مقایسه تأثیر محلول کلوییدی نانونقره و بیوساید صنعتی E-265 بر تنفس و تشکیل بیوفیلم باکتریایی به‌روش میکروتیترپلیت

سمانه شاهرخ[1] گیتی امتیازی[2]

(دریافت ۸۹/۹/۱۰ پذیرش ۹۰/۸/۱۲)

چکیده

نانوذرات نقره به‌دلیل خواص ضد میکربی بی‌نظیر و سمّیت کم نسبت به سلول‌های پستانداران به یکی از رایج‌ترین نانوذرات در محصولات مصرفی تبدیل گشته‌اند. امروزه در زمینه تصفیه آب از نانوذرات به‌منظور تشخیص و حذف مواد بیولوژیکی و شیمیایی استفاده می‌شود. بنابراین به‌دنبال 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 ۱۰± ۴۰ نانومتر) به‌روش میکروتیترپلیت 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 ppm ۲۰ و ppm ۴۰ سبب افزایش صد درصدی تشکیل بیوفیلم در ایزوله A_1 شد. همچنین مشخص شد که غلظتهای پایینی از نانونقره (ppm ۲-۱)، فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم بی‌نظیری نشان می‌دهند و بنابراین می‌توان آن را به‌عنوان یک بیوساید مناسب به‌منظور استفاده در سیستم‌های گردشی آب پیشنهاد نمود.

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

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

Samaneh Shahrokh [1] *Giti Emtiazi [2]*

(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 A1. 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.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، (نویسنده مسئول)
۰۹۱۳۰۱۳۹۱۲۰ s.shahrokh143@yahoo.com
۲- استاد گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان

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

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

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 توجیه کننده طرحهای استفاده مجدد از حجم بالای آب احیا شده است. سیستم‌های خنک کننده بزرگ‌ترین مصرف کنندگان 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 خنک کننده با سه مسئله مهم شامل جرم گرفتگی[1]، خوردگی[2] و مسدود شدگی[3] مواجه است. در این سیستم‌ها اغلب از بیوسایدها در آب گردشی خنک کننده‌ها به‌منظور کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها، جلبک‌ها و ماکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. همچنین بسیاری از تسهیلات صنعتی، برجهای خنک کننده 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 بهره گرفته 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 خنک کننده آب به‌منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها که می‌توانند از انتقال گرما از طریق سطوح تبادل کننده جلوگیری کنند، استفاده می‌شوند. این ترکیبات همچنین به‌منظور جلوگیری از رشد گسترده ارگانیسم‌ها که سبب مسدود شدگی پایپ‌ها[4]، لوله‌ها و سایر تجهیزات سیستم و نیز منجر به جریان غیر کارای آب در خنک کننده‌ها 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 گردشی، تکنولوژی‌های جدید را برای عفونت‌زدایی کارا و کنترل میکربی به کمک فرا می‌خوانند. 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 ویروس‌ها آسیب می‌رسانند مثل TiO_2، ZnO و فولرول[5]، آسیب به پوشش سلولی باکتریایی مثل پپتیدها، کیتوزان، کربوکسی فولرن[6]، 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 خنک کننده‌ها به‌ویژه خنک کننده 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 خنک کننده پالایشگاه

باکتری‌های پاتوژن انسان شامل *اشریشیاکلی*[7] و *استافیلوکوکوس آرئوس*[8] از آزمایشگاه میکرب شناسی دانشگاه اصفهان تهیه شدند.

به‌منظور جداسازی باکتری از نمونه آب خنک کننده A پالایشگاه نفت اصفهان، رقتهای مناسب از آن تهیه شد و ۱۰۰

[1] Scaling
[2] Biocorrosion
[3] Biofouling
[4] Pipes

[5] Fullerol
[6] Carboxyfullerene
[7] *Escherichia coli ATCC 1339*
[8] *Staphylococcus aureus ATCC 25923*

www.SID.ir
Archive of SID

میکرولیتر از هر رقت به‌روش پخش[1] در محیط نوترینت آگار تلقیح گردید و در ۲۸ درجه سلسیوس به‌مدت 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 میکربی مورد نیاز برای تشخیص جنس باکتری‌ها انتخاب و انجام شدند.

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

در این تحقیق بیوساید E-265 از پالایشگاه نفت اصفهان و محلول کلوییدی نانونقره با غلظت ppm۲۰۰۰ از شرکت نانوسید تهیه شدند.

۲-۳- تعیین میزان حداقل غلظت مهارکننده[2] و حداقل غلظت کشندگی[3] 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 میکربی 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 میکربی 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 ppm۸ یا بیوساید E-265، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ppm۸۰ به‌ترتیب 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[4] 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 و پلیت‌ها به‌مدت 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 به‌شدت تکان داده شدند. پس از شستشو به چاهکها ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه به‌منظور 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 ویوله ۱ درصد به‌مدت 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 به‌ذکر 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

$$\text{Percentage reduction} = \left[\frac{(C-B)-(T-B)}{(C-B)}\right]\times 100 \quad (۱)$$

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[5] مشخص گردید. TTC محلول در آب و پتانسیل کاهشی آن در حدود ۰/۰۸V- است و می‌تواند به‌عنوان یک پذیرنده الکترون برای هیدروژنازهای متفاوت عمل کند. تقریباً تمام

[1] Spread
[2] Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
[3] Minimum Bactericidal Concentration (MBC)
[4] Elisa Reader
[5] Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC)

www.SID.ir
Archive of SID

میکروارگانیسم‌ها توانایی احیای TTC به تری فنیل فومارازان (TPF) را دارند که جذب آن می‌تواند از طریق رنگ سنجی در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شود. به‌منظور تهیه محلول TTC ابتدا بافر آن تهیه شد به این صورت که ۱۲/۱ گرم از ترکیب تریس هیدروکسی آمینومتان[1] 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 به‌همین دلیل باید اطراف ظرف حاوی محلول آن فویل آلومینیومی پیچیده شود و یا یک ظرف با جداره تاریک برای نگهداری آن انتخاب گردد.

به‌منظور 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 نرم‌افزار SPSS (آنالیز واریانس یک طرفه[2] و آزمون دانکن[3]) انجام شد و معنی‌داری داده‌ها در سطح ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

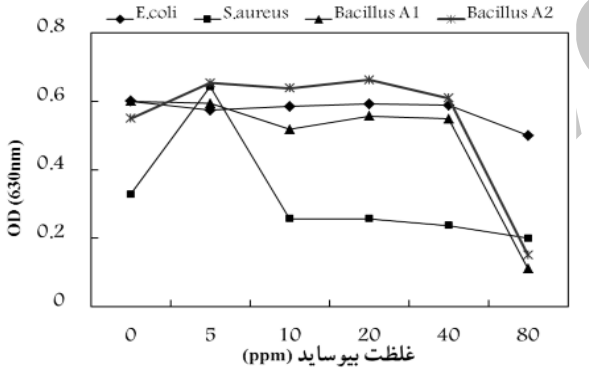
۳- نتایج

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

با توجه به تست‌های انجام شده و نتایج به‌دست آمده مطابق جدول ۱ هر دو سویه از جنس *باسیلوس*[4] بودند که با توجه به مشخصات متفاوت کلونی بر روی پلیت به‌صورت سویه‌های *باسیلوس* A_1 و A_2 نامگذاری شدند.

۳-۲- 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 ۴۰ppm آن در ایزوله A_2، سبب افزایش معنی‌دار رشد نسبت به شاهد شد. در هر دو ایزوله، غلظت ۸۰ppm 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

[1] Tris(hydroxyl methyl)-amino Methane
[2] One Way ANOVA
[3] Duncan test
[4] *Bacillus*

جدول ۱- شناسایی اولیه باکتری‌های گرم مثبت

سویه‌های جداسازی شده	شکل	اسید فاست	اسپور	حرکت	رشد هوازی	رشد بی‌هوازی	کاتاز	اکسیداز	تولید اسید از گلوکز
ایزوله A_1	میله‌ای	–	+	–	+	–	+	_	+
ایزوله A_2	میله‌ای	–	+	–	+	–	+	_	+

www.SID.ir

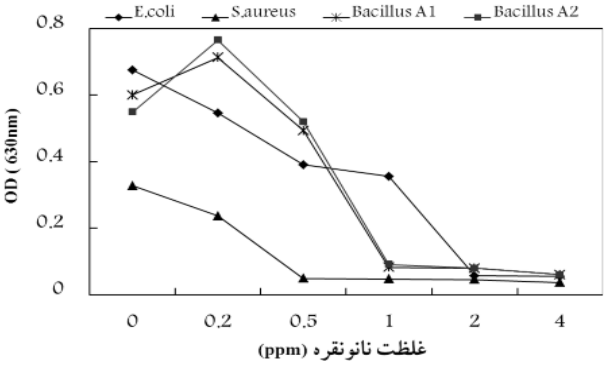
کاهش رشد در غلظتهای مختلف، تفاوت معنی‌داری نسبت به هم نداشتند. جالب اینکه در *S.aureus* غلظت ppm ۵ سبب تحریک و افزایش معنی‌دار رشد نسبت به شاهد گردیده و غلظتهای بالاتر کاهش رشد را نشان داد.

به‌منظور تعیین فعالیت ضد میکربی نانوذرات نقره در محلول کلوییدی، میزان رشد دو باکتری پاتوژن رایج *E.coli* و *S.aureus* و همچنین ایزوله‌ها در حضور غلظتهای مختلف این ذرات ارزیابی شد. نتایج حاصل از تعیین MIC و MBC محلول کلوییدی نانونقره در جدول ۲ آورده شده است. همچنین اثرات محلول کلوییدی نانونقره بر رشد ۲۴ ساعته باکتری‌های مورد مطالعه ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود، غلظتهای مختلف محلول کلوییدی نانونقره (۰/۲۵ تا ppm ۴) سبب کاهش معنی‌دار رشد در *E.coli* و *S.aureus* و ایزوله‌ها در محیط نوترینت براث شده است.

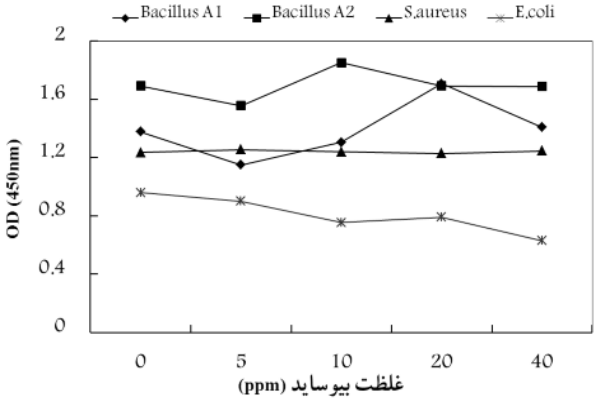
در قسمت دیگری از این آزمایش، تنفس سلولی به‌عنوان نمادی از زنده بودن باکتری‌های مورد مطالعه در حضور غلظتهای مختلف هر دو بیوساید مورد سنجش قرار گرفت. مشابه با اثر غلظتهای مختلف بیوساید بر رشد ایزوله‌ها و در تأیید این نتایج، همان‌طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌گردد این غلظتها اثر معنی‌داری بر کاهش تنفس سلولی این ایزوله‌ها نشان نمی‌دهد. در ارتباط با غلظتهای مختلف نانونقره نیز به‌طور کلی نمودارها در شکل ۴ الگوی مشابهی را نشان می‌دهند به این صورت که در غلظت MIC نانونقره برای هر باکتری، میزان تنفس سلولی به کمترین حد خود رسیده و سپس در غلظتهای بالاتر دوباره افزایش یافته است.

جدول۲- تعیین MIC و MBC نانونقره بر روی باکتری‌های مورد مطالعه

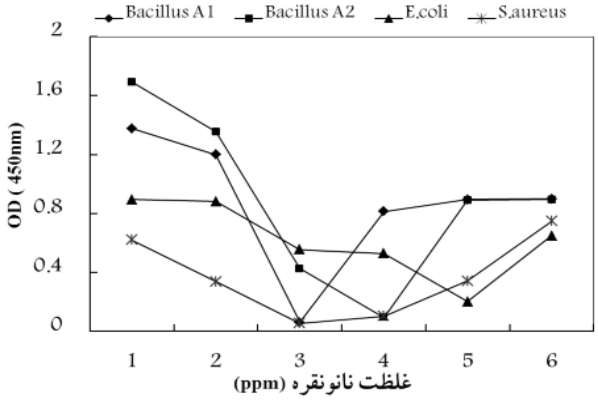
باکتری‌ها	MIC (ppm)	MBC (ppm)
E.coli	۲	۸
S.aureus	۰/۵	۲
Bacillus A_1	۱	۲
Bacillus A_2	۱	۲



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



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 نانونقره

۳-۳- مقایسه اثر غلظتهای مختلف بیوساید E-265 و محلول کلوییدی نانونقره بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه

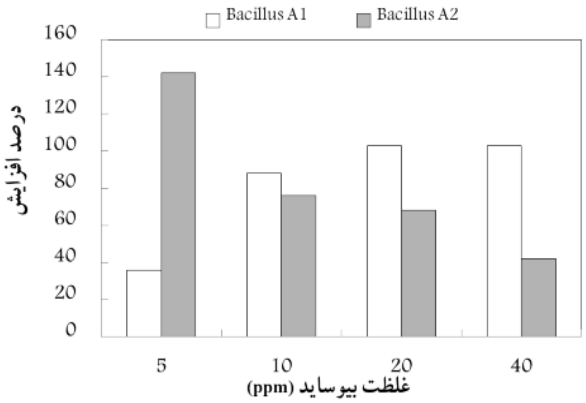
به‌منظور سنجش میزان کارایی بیوسایدهای مورد نظر، اثرات آنها بر تشکیل بیوفیلم باکتریایی مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۵ درصد افزایش تشکیل بیوفیلم را در حضور غلظتهای مختلف بیوساید صنعتی در ایزوله‌های A_1 و A_2 نشان می‌دهد. نتایج نشان دهنده این مطلب است که حتی غلظتهای بالای این بیوساید (۲۰ppm و ۴۰ppm) سبب افزایش صد درصدی تشکیل بیوفیلم در ایزوله A_1 شده است.

شکلهای ۶ تا ۸ نشان می‌دهند که غلظت ppm ۰/۲۵ نانونقره 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 و ppm ۰/۵ نانونقره نسبت به شاهد معنی‌دار است. همان‌طور که انتظار می‌رود غلظتهای بالاتر نانونقره سبب کاهش معنی‌دار تشکیل بیوفیلم نسبت به شاهد شده‌اند. در مورد *S.aureus* مشخص می‌شود که

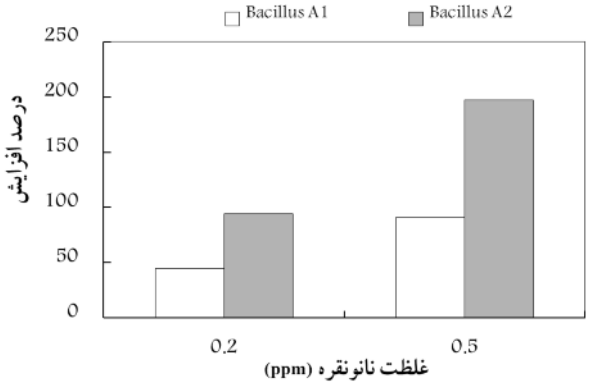
Archive of SID

www.SID.ir

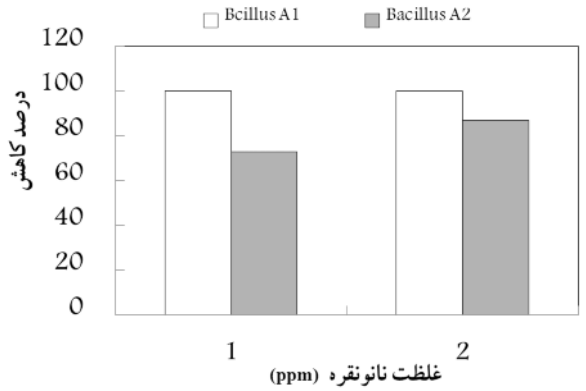
تشکیل بیوفیلم در غلظتهای مختلف نانونقره کاهش یافته و در غلظتهای بالا (ppm ۲ تا ۸) به‌طور کامل متوقف گردیده است.



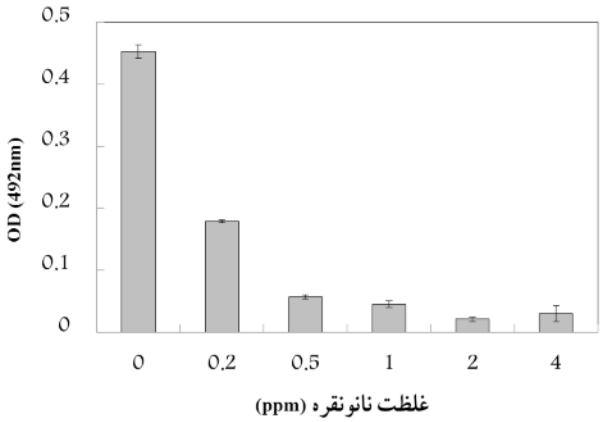
شکل ۵- درصد افزایش تشکیل بیوفیلم ایزوله‌های جداسازی شده از سیستم خنک کننده در حضور غلظتهای مختلف بیوساید



شکل۶- درصد افزایش تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های جداسازی شده از سیستم خنک کننده در حضور غلظتهای ppm ۰/۲ و ppm ۰/۵ نانونقره



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



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

۴- نتایج و بحث

محلولهای کلوییدی نقره به‌دلیل خواص ضد میکربی و کاربرد گسترده آنها در داروسازی، پزشکی و دامپزشکی، صنایع غذایی، تصفیه آب و غیره دارای جذابیت فوق العاده زیادی هستند. پتیکا و همکاران[1] در سال ۲۰۰۸ نشان داده‌اند که محلولهای حاوی بیش از ppm ۳۵ نقره خواص ضد میکربی و ضد قارچی بسیار خوبی دارند[۸]. چو و همکاران[2] در سال ۲۰۰۵ ، MIC نانوذرات نقره را برای *S.aureus* و *E.coli* به‌ترتیب ۵ و ppm ۱۰ به‌دست آورده‌اند[۹]. کیم[3] در سال ۲۰۰۷ اثرات ضد میکربی 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 باکتری‌ها نشان می‌دهند[۱۰]. چویی و همکاران[4] در سال ۲۰۰۸ نشان داده‌اند که ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نقره در فرم نانوذرات نقره، یون‌های نقره و کلوییدهای کلرید نقره به‌ترتیب با ۵۵ درصد، ۱۰۰ درصد و ۶۶ درصد سبب جلوگیری از رشد *E.coli* می‌شود[۱۱]. به‌طور کلی نتایج نشان می‌دهند که باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت در مقابل اثرات مهار کنندگی و کشندگی نانوذرات نقره مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند. این مسئله احتمالاً به ساختار متفاوت دیواره باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت ارتباط دارد. در این باکتری‌ها پورین‌ها سبب جذب و انتشار فلزات به غشاء خارجی و فضای پری پلاسمیک

[1] Petica et al.
[2] Cho et al.
[3] Kim
[4] Choi et al.

Archive of SID
www.SID.ir

می‌شوند. فلزات جذب شده می‌توانند به گروههای عاملی موجود (شامل گروههای کربنات، فسفات و آمین) متصل شوند و به این صورت کمتر وارد سلول شده و یا با پروتئین‌های غشایی (آنزیم‌های دارای گروههای سولفیدریل) واکنش دهند[۱۲].

چویی و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثرات ممانعتی نانوذرات نقره (Ag NPs) را بر روی رشد میکربی با استفاده از روش تنفس و روش اتوماتیک میکروتیتر فلورسنس ارزیابی کرده‌اند و نشان داده‌اند که نانوذرات نقره با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر سبب جلوگیری از تنفس به میزان ۸۶ درصد در باکتری‌های نیتریفایر می‌شود. بنابراین آنها دریافته‌اند که باکتری‌های نیتریفیه کننده به جلوگیری توسط نانوذرات نقره حساس هستند و تجمع نانوذرات نقره در تیمار پساب می‌تواند اثرات مضری بر روی میکروارگانیسم‌ها داشته باشد. مطابق با نتایج این محققان، غلظت ppm ۱ نانونقره سبب جلوگیری از تنفس به میزان ۸۰ درصد در *S.aureus* شد، همچنین این غلظت، تنفس را در ایزوله‌ها متوقف نمود. در مورد *E.coli* غلظت ppm ۲ نانونقره سبب جلوگیری از تنفس به میزان ۶۵ درصد گردیده است. بنابراین نتایج حاصل از سنجش تنفس سلولی در حضور غلظتهای مختلف نانونقره در گروههای مختلف باکتریایی یک الگوی مشابه را مطرح می‌کند و آن کاهش تدریجی میزان تنفس سلولی به موازات افزایش غلظت نانونقره است تا اینکه در غلظت MIC نانونقره برای هر باکتری میزان تنفس به پایین‌ترین حد خود رسیده و پس از آن دوباره افزایش می‌یابد. افزایش دوباره و غیر طبیعی میزان تنفس در غلظتهای بالاتر نانونقره را می‌توان به فعالیت کاتالیزوری و اکسیدکنندگی نانونقره نسبت داد[۱۳]. با توجه به اینکه غلظتهای بالاتر از غلظت MIC به‌تدریج سبب مرگ کامل باکتری می‌شود لذا این افزایش دوباره می‌تواند به‌دلیل انجام واکنش‌های اکسیداسیون شیمیایی در باکتری‌ها و اثرات کاتالیزوری نانونقره مرتبط باشد.

لیلوک و همکاران[1] در سال ۲۰۰۹ نشان داده‌اند که تشکیل بیوفیلم در *E.coli* در حضور غلظتهای مختلف نانوذرات فلوئورید 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 میلی‌گرم در میلی‌لیتر شده است[۱۴]. آنها با بررسی‌های بیشتر دریافته‌اند که نانوذرات فلوئورید منیزیم به سلول متصل شده و به داخل آن نفوذ می‌کنند، در پتانسیل غشاء تداخل ایجاد کرده و سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و اتصال به DNA می‌شوند. این فرایندها در مجموع توانایی باکتری‌ها را در تشکیل بیوفیلم مختل می‌کند. مطابق با یافته‌های این محققان در این تحقیق، غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر محلول کلوییدی نانونقره به‌طور کامل از تشکیل بیوفیلم در *S.aureus* جلوگیری می‌کند.

در مطالعه حاضر اثر محلول کلوییدی نانونقره بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت ppm ۰/۲۵ نانونقره نه تنها سبب افزایش معنی‌دار رشد در ایزوله‌ها نسبت به شاهد شد بلکه در غلظتهای ۰/۲۵ و ppm ۰/۵ منجر به افزایش معنی‌داری در تشکیل بیوفیلم این ایزوله‌ها گردید. افزایش رشد و متعاقب آن افزایش تشکیل بیوفیلم در این غلظتهای پایین را می‌توان به اثرات کاتالیزوری نقره در فعل و انفعالات سلولی که سبب افزایش رشد و اتصالات سلولی می‌شود، نسبت داد. با افزایش غلظت نانونقره تا ppm۴ به‌طور همزمان از رشد و تشکیل بیوفیلم جلوگیری شد به‌طوری که در غلظت ppm۲ به‌ترتیب سبب کاهش ۱۰۰ درصد و ۹۰ درصدی تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌ها و در غلظت ppm ۰/۵ 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 باکتری‌ها ندارد بلکه سبب افزایش تشکیل بیوفیلم نیز می‌شود و تنها در غلظت کامل بیوساید (احتمالاً این غلظت به اندازه‌ای برای باکتری‌ها سمّی است که رشدی صورت نمی‌گیرد) سبب حذف بیوفیلم می‌گردد. بنابراین در مجموع، اثرات نانوذرات نقره بر تشکیل بیوفیلم را می‌توان با اثرات این ذرات بر رشد باکتری‌ها مرتبط دانست به این معنی که جلوگیری از رشد باکتری‌ها موجب عدم تشکیل بیوفیلم گردیده و افزایش و تحریک رشد (در غلظت ppm ۰/۲۵) با افزایش میزان تشکیل بیوفیلم متناسب بوده است.

۵- نتیجه‌گیری

به‌طور 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 سیستم‌ها باید بر اساس اطلاعات و آگاهی کافی از ماهیت و ساختار آنها و همچنین غلظت مؤثر آن بر باکتری‌های سیستم صورت گیرد.

۲- در یک سیستم گردشی، استفاده متناوب از بیوسایدها ضروری است و استفاده مکرر و طولانی مدت از یک نوع بیوساید احتمالاً سبب مقاوم شدن باکتری‌های سیستم به آن و متعاقباً ایجاد مشکلاتی از قبیل افزایش بار میکربی، خوردگی و مسدود شدگی در نقاط مختلف سیستم می‌گردد.

[1] Lellouche et al

Archive of SID
www.SID.ir

۳- در این تحقیق محلول کلوییدی نانونقره، فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم بی‌نظیری را در غلظتهای پایین از خود نشان داد. به‌کارگیری این نانوذرات در شکل محلول یا به‌صورت فیلتر می‌تواند به‌عنوان یک بیوساید مؤثر و کارا در سیستم‌های گردشی آب معرفی شود.

۶- قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولان دانشگاه اصفهان برای حمایتهای مالی این پروژه و همچنین مسئولان پالایشگاه نفت اصفهان به‌دلیل همکاری در این تحقیق و در اختیار قرار دادن نمونه آب خنک کننده و بیوساید مصرفی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

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 methcrylate 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., Gavriliu, 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- Landkamer, 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.

Archive of SID

www.SID.ir