، احیاء گرمایی، سنتز فیزیکی بخار، چگالش گاز خنثی، سنتز شیمیایی بخار، متراکم سازی بخار فلز اتمی و ... اشاره کرد (26-22). در تمام این روش‌ها مشکل اساسی تمایل به لخته شدن ذرات کلوئیدی درون محلول است. (27). روش‌های فیزیکی به‌علت نیاز به دماهای بالا (بالاتر از 1000 °C) و نیاز به تجهیزات گران قیمت و پیچیدگی کنترل شرایط سنتز، کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. در عوض روش‌های شیمیایی به‌علت سهولت کنترل شرایط واکنش، کم هزینه بودن و ساده بودن تجهیزات و مواد اولیه رایج هستند. از میان روش‌های شیمیایی، روش احیاء شیمیایی به‌علت عملیات و تجهیزات ساده آن بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (28). در این روش با استفاده از یک عامل احیاء کننده، نمک نقره را در یک محیط آبی به نانوذرات‌نقره احیاء کرده و توسط یک پایدار کننده مناسب از به‌هم پیوستن ذرات جلوگیری می‌شود و کنترل شرایط فرآیند در این روش برای به‌دست آوردن ذرات با اندازه، شکل و توزیع یکسان، بسیار مهم است.

هدف از این تحقیق استفاده از نانوذرات‌نقره تولید شده به روش احیای شیمیایی و بررسی اثرات مهارکنندگی غلظت-های مختلف آن (غلظت‌های 5، 10، 25 و ppm 50) بر دو باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *اشرشیاکلی* به‌عنوان نمونه-ای از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زا در مواد غذایی می‌باشد.

## • مواد و روش‌ها

کشت لیوفیلیزه باکتری‌های *اشرشیاکلی* PTCC 1330، (ATCC 8739) و *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1112، (ATCC 6537) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شده و جهت بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. جهت فعال‌سازی باکتری، در ابتدا کشت‌های لیوفیلیزه در محیط TSB در دمای 37 °C به مدت 18 ساعت دوبار به طور متوالی کشت داده شد. سپس با نسبت پنج به یک با گلیسیرین استریل مخلوط و در لوله‌های اپندرف استریل در دمای 20 °C- نگهداری شدند. از کشت مادر، کشت ذخیره تهیه شده و در مراحل بعدی از کشت ذخیره استفاده شد.

دستگاه‌ها و مواد استفاده شده عبارتند از اتوکلاو (ایران، شرکت ریحان طب مدل RT-2)، انکوباتور (MEMERT آلمان مدل BVM601) و فور (HELLIOS آلمان) و ترازوی دیجیتال (SARTORIUS آلمان مدل GM312)، محیط

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

کشت‌های مانیتول‌سالت‌آگار و مولرهینتون‌آگار و نوترینت-براث و ائوزین متیلن‌بلو (شرکت مرک آلمان).

**تولید نانوذرات:** ابتدا پایدارکننده پلی‌وینیل‌پیرولیدون 55000 توزین و در بالن دو دهنه 25 ml با آب دیونیزه مخلوط و روی گرم‌کن همزن‌دار در دمای مورد نظر به مدت 10 دقیقه قرار گرفت. در طی این مدت از گاز نیتروژن با خلوص بالا برای خارج کردن اکسیژن اضافی از آب دیونیزه استفاده شد زیرا پس از افزودن نیترات نقره اکسیژن موجود در آب با نقره واکنش داده و تولید اکسید نقره تیره رنگ می‌کند که رنگ محلول را از فرآیندی غیر از فرآیند اصلی تغییر می‌دهد و موجب ایجاد خطا در زمان به اتمام رسیدن واکنش از روی رنگ محلول می‌شود. بعد از گذشت 10 دقیقه و انحلال پلی‌وینیل‌پیرولیدون در آب مقدار لازم از نمک‌نقره به‌همراه احیاء کننده (اتانول) به محلول اضافه شده و در همان دما تحت هم‌زدن شدید قرار گرفت. رنگ محلول کم‌کم شروع به تغییر کردن از بی‌رنگ به زرد می‌کند. وجود یک رنگ زرد مایل به قهوه‌ای بیان‌گر اتمام واکنش و تولید نانوذرات‌نقره کروی شکل است (31-28).

**بررسی خواص ضد میکروبی:** ابتدا برای شاهد یک استاندارد نیم‌مک‌فارلند تهیه شد (32، 30). به این منظور 0/6 ml از محلول کلرور باریم 1 درصد در 100 ml اسیدسولفوریک به حجم 100 رسانده شد و جذب نوری یا دانسیته نوری این محلول برابر با 1 خوانده شد. محیط‌های نوترینت‌براث که از قبل آماده و درون لوله‌های در دار ریخته شده بود را در نزدیکی شعله قرار داده و سپس یک لوپ کامل از *استافیلوکوکوس اورئوس* که از قبل فعال شده بود به محیط نوترینت‌براث وارد کرده و تکان داده شد تا باکتری کاملا در محیط یکنواخت شود. لوله‌های مذکور به مدت 24 ساعت در دمای 37 °C گرم‌خانه گذاری شد. سپس کدورت لوله‌های حاوی نوترینت‌براث و باکتری بررسی شدند. این کدورت مشابه کدورت استاندارد نیم‌مک‌فارلند است و جذب نوری آن برابر با 1 و طبق استاندارد نیم‌مک‌فارلند شمارش تعداد باکتری در آن $1/5 \times 10^8$ CFU/ml از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. عملیات یاد شده به‌طور مشابه برای باکتری *اشرشیاکلی* نیز تکرار گردید. برای تهیه سری رقت و رسم نمودار کالیبرسیون تعداد باکتری بر حسب دانسیته نوری، دو سری 6 تایی از لوله‌های حاوی 9 ml آب پپتونه استریل در کنار شعله با 1 ml از هر یک باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* فعال در محیط نوترینت‌براث با غلظت $10^8$ CFU/ml تهیه شد. شایان ذکر است که سرسمپلرها قبلا در اتوکلاو به مدت 15 دقیقه در دمای 121 °C در فشار 15 $lbf/in^2$ استریل شدند. لوله‌های حاوی آب پپتونه و باکتری روی دستگاه تکانه قرار گرفت تا خوب یکنواخت شوند. در این حالت لوله‌ها حاوی $10^7$ CFU/ml از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* می‌باشند. سپس میزان 1 ml از هر دو سری لوله با سمپلر به لوله‌های حاوی 9 ml آب پپتونه اضافه شد و مجددا روی تکانه قرار گرفت تا به‌خوبی یکنواخت شود (غلظت $10^6$ CFU/ml). این کار تا رسیدن به غلظت $10^3$ CFU/ml از باکتری‌ها ادامه یافت. محیط کشت‌های ائوزین‌متیلن‌بلو به‌عنوان محیط کشت اختصاصی باکتری *اشرشیاکلی* و محیط مانیتول‌سالت‌آگار به‌عنوان محیط کشت اختصاصی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و نیز محیط مولرهینتون‌آگار برای بررسی اثر ضدمیکروبی استفاده شدند (33، 30، 1). محیط‌های کشت تهیه، استریل و درون بشقابک‌ها قرار داده شدند. سپس میزان 0/1 ml از غلظت-های مختلف باکتری در محیط کشت‌های یاد شده به‌عنوان بشقابک‌های کنترل کشت داده شدند. آن‌گاه میزان 1 ml محلول کلوئیدی نانوذرات‌نقره با غلظت 50 ppm به‌وسیله سمپلر به لوله آزمایش حاوی سوسپانسیون آب پپتونه و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* غلظت $10^3$ CFU/ml اضافه شد. سپس این‌کار را برای تمامی غلظت‌های $10^3$-$10^7$ CFU/ml از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* انجام گرفت و لوله‌های آزمایش برای تماس کامل نانوذرات‌نقره با باکتری روی تکانه قرار گرفت. سپس به‌مدت 1 ساعت در دمای محیط (25°C) قرار گرفته تا اثر نانوذرات‌نقره روی باکتری‌ها مشخص شود (33، 32، 30، 1). تمامی عملیات یاد شده برای غلظت‌های 5، 10 و 25 ppm از محلول کلوئیدی نانوذرات نقره نیز انجام گرفت و به مدت 1 ساعت اجازه داده شد تا نانوذرات نقره و باکتری‌ها در تماس با هم قرار بگیرند.

بعد از گذشت زمان 1 ساعت به هر یک از بشقابک‌های محیط کشت مانیتول‌سالت‌آگار، ائوزین متیلن‌بلو و مولرهینتون‌آگار در کنار شعله، 0/1 ml از محلول حاوی نانوذرات‌نقره، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* ($10^3$ CFU/ml) اضافه شد. این‌کار را برای تمامی غلظت‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* که در تماس با نانوذرات‌نقره بودند تکرار شد. در انتها تمامی بشقابک‌های

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

نمونه و کنترل به مدت 24 ساعت در دمای 37 °C گرمخانه گذاری شدند. بعد از این زمان بشقابک‌ها از نظر شمارش سلولی مورد مطالعه قرار گرفتند. برای مشاهده اثر زمان تماس نانوذرات‌نقره علیه دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی*، این عملیات در زمان‌های 12، 24 و 48 ساعت تکرار شد. کلیه آزمون‌ها با سه بار تکرار صورت پذیرفت و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد.

**طراحی آزمایش:** برای انجام آزمایش‌های مربوط به بررسی اثر ضدمیکروبی از طرح آزمایشی عاملی کامل در غالب طرح کاملا تصادفی استفاده شد و بررسی داده ها با نرم افزار Design-Expert صورت گرفت. در این آزمایش نوع باکتری به عنوان فاکتور کیفی ناپیوسته دو سطحی و دما و زمان گرمخانه گذاری به صورت دو فاکتور کمی 4 سطحی تعریف شدند. زمان تماس نانوذرات‌نقره با باکتری در 4 سطح (1، 12، 24 و 48 ساعت) و غلظت نانوذرات‌نقره در چهار سطح (5، 10، 25 و ppm 50) انتخاب شد. متغیر وابسته یا پاسخ سامانه میزان زنده‌مانی باکتری بود و مقدار آن با محاسبه اختلاف تعداد اولیه کلنی باکتری از تعداد نهایی کلنی باکتری (پس از تیمار با نانوذرات‌نقره) به‌دست آمد.

## • یافته‌ها

بعد از 24 ساعت کلیه بشقابک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده ابتدایی بشقابک‌ها حاکی از تشکیل هاله و عدم رشد باکتری‌ها در تیمار با غلظت ppm 50 از نانوذرات نقره در تمامی زمان‌ها بود. نتایج حاکی از عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* با غلظت $10^7$ CFU/ml در پی تماس به‌مدت 1 ساعت با نانوذرات‌نقره با غلظت ppm 50 بود. جهت ارائه اثر مستقل هر کدام از فاکتورها و اثر متقابل آنها با یکدیگر، درصد کاهش تعداد هر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* ارزیابی شد و معنی‌داری داده‌ها در سطح 0/05 درصد به دست آمد. جدول 1 نتایج آنالیز واریانس طرح عاملی کامل را نشان می‌دهد. نتایج جدول 1 نشان می‌دهد که اثر فاکتورهای مستقل زمان، نوع باکتری، غلظت نانوذرات‌نقره روی زنده‌مانی باکتری‌ها پس از طی زمان کافی تماس و همین طور اثر متقابل زمان و غلظت نانوذرات‌نقره، نوع باکتری و غلظت نانوذرات‌نقره و زمان، نوع باکتری، غلظت نانوذرات نقره در سطح 1 درصد معنی‌دار شده است. همین‌طور اثر زمان و نوع باکتری نیز در سطح 5 درصد معنی دار شده است. این نتایج بیانگر وجود رابطه‌ی خطی توأم بین سه فاکتور مورد بررسی بر درصد کاهش باکتری‌ها می‌باشد. از اطلاعاتی که می‌توان به‌وسیله آن برازش مطلوب داده‌ها را ارزیابی کرد مقادیر $R^2$، $R^2_{adj}$ و C.V یا ضریب تغییرات می‌باشد که این مقادیر عبارتند از R-Squared= 0/9974 و $R^2_{adj}$= 0/9969 و C.V = ۲/۱۱.

**جدول 1.** آنالیز واریانس (ANOVA) اثر متغیرها بر درصد کاهش تعداد باکتری‌ها با طرح عاملی کسری

| منبع | مجموع مربعات | درجه آزادی | میانگین مربعات | مقدار F | مقدار P- |
|---|---|---|---|---|---|
| معنی داری مدل | 2/027E+005 | 31 | 6538/43 | 2003/43 | < 0/0001 |
| A- زمان | 312/32 | 3 | 104/11 | 31/90 | < 0/0001 |
| B-نوع باکتری | 28316/58 | 1 | 28316/58 | 8676/42 | < 0/0001 |
| C-غلظت نانونقره | 95974/95 | 3 | 31991/65 | 9802/49 | < 0/0001 |
| AB | 29/13 | 3 | 9/71 | 2/97 | 0/0334 |
| AC | 345/00 | 9 | 38/33 | 11/75 | < 0/0001 |
| BC | 77520/25 | 3 | 25840/08 | 7917/61 | < 0/0001 |
| ABC | 193/01 | 9 | 21/45 | 6/57 | < 0/0001 |
| خطای محض | 522/18 | 1460 | 3/26 | | |
| جمع | 2/032E+005 | 191 | | | |

انحراف معیار 1/81، میانگین 85/53، R-Squared 0/9974، Adj R-Squared 0/9969، Pred R-Squared 0/9963 و CV 2/11 درصد

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

جدول 2 اثر غلظت نانوذرات‌نقره بر میزان کاهش باکتری‌ها را نشان می‌دهد که بیانگر اثر بخشی مناسب این ذرات به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی می‌باشد. نمودار 1 مقایسه میانگین اثر زمان‌های مختلف بر درصد کاهش باکتری‌ها را نشان می‌دهد. جدول 2 مقایسه میانگین بین اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات‌نقره بر درصد کاهش باکتری‌ها را نشان می‌دهد. همان‌طور که از جدول مشخص است بین غلظت‌های 5، 10 و ppm 25 یا 5، 10 و ppm 50 از نانوذرات‌نقره اختلاف معنی‌داری وجود دارد اما بین غلظت‌های 25 و ppm 50 از نانوذرات‌نقره اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و بالاترین اثر کاهش را غلظت‌های 25 و ppm 50 و کمترین اثرها را به ترتیب غلظت‌های 5 و ppm 10 از نانوذرات نقره دارند.

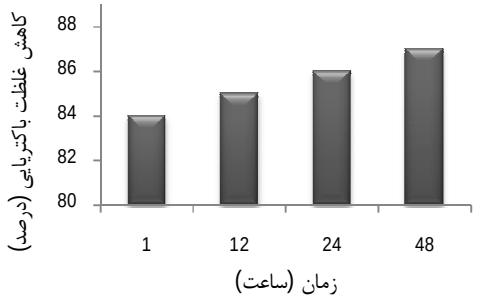
جدول 3 مقایسه میانگین اثر نوع باکتری را بر درصد کاهش آن‌ها نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود تغییر در نوع باکتری‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار در مهار میکربی را به‌همراه دارد و بیشترین کاهش بر *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد.

نمودار 2 اثر متقابل زمان و نوع باکتری را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود اثر زمان به تنهایی بر کاهش *اشرشیا کلی* موثر نبود اما با افزایش زمان از 1ساعت به 48 ساعت تعداد باکتری‌های زنده *استافیلوکوکس‌اورئوس* کاهش می‌یابد.

**جدول 2.** اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات‌نقره بر درصد کاهش باکتری‌ها*

| گروه‌بندی دانکن | کاهش غلظت باکتری (درصد) | غلظت (ppm) نانوذرات |
|---|---|---|
| C | 46/93 | 5 |
| B | 90 | 10 |
| A | 99/76 | 25 |
| A | 100 | 50 |

*24 نمونه کلی در 6 تکرار، (P<0/05)، حروف انگلیسی A تا C نشان دهنده تفاوت معنی‌دارآماری بین پاسخ سامانه یعنی درصد کاهش تعداد باکتری هستند.

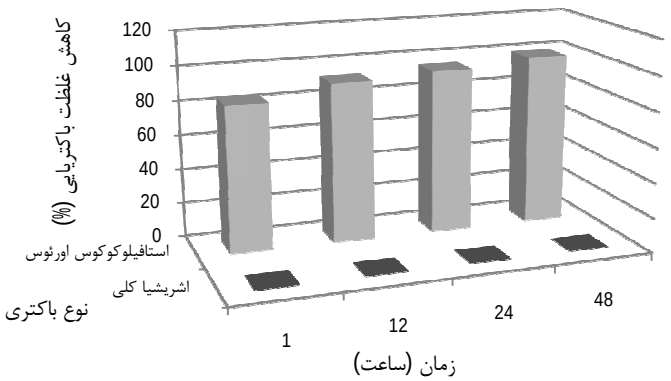



**نمودار 1.** اثر زمان‌های مختلف بر درصد کاهش باکتری‌ها در حضور نانوذرات نقره با غلظت 5ppm در دمای محیط (25°C) (P<0/05)

**جدول 3.** اثر نوع باکتری را بر درصد کاهش باکتری در حضور نانوذرات نقره با غلظت 5ppm در دمای محیط (25°C)*

| نوع باکتری | کاهش غلظت باکتری (درصد) | گروه‌بندی دانکن |
|---|---|---|
| *E.coli* | 73/38 | B |
| *S.aureus* | 97/67 | A |

* 6 بار تکرار، (P<0/05)، حروف انگلیسی A و B نشان دهنده تفاوت معنی‌دارآماری بین پاسخ سامانه یعنی درصد کاهش تعداد باکتری هستند.

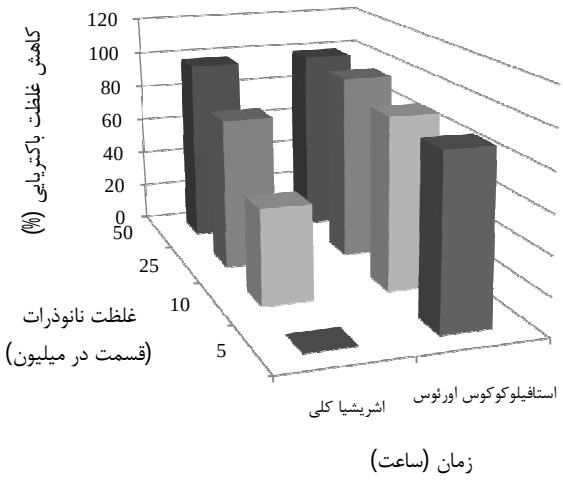



**نمودار 2.** اثر متقابل زمان و نوع باکتری بر درصد کاهش باکتری در حضور نانوذرات نقره در دمای محیط (25°C) (P<0/05)

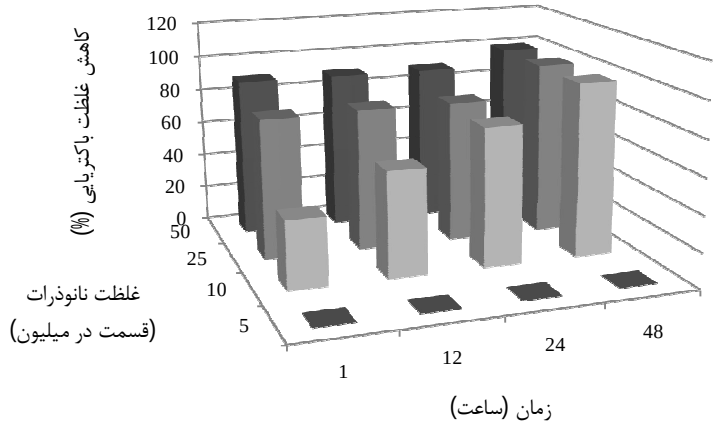
[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

نمودار 3 اثر متقابل غلظت‌نانوذرات‌نقره و نوع باکتری را بر درصد کاهش باکتری نشان می‌دهد. همان‌طور کـه مشـاهده می‌شود غلظت ppm 5 از نانوذرات‌نقره بر *اسـتافیلوکوکوس - اورئوس* اثر داشته و باعث کـاهش بـاکتری‌هـای زنـده شـده اسـت، امـا همـین غلظـت از نـانوذرات هـیچ اثـری را بـر *اشرشـیاکلی* نـدارد. شـروع بازدارنـدگی نـانوذرات‌نقـره بـر *اشرشیاکلی* از غلظت ppm 10 مشاهده می‌شود. این امـر بـه خوبی میزان کمترین غلظت بازدارنـدگی ایـن دو بـاکتری را نشان می‌دهد که برای *استافیلوکوکوس‌اورئوس* (گرم مثبـت) غلظت ppm 5 و برای *اشرشیاکلی* (گرم منفـی) غلظـت ppm 10 از نانوذرات نقره می‌باشـد. همچنـین غلظـت ppm 50 از نانوذرات نقره هر دو نوع باکتری را 100 درصد از بین می‌برد و به‌عنوان شاخصی برای از بین بردن کامل باکتری‌ها در نظر گرفته می‌شود.

همان‌طور که از نمودار 4 مشخص است غلظـت ppm 5 از نانوذرات نقره در هیچ‌یک از زمان‌ها تاثیری بر کاهش تعـداد باکتری‌ها نداشته است، اما غلظت ppm 10 از نانوذرات نقـره با افزایش زمان باعث از بین رفتن تعداد بیشتری از باکتری‌ها می‌شود. اما نکته مهم غلظت 25 و ppm 50 از نانوذرات‌نقـره می‌باشد که اثر ضدمیکروبی بسیار بالایی علیه *اشرشـیاکلی* و *استافیلوکوکس‌اورئوس* دارد و شکل به‌خوبی نشان مـی‌دهـد که زمان 1 ساعت از تماس این غلظت‌ها از نانوذرات‌نقـره بـا باکتری‌ها مذکور به‌خوبی آن‌ها را از بین می‌برد.




**نمودار 3.** اثر متقابل غلظت نانوذرات‌نقره و زمان بر درصد کاهش باکتری‌ها در دمای محیط (25°C)




**نمودار 4.** اثر متقابل غلظت نانوذرات‌نقره و نوع باکتری بر درصد کاهش باکتری در دمای محیط (25°C)

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

## • بحث

در این مطالعه از روش احیا شیمیایی برای تولید نانوذرات نقره استفاده شد و اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف آن بر دو باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *اشرشیاکلی* مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین دو متغیر دیگر نوع باکتری و زمان تماس نیز بررسی شدند. نتایج نشان داد هر سه متغیر نوع غلظت نانوذره، باکتری و زمان تماس بر مهار رشد میکربی اثر معنی‌داری داشتند. *اشرشیا کلی* در مقایسه با *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت کم مقاومت بیشتری نسبت به حضور نانوذره نشان داد. دلیل مقاومت بیشتر *اشرشیاکلی* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* تفاوت بین ساختار غشاء باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و تفاوت در ضخامت پپتیدوگلیکان آن‌ها است. باکتری‌های گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای پپتیدوگلیکان چندلایه و ضخیم هستند اما باکتری‌های گرم منفی مانند *اشرشیاکلی* دارای پپتیدوگلیکان نازک‌تری هستند اما غشاء خارجی آن‌ها دارای لیپوپلی‌ساکارید است که نفوذپذیری کمی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل ضدمیکروبی دارد. به‌همین دلیل مقاومت *اشرشیاکلی* بیشتر از *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد (34، 1).

نتایج این مطالعه نشان داد که بین نوع باکتری‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌داری وجود دارد و بیشترین کاهش بر *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. کمترین غلظت بازدارندگی نانوذرات نقره برای *استافیلوکوکوس‌اورئوس* ppm 5 و *اشرشیاکلی* ppm 10 به‌دست آمد و همچنین غلظت ppm 50 از نانوذرات نقره هر دونوع باکتری را 100 درصد از بین می‌برد. این یافته‌ها با نتایج به‌دست آمده توسط Cho و همکاران مطابقت دارد، آن‌ها نیز غلظت 5 و ppm 10 را به ترتیب برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* کمترین غلظت بازدارندگی اعلام کردند، اما غلظت ppm 50 برای *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و ppm 100 را برای *اشرشیا کلی* کشنده دانستند (6). Ruparelia و همکاران اثر نانوذرات مس و نقره را بر سوش‌های دیگری از دو باکتری مذکور بررسی کردند. نتایج نشان داد باکتری *اشرشیاکلی* در برابر هر دو نوع نانوذره مقاومت بیشتری نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد، اما این اختلاف در مورد نانوذرات نقره بیشتر است (21). قابل ذکر است غلظت نانوذره، سوش میکربی و روش تولید نانوذرات در تحقیق مذکور با این تحقیق متفاوت است. Kim و همکاران (1) و Feng و همکاران (34) نتایج متفاوتی را گزارش کرده که در آن *اشرشیا کلی* در غلظت پایین‌تری از نانوذرات نقره (نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس*) مهار شد. آن‌ها علت مقاومت بالاتر *استافیلوکوکوس‌اورئوس* را به وجود پپتیدوگلیکان ضخیم‌تر دیواره سلولی مرتبط دانستند.

Hernandez و همکاران اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره، اکسیدروی و طلا تولید شده به روش احیاء شیمیایی را بر *استرپتوکوکوس‌موتانس* نشان دادند (32). شاهوردی و همکاران نانوذرات نقره را به روش احیاء شیمیایی توسط احیاء یون‌های نقره تولید و اثرات ضدمیکروبی آن را بررسی کردند (30). Chou و همکاران اثر ضدمیکروبی نانوذرات‌نقره سنتز شده با روش احیا شیمیایی، یون‌ها و کلرید نقره را بر رشد *اشرشیا کلی* گزارش کردند (35). نانوذرات‌نقره با اثر بر دیواره سلولی باکتری‌ها باعث نابودی و مرگ آن‌ها می‌شود. Sondi و Salopek تجمع نانوذرات نقره بر دیواره سلولی باکتری‌ها و نفوذ به درون سلول را عامل مرگ باکتری می‌دانند. آن‌ها همچنین اندازه و شکل نانوذرات نقره را در اثر میکروب‌کشی آن‌ها بسیار مؤثر می‌دانند به این صورت که نانوذرات نقره با ابعاد کوچک‌تر و شکل کروی دارای اثرات میکروب‌کشی بالاتری هستند (36). Cho و همکاران گزارش کردند که سطح دیواره سلولی *اشرشیاکلی* در تماس با نانوذرات‌نقره به شدت آسیب دیده بود. عدم رشد *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *اشرشیاکلی* در بشقابک‌های تست حاوی نانودرات‌نقره با غلظت ppm 50 نشان دهنده اثر بخشی بالا و موثر نانوذرات نقره به‌وسیله از بین بردن دیواره سلولی این دو باکتری بود (6).

از آن‌جا که قوانین اتحادیه‌ی اروپا حد مجاز یون‌های نقره در مواد غذایی را به ازای هر کیلوگرم بدن mg 0/05 اعلام کرده است و نظر به این که کاربرد نانوذرات تولیدی به صورت مستقیم در توده ماده غذایی مجاز نیست، لذا به نظر می‌رسد نتایج این تحقیق در رابطه با کمترین غلظت بازدارندگی نانوذرات تولید شده در 5 و ppm 10 برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* شایستگی و کارایی لازم برای کاربردهای ضدمیکربی در صنایع غذایی را دارد. به‌علاوه، در این بررسی باکتری‌ها در طول زمان نسبت به نانوذرات‌نقره مقاومت نشان ندادند که با استفاده از این امر می‌توان این ذرات را جایگزینی مناسب به‌جای عوامل ضدمیکروبی رایج دانست.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

نتایج مطالعه حاضر فرض این‌که تولید نانوذرات‌نقره می‌تواند یک روش ساده و کم هزینه برای جلوگیری از رشد میکروب‌ها فراهم آورند را حمایت می‌کند. از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات نقره می‌توانند در غلظت‌های کم با از بین بردن باکتری *استافیلوکوکوس-اورئوس* و *اشرشیاکلی* (که دو نوع از باکتری‌های مضر در صنایع غذایی است) کمک شایانی به صنعت غذا در دنیا نماید. گرچه استفاده مستقیم نانوذرات در ماتریکس غذا توصیه نمی‌شود و برای بررسی اثرات مفید یا مضر استفاده مستقیم هر نانوذره، تحقیق‌های متعدد بالینی در حیوانات آزمایشگاهی و افراد داوطلب نیاز است. به هر حال استفاده محتاطانه این ذرات در فیلترهای ضدعفونی‌کننده، پوشش‌ها، بسته‌بندی مواد غذایی و پاکسازی خطوط تولید قابل توصیه و کاربرد است.

**سپاسگزاری:** از همکاران محترم انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور جهت حمایت از این پایان‌نامه کارشناسی ارشد سپاسگزاری می‌گردد.

## • References


1. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomed-Nanotechnol. 2007; 3: 95-101.
2. Kapoor S, Lawless D, Kennepohl P, Meisel D, Serpone N. Reduction and aggregation of silver ions in aqueous gelatin solutions. Langmuir. 1994; 10: 3018-22.
3. Costa C, Conte A, Buonocore GG, Del Nobile MA. Antimicrobial silver-montmorillonite nanoparticles to prolong the shelf life of fresh fruit salad. Int J Food Microbiol. 2011; 148(3): 164-7.
4. Bosetti M, Masse A, Tobin E, Cannas M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. Biomaterials. 2002; 23(3): 887-92.
5. Fernández A, Soriano E, López-Carballo G, Picouet P, Lloret E, Gavara R, et al. Preservation of aseptic conditions in absorbent pads by using silver nanotechnology. Food Res Int. 2009; 42(8): 1105-12.
6. Cho K-H, Park J-E, Osaka T, Park S-G. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochimica Acta. 2005; 51: 956-60.
7. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv. 2009; 27: 76-83.
8. Castellano JJ, Shafii SM, Ko F, Donate G, Wright TE, Mannari RJ, et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. Int wound J. 2007; 4: 114-22.
9. Heggers J, Richard J, Spencer B, McCoy L, Carino E, Washington J, et al. Anticoat versus Silverlon. J Burn Care Res. 2002; 23: 115.
10. Chopra I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? J Antimicrob Chemoth. 2007; 59: 587-90.
11. Demling RH, Desanti L. Effects of silver on wound management. Wounds. 2001; 13: 4-15.
12. Hugo WB, Russell AD. Types of antimicrobial agents. In: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications. 1982; 106-8.
13. Bellinger CG, Conway H. Effects of silver nitrate and sulfamylon on epithelial regeneration. Plast Reconstr Surg. 1970; 45: 582-5.
14. Moyer CA, Brentano L, Gravens DL, Margraf HW, Monafo WW. Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution. Arch Surg. 1965; 90: 812-67.
15. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005; 16: 2346-53.
16. Gurunathan S, Kalishwaralal K, Vaidyanathan R, Venkataraman D, Pandian SRK, Muniyandi J, et al. Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. Colloids and Surfaces: Biointerfaces. 2009; 74: 328-35.
17. Azeredo H. Nanocomposites for food packaging applications. Food Res Int 2009; 42: 1240-53.
18. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl Environ Microb. 2007; 73: 1712-20.
19. Dallas P, Sharma VK, Zboril R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents:


[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

Classification, synthetic paths, applications, and perspectives. Adv Colloid Interface Sci. 2011; 166: 119-35.

20. Marambio-Jones C, Hoek E. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J Nanopart Res. 2010; 12(5): 1531-51.
21. Ruparelia JP, Duttagupta SP, Chatterjee AK, Mukherji SM. A comparative study on disinfection potential of nanosilver and nanonickel. Technical poster, Proceedings of the 9th Annual Conference of the Indian Environmental Association, entitled ‘‘Advances in Environmental Management and Technology”, Goa, India, 2006; 21–3.
22. Nersisyan HH, Lee JH, Son HT, Won CW, Maeng DY. A new and effective chemical reduction method for preparation of nanosized silver powder and colloid dispersion. Mater Res Bull. 2003; 38: 949-56.
23. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Adv Drug Deliv Rev. 2005; 57: 1451-70.
24. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. Nanotechnology. 2007; 18: 103-12.
25. Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. J Phys Chem. 2006; 110(33): 16248-53.
26. Henglein A. Physicochemical properties of small metal particles in solution: "microelectrode" reactions, chemisorptions, composite metal particles, and the atom-to-metal transition. *J Phys Chem.* 1993; *97*(21): 5457-64.
27. Wright GD. Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. Chem Biol. 2000; 7: 127-32.
28. Souza GIH, Marcato PD, Duran N, Esposito E. Utilization of *Fusarium oxysporum* in the biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activities. Presented at Xth National Meeting of Environmental Microbiology, Curtiba, PR (Brazil). 2004; p 25.
29. Ma H, Yin B, Wang S, Jiao Y, Pan W, Huang S, et al. Synthesis of silver and gold nanoparticles by a novel electrochemical method. Chem Phys Chem. 2004; 5: 68-75.
30. Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Nanomed-Nanotechnol. 2007; 3: 168-71.
31. Zielińska A, Skwarek E, Zaleska A, Gazda M, Hupka J. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. Procedia Chem. 2009; 1: 1560-6.
32. Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Cruz Pena DC, Martínez-Gutiérrez F, Martínez AE, de Jesús Pozos Guillén A, et al. The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. Nanomed-Nanotechnol. 2008; 4: 237-40.
33. Shirley A, Sreedhar B, Dastasger SG. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized from novel Streptomyces species. Dig J Nanomater Bios. 2010; 5: 447-51.
34. Feng Q, Wu J, Chen G, Cui F, Kim T, Kim J. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and *Staphylococcus aureus*. J Biomed Mater Res. 2000; 52: 662-8.
35. Chou KS, Ren CY. Synthesis of nanosized silver particles by chemical reduction method. Mater Chem Phys. 2000; 64: 241–246.
36. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interf Sci. 2004; 275: 177-82.

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]

# Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by chemical reduction on *Staphylococcus aureus* and *Escheirchia coli*

*Asadi M[1], Khosravi-Darani K[*2], Mortazavi SA[3], Hajseyed Javadi N[4], Azadnia E[5], Kiani Harchegani AA[6], Ahmadi N[7]*

1- *M.Sc in Agriculture Engineering-Food Technology, Dept. of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran*

2- *Corresponding author: Associate Prof. (in Research), Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: kiankh@yahoo.com*

3- *Prof, Dept. of Food Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran*

4- *MD, Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

5- *M.Sc. Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences,*

6- *M.Sc in Chemistry - Physics, Faculty of Chemistry, Tabriz University, Tabriz, Iran*

7- *M.Sc. Students' Research Committee, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

**Received 24 Sept, 2013** **Accepted 5 Jan, 2014**

**Background and Objective:** Due to development of microbial resistance against chemical antimicrobial agents, recently, special attention has been paid to effects of silver nanoparticles and its the antimicrobial impact. In this study the antibacterial effects of different concentrations of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was investigated.

**Materials and Methods:** Silver nanoparticles were produced by chemical reduction. Manitol salt agar media and eosin methylene blue media were used as specific media for *S. aureus* and *E. coli*, respectively, and Mueller-Hinton media was used to examine the antimicrobial properties of the cultures. Trials were conducted in a completely randomized full factorial design with 6 replications ($P < 0.05$). One qualitative factor was kind of bacteriumin and two other quantititative factors were duration of microbial contact with nanosilver (1, 12, 24, 48 h) and concentration of nanoparticles (5, 10, 25, 50 ppm).

**Results:** The results showed that all three factors have significant impacts on microbial growth, but kind of bacterium and nanoparticle concentration showed more significantinfluence in comparison to contact time. In low concentration of nanosilver, *E. coli* showed more resistant to presence of nanparticle incomparison to *S. aureus*. The minimum inhibitory concentration of silver nanoparticles for *S. aureus* and *E. coli* was 5 and 10 ppm. A concentration of 50 ppm of silver nanoparticles completely eliminated both bacteria.

**Conclusion:** The results suggest that effective factors on antimicrobial activities of silver nanoparticles are the type of bacteria, exposure time to silver nanoparticles, and concentration of nanoparticles. *E. coli* were significantly more resistant to silver nanoparticles in comparison to *S. aureus*.

**Keywords:** Silver nanoparticles, *Staphylococcus aureus, Escherichia coli,* Antimicrobial activity

[ Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07 ]