

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

مهداد اسدی اسدآباد¹، کیانوش خسروی دارانی²، علی مرتضوی³، نسرين حاج سيد جوادى⁴، ابراهيم آزادنيا⁵، آيت الله کياني هرچگاني⁶، نگين احمدی⁷

- 1- دانش آموخته 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- دانش آموخته کارشناسی ارشد شیمی- فیزیک، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، ایران
- 7- کمیته پژوهشی دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: 92/10/15

تاریخ دریافت: 92/7/2

چکیده

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

مواد و روش‌ها: نانوذرات نقره به روش احیای شیمیایی تولید شدند. محیط‌های کشت مانیتول سالت آگار و اتوزین متیلن‌بلو به ترتیب به عنوان محیط کشت‌های اختصاصی استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی و محیط مولر هینتون آگار به عنوان محیط کشت برای بررسی خواص ضد- میکروبی استفاده شد. برای بررسی اثر ضد میکروبی از طرح آزمایشی عاملی کامل استفاده و تیمارها در قالب کاملاً 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 نانوذرات نقره 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 میکروبی داشتند، اما متغیرهای نوع باکتری و غلظت نانوذره در مقایسه با زمان تماس تأثیر بیشتری نشان دادند. اشرشیاکلی در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت کم مقاومت بیشتری نسبت به حضور نانوذره نشان داد. غلظت 5 و 10 ppm 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 ضد میکروبی نانوذرات نقره است. باکتری اشرشیاکلی نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس در مقابل نانوذرات نقره سنتز شده به روش احیای الکتروشیمیایی مقاومت بیشتری نشان داد.

واژگان کلیدی: نانوذرات نقره، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، اثر ضد میکروبی، احیا شیمیایی

• مقدمه

و سمیت اندک یون‌های آزاد آن برای سلول‌های پستانداران،
علاقه برای استفاده از این نانوذرات جهت کاربردهای غذایی
در حال افزایش است (4). با این حال قوانین اتحادیه‌ی اروپا

در بین فلزات طبیعی یون‌های نقره دارای خواص
ضد میکروبی شدیدی علیه بسیاری از گونه‌های باکتریایی
است (3-1). به دلیل ویژگی ضد میکروبی فوق العاده‌ی نقره

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 (22-26). در تمام این روش‌ها مشکل اساسی تمایل به لخته شدن ذرات کلوئیدی درون محلول است. (27). روش‌های فیزیکی به علت 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 به علت سهولت کنترل شرایط واکنش، کم هزینه بودن و ساده بودن تجهیزات و مواد اولیه رایج هستند. از میان روش‌های شیمیایی، روش احیاء شیمیایی به علت 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 نانوذرات نقره احیاء کرده و توسط یک پایدار کننده مناسب از به هم پیوستن ذرات جلوگیری می‌شود و کنترل شرایط فرآیند در این روش برای به دست آوردن ذرات با اندازه، شکل و توزیع یکسان، بسیار مهم است.

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

• مواد و روش‌ها

کشت لیوفیلیزه باکتری‌های *شرشیاکلی* 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 فعال سازی 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 گلیسرین 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

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 (7-9). در دهه 1940 میلادی بعد از کشف پنی سیلین استفاده از نقره به حداقل رسید (10-12). هنگامی که 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 (13، 14). 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. نانوذرات نقره به علت 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 نانوذرات نقره دارای اثر میکروب کشی بالاتری نسبت به توده فلز نقره هستند (16-18).

سازوکار دقیق اثر نانوذرات نقره 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 دهنده الکترون مثل گوگرد، اکسیژن یا نیتروژن در مولکول‌های زیستی متصل شوند (20). Cho و همکاران در سال 2005 کمترین غلظت بازدارندگی نانوذرات نقره و نانوذرات پلاتین را بر روی توقف رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیاکلی* مطالعه کردند (6). همچنین Ruparelia و همکاران در سال 2006 اثر نانوذرات نقره را علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیاکلی* بررسی کردند (21).

روش‌های بسیار متنوع فیزیکی و شیمیایی برای سنتز نانوذرات وجود دارد که به طور مثال می‌توان به روش‌های

نوترینت‌براث با غلظت 10^8 CFU/ml تهیه شد. شایان ذکر است که سرمپلرها 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/شرشیاکی می‌باشند. سپس میزان 1 ml از هر دو سری لوله با سمپلر به لوله‌های حاوی 9 ml آب پپتونه اضافه شد و مجدداً 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 ائوزین متیلن بلو به‌عنوان محیط کشت اختصاصی باکتری/شرشیاکی و محیط مانیتول سالت آگار به‌عنوان محیط کشت اختصاصی باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس و نیز محیط مولر هینتون آگار برای بررسی اثر ضد میکروبی استفاده شدند (33، 30، 1). محیط‌های کشت تهیه، استریل و درون بشقابک‌ها قرار داده شدند. سپس میزان 0/1 ml از غلظت‌های مختلف باکتری در محیط کشت‌های یاد شده به‌عنوان بشقابک‌های کنترل کشت داده شدند. آن‌گاه میزان 1 ml محلول کلونیدی نانوذرات نقره با غلظت 50 ppm به‌وسیله سمپلر به لوله آزمایش حاوی سوسپانسیون آب پپتونه و باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس و/شرشیاکی غلظت 10^3 CFU/ml اضافه شد. سپس این کار را برای تمامی غلظت‌های 10^3 - 10^7 CFU/ml از باکتری‌های/استافیلوکوکوس/اورئوس و/شرشیاکی انجام گرفت و لوله‌های آزمایش برای تماس کامل نانوذرات نقره با باکتری روی تکانه قرار گرفت. سپس به مدت 1 ساعت در دمای محیط (25°C) قرار گرفته تا اثر نانوذرات نقره روی باکتری‌ها مشخص شود (33، 32، 30، 1). تمامی عملیات یاد شده برای غلظت‌های 5، 10 و 25 ppm از محلول کلونیدی 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 مانیتول سالت آگار، ائوزین متیلن بلو و مولر هینتون آگار در کنار شعله، 0/1 ml از محلول حاوی نانوذرات نقره،/استافیلوکوکوس/اورئوس و/شرشیاکی (10^3 CFU/ml) اضافه شد. این کار را برای تمامی غلظت‌های باکتریایی/استافیلوکوکوس/اورئوس و/شرشیاکی که در تماس با نانوذرات نقره بودند تکرار شد. در انتها تمامی بشقابک‌های

کشت‌های مانیتول سالت آگار و مولر هینتون آگار و نوترینت-براث و ائوزین متیلن بلو (شرکت مرک آلمان).

تولید نانوذرات: ابتدا پایدارکننده پلی‌وینیل‌پیرولیدون 55000 توزین و در بالن دو دهانه 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 نمک نقره به‌همراه احیاء کننده (تانول) 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 نانوذرات نقره 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 کاملاً 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/شرشیاکی 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/شرشیاکی فعال در محیط

نقره در تمامی زمان‌ها بود. نتایج حاکی از عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیاکلی* با غلظت 10^7 CFU/ml در پی تماس به مدت 1 ساعت با نانوذرات نقره با غلظت 50 ppm بود. جهت ارائه اثر مستقل هر کدام از فاکتورها و اثر متقابل آنها با یکدیگر، درصد کاهش تعداد هر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیاکلی* ارزیابی شد و معنی داری 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 نانوذرات نقره روی زنده‌مانی باکتری‌ها پس از طی زمان کافی تماس و همین طور اثر متقابل زمان و غلظت نانوذرات نقره، نوع باکتری و غلظت نانوذرات نقره و زمان، نوع باکتری، غلظت نانوذرات نقره در سطح 1 درصد معنی دار 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 به وسیله 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 $R\text{-Squared}=0/9974$ و $R^2_{adj}=0/9969$ و $C.V=2/11$.

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 نانوذرات نقره علیه دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیاکلی*، این عملیات در زمان‌های 12، 24 و 48 ساعت تکرار شد. کلیه آزمون‌ها با سه بار تکرار صورت پذیرفت و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد.

طراحی آزمایش: برای انجام آزمایش‌های مربوط به بررسی اثر ضد میکروبی از طرح آزمایشی عاملی کامل در غالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد و بررسی داده‌ها 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 نانوذرات نقره با باکتری در 4 سطح (1، 12، 24 و 48 ساعت) و غلظت نانوذرات نقره در چهار سطح (5، 10، 25 و 50 ppm) 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 نانوذرات نقره) به دست 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 50 ppm از نانوذرات

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

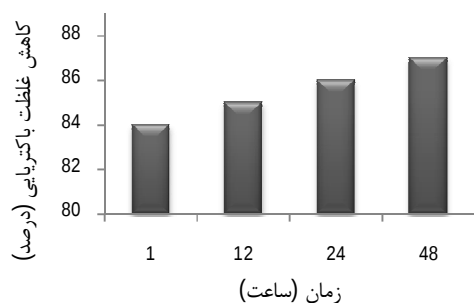
منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P
معنی داری مدل	2/027E+005	31	6538/43	2003/43	< 0/0001
زمان A-	312/32	3	104/11	31/90	< 0/0001
نوع باکتری-B	28316/58	1	28316/58	8676/42	< 0/0001
غلظت نانوذرات نقره-C	95974/95	3	31991/65	9802/49	< 0/0001
AB	29/13	3	9/71	2/97	0/0334
AC	345/00	9	38/33	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، $R\text{-Squared}=0/9974$ ، $\text{Adj R-Squared}=0/9969$ ، $\text{Pred R-Squared}=0/9963$ و CV 2/11 درصد

جدول 2. اثر غلظت‌های نانوذرات نقره بر درصد کاهش باکتری‌ها*

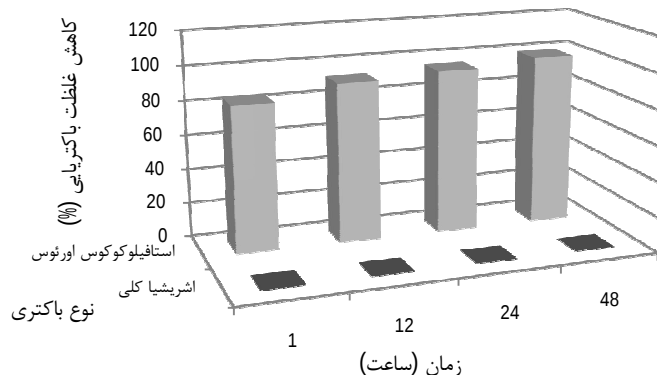
غلظت (ppm)	کاهش غلظت باکتری (درصد)	گروه‌بندی دانکن
نانوذرات		
5	46/93	C
10	90	B
25	99/76	A
50	100	A

* 24 نمونه کلی در 6 تکرار، ($P<0/05$)، حروف انگلیسی A تا C نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری 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
<i>E.coli</i>	73/38	B
<i>S.aureus</i>	97/67	A

* 6 بار تکرار، ($P<0/05$)، حروف انگلیسی A و B نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری 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) ($P<0/05$)

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

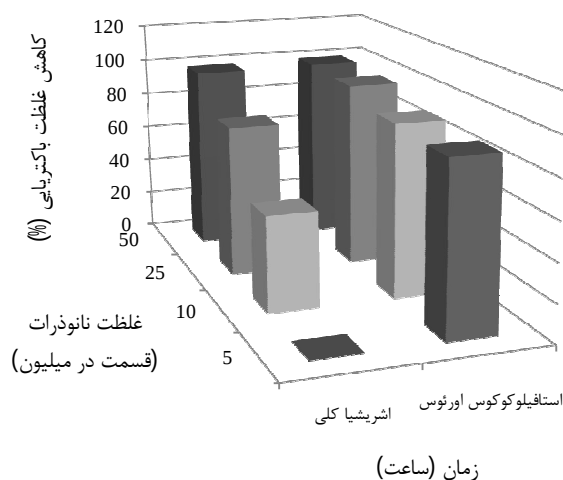
جدول 3 مقایسه میانگین اثر نوع باکتری را بر درصد کاهش آن‌ها نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود تغییر در نوع باکتری‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار در مهار میکروبی را به همراه دارد و بیشترین کاهش بر *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد.

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 1 ساعت به 48 ساعت تعداد باکتری‌های زنده *استافیلوکوکوس اورئوس* کاهش می‌یابد.

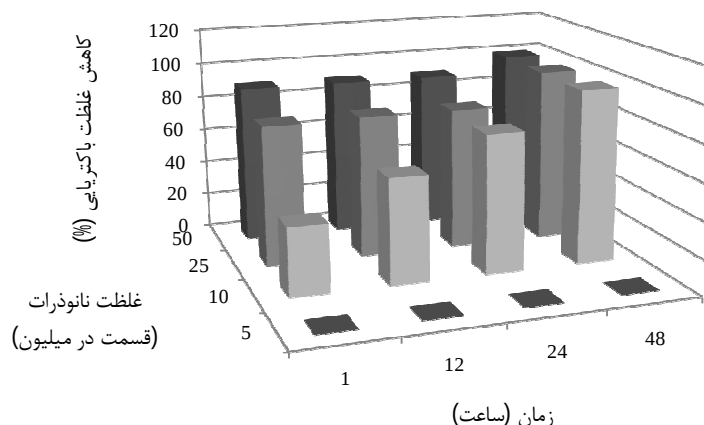
و به عنوان شاخصی برای از بین بردن کامل باکتری‌ها در نظر گرفته می‌شود.

همان‌طور که از نمودار 4 مشخص است غلظت 5 ppm از نانوذرات نقره در هیچ‌یک از زمان‌ها تاثیری بر کاهش تعداد باکتری‌ها نداشته است، اما غلظت 10 ppm از نانوذرات نقره با افزایش زمان باعث از بین رفتن تعداد بیشتری از باکتری‌ها می‌شود. اما نکته مهم غلظت 25 و 50 ppm از نانوذرات نقره می‌باشد که اثر ضد میکروبی بسیار بالایی علیه /شرشیا کلی و /استافیلوکوکوس/ورئوس دارد و شکل به خوبی نشان می‌دهد که زمان 1 ساعت از تماس این غلظت‌ها از نانوذرات نقره با باکتری‌ها مذکور به خوبی آن‌ها را از بین می‌برد.

نمودار 3 اثر متقابل غلظت نانوذرات نقره و نوع باکتری را بر درصد کاهش باکتری نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود غلظت 5 ppm از نانوذرات نقره بر /استافیلوکوکوس - /ورئوس اثر داشته و باعث کاهش باکتری‌های زنده شده است، اما همین غلظت از نانوذرات هیچ اثری را بر /شرشیا کلی ندارد. شروع بازدارندگی نانوذرات نقره بر /شرشیا کلی از غلظت 10 ppm مشاهده می‌شود. این امر به خوبی میزان کمترین غلظت بازدارندگی این دو باکتری را نشان می‌دهد که برای /استافیلوکوکوس/ورئوس (گرم مثبت) غلظت 5 ppm و برای /شرشیا کلی (گرم منفی) غلظت 10 ppm از نانوذرات نقره می‌باشد. همچنین غلظت 50 ppm از نانوذرات نقره هر دو نوع باکتری را 100 درصد از بین می‌برد.



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



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

• بحث

را گزارش کرده که در آن *اشرشیا کلی* در غلظت پایین تری از نانوذرات نقره (نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس*) مهار شد. آن‌ها علت مقاومت بالاتر *استافیلوکوکوس اورئوس* را به وجود پپتیدوگلیکان ضخیم‌تر دیواره سلولی مرتبط دانستند.

Hernandez و همکاران اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره، اکسیدروی و طلا تولید شده به روش احیاء شیمیایی را بر *استرپتوکوکوس موتانس* نشان دادند (32). شاهرودی و همکاران نانوذرات نقره را به روش احیاء شیمیایی توسط احیاء یون‌های نقره تولید و اثرات ضد میکروبی آن را بررسی کردند (30). Chou و همکاران اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده با روش احیاء شیمیایی، یون‌ها و کلرید نقره را بر رشد *اشرشیا کلی* گزارش کردند (35). نانوذرات نقره 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 *اشرشیا کلی* در تماس با نانوذرات نقره به شدت آسیب دیده بود. عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* در بشقاب‌های تست حاوی نانوذرات نقره با غلظت 50 ppm نشان دهنده اثر بخشی بالا و مؤثر نانوذرات نقره به‌وسیله از بین بردن دیواره سلولی این دو باکتری بود (6).

از آن‌جا که قوانین اتحادیه اروپا حد مجاز یون‌های نقره در مواد غذایی را به ازای هر کیلوگرم بدن 0/05 mg 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 بازاریابی نانوذرات تولید شده در 5 و 10 ppm برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* شایستگی و کارایی لازم برای کاربردهای ضد میکروبی در صنایع غذایی را دارد. به‌علاوه، در این بررسی باکتری‌ها در طول زمان نسبت به نانوذرات نقره مقاومت نشان ندادند که با استفاده از این امر می‌توان این ذرات را جایگزینی مناسب به‌جای عوامل ضد میکروبی رایج دانست.

در این مطالعه از روش احیاء شیمیایی برای تولید نانوذرات نقره استفاده شد و اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف آن بر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* 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 میکروبی اثر معنی‌داری داشتند. *اشرشیا کلی* در مقایسه با *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت کم مقاومت بیشتری نسبت به حضور نانوذره نشان داد. دلیل مقاومت بیشتر *اشرشیا کلی* 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 *اشرشیا کلی* دارای پپتیدوگلیکان نازک‌تری هستند اما غشاء خارجی آن‌ها دارای لیپوپلی ساکارید است که نفوذپذیری کمی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل ضد میکروبی دارد. به‌همین دلیل مقاومت *اشرشیا کلی* 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 *استافیلوکوکوس اورئوس* 5 ppm و *اشرشیا کلی* 10 ppm به‌دست آمد و همچنین غلظت 50 ppm از نانوذرات نقره هر دو نوع باکتری را 100 درصد از بین می‌برد. این یافته‌ها با نتایج به‌دست آمده توسط Cho و همکاران مطابقت دارد، آن‌ها نیز غلظت 5 و 10 ppm را به ترتیب برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* کمترین غلظت بازدارندگی اعلام کردند، اما غلظت 50 ppm برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و 100 ppm 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 *اشرشیا کلی* 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 میکروبی و روش تولید نانوذرات در تحقیق مذکور با این تحقیق متفاوت است. Kim و همکاران (1) و Feng و همکاران (34) نتایج متفاوتی

مستقیم هر نانوذره، تحقیق‌های متعدد بالینی در حیوانات آزمایشگاهی و افراد داوطلب نیاز است. به هر حال استفاده محتاطانه این ذرات در فیلترهای ضد عفونی کننده، پوشش‌ها، بسته بندی 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 پایان نامه کارشناسی ارشد سپاسگزاری می گردد.

نتایج مطالعه حاضر فرض این که تولید نانوذرات نقره می تواند یک روش ساده و کم هزینه برای جلوگیری از رشد میکروب‌ها فراهم آورند را حمایت می کند. از این تحقیق می توان نتیجه گرفت که نانوذرات نقره می توانند در غلظت‌های کم با از بین بردن باکتری / استافیلوکوکوس - اورئوس و / شرشیاکلی (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 نمی شود و برای بررسی اثرات مفید یا مضر استفاده

• References

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv.* 2009; 27: 76-83.
- 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.
- Hegggers J, Richard J, Spencer B, McCoy L, Carino E, Washington J, et al. Anticoat versus Silverlon. *J Burn Care Res.* 2002; 23: 115.
- 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.
- Demling RH, Desanti L. Effects of silver on wound management. *Wounds.* 2001; 13: 4-15.
- 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.
- Bellinger CG, Conway H. Effects of silver nitrate and sulfamylon on epithelial regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1970; 45: 582-5.
- Moyer CA, Brentano L, Gravens DL, Margraf HW, Monafó WW. Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution. *Arch Surg.* 1965; 90: 812-67.
- 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.
- 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.
- Azeredo H. Nanocomposites for food packaging applications. *Food Res Int* 2009; 42: 1240-53.
- 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.
- Dallas P, Sharma VK, Zboril R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents:

- 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, Duttgupta 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, Pucek 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, Curitiba, 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, Dastager 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.

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

Asadi M¹, Khosravi-Darani K^{*2}, Mortazavi SA³, Hajseyed Javadi N⁴, Azadnia E⁵,
Kiani Harchegani AA⁶, Ahmadi N⁷

- 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 bacterium and two other quantitative 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 significant influence in comparison to contact time. In low concentration of nanosilver, *E. coli* showed more resistant to presence of nanoparticle in comparison 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