

## بررسی اثر بازدارندگی نانوذرات نقره کلوییدی بر سه سویه باکتریایی و سلول‌های ماکروفاژ در کشت ۲۴ ساعته

نویسندگان: زینب شوندی<sup>۱</sup>، طوبی غضنفری<sup>۲\*</sup>، کیومرث نظری مقدم<sup>۳</sup>، احیا عبدی عالی<sup>۴</sup>

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشکده علوم و عضو گروه تحقیقاتی تنظیم پاسخ‌های ایمنی دانشگاه شاهد، تهران، ایران  
 ۲- دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی و عضو گروه تحقیقاتی تنظیم پاسخ‌های ایمنی دانشگاه شاهد، تهران، ایران  
 ۳- دانشیار گروه اندودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران  
 ۴- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران
- \* نویسنده مسئول: E-mail: tghazanfari@yahoo.com

### چکیده

**مقدمه و هدف:** نانوذرات نقره، به‌عنوان نسل جدید مواد ضد میکروبی، کاربردهای فراوانی دارند. سه باکتری *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* از مهم‌ترین باکتری‌هایی هستند که می‌توان آن‌ها را با مواد ضد عفونی‌کننده ساخته‌شده از نانوذرات نقره از بین برد. از طرف دیگر، مهم‌ترین عامل به‌دام‌اندازی نانوذرات در مبادی ورودی بدن انسان، ماکروفاژها هستند که سرنوشت نانوذرات در بدن، به فعالیت آن‌ها بستگی دارد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره کلوییدی بر سه باکتری مختلف و هم‌زمان بررسی اثر آن بر سلول‌های ماکروفاژ در کشت ۲۴ ساعته است.

**مواد و روش‌ها:** برای تعیین غلظت مؤثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره، این ماده برای سه باکتری مذکور از روش سنجش MIC و برای تعیین غلظت ایمن نانوذرات برای ماکروفاژها، از سنجش فعالیت حیاتی ماکروفاژها به روش MTT استفاده شد.

**نتایج:** MIC محلول نانوذرات نقره برای *Escherichia coli* ATCC/25922 برابر با ۱/۵۶ ppm و *Staphylococcus aureus* ATCC/25923 برابر با ۳/۱۲۵ ppm تعیین شد که این MIC برابر با MBC محلول نانوذرات نقره است. حداکثر غلظتی از نانوذرات نقره کلوییدی که باعث مرگ کامل ماکروفاژها پس از ۲۴ ساعت نشده است، برابر با ۲ ppm و حداکثر غلظت غیرسمی نانوذرات در مقایسه با گروه کنترل برابر با ۰/۵ ppm اندازه‌گیری شد.

**نتیجه‌گیری:** استفاده از غلظت بیش از ۲ ppm، برای ماکروفاژها کاملاً سمی است و باعث مرگ آن‌ها می‌شود و به‌کارگیری غلظت کمتر از ۰/۵ که برای ماکروفاژهای دارای سمیت نیست، اثر ضد باکتریایی مؤثری ندارد، بنابراین به‌نظر می‌رسد، باید در استفاده از این مواد ضد عفونی‌کننده احتیاط لازم صورت پذیرد. انجام مطالعات بیشتر *in vivo* در این زمینه ضروری به‌نظر می‌رسد.

**واژگان کلیدی:** نانوذرات نقره کلوییدی، اثرات ضد باکتریایی، سم‌شناسی، ماکروفاژ

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
 دانشگاه شاهد  
 سال هفدهم - شماره ۸۸  
 شهریور ۱۳۸۹

وصول: ۸۹/۴/۹  
 آخرین اصلاحات: ۸۹/۶/۱۶  
 پذیرش: ۸۹/۷/۱۳

## مقدمه

از دیرباز، حذف میکروارگانیسم‌های مضر مانند باکتری‌ها، کپک‌ها، مخمرها و ویروس‌ها، یکی از دغدغه‌های اصلی بشر بوده‌است، بنابراین بسیاری از مواد طبیعی و غیرآلی با ویژگی‌های مختلف، برای این منظور به کار گرفته شده‌اند (۱). عوامل کنترل‌کننده رشد میکروارگانیسم‌ها دارای انواع متفاوتی هستند که یا باعث کشتن میکروارگانیسم‌ها یا مهار رشد آن‌ها می‌شوند. در بین این مواد، گروهی به نام آنتی‌سپتیک قرار دارند. این مواد، عوامل شیمیایی هستند که برای سطح پوست یا سایر بافت‌های سطحی زنده استفاده می‌شود و باعث مهار رشد میکروارگانیسم‌ها شده یا آن‌ها را حذف می‌کنند. فلزات سنگین و ترکیبات آن‌ها نیز به‌عنوان مواد ضدعفونی‌کننده استفاده می‌شوند (۲-۳).

فلز نقره و یون‌های آن به دلیل همین خاصیت ضد میکروبی در گذشته کاربردهای فراوانی داشته‌اند و برای نگهداری از آب آشامیدنی، ترمیم زخم‌های سوختگی، جلوگیری از عفونت‌های گنوکوکی نوزادان و... به کار می‌رفتند (۴). با ظهور آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از این مواد کم‌رنگ شد اما امروزه به دلیل مقاومت‌های میکروبی و همچنین طیف وسیع اثر نقره، استفاده از این مواد رونق گرفته‌است (۵). تفاوت در این است که امروزه استفاده از این مواد در غالب فرمول‌های جدید مانند مواد نانو مقیاس (کمتر از ۱۰۰ نانومتر) به کار می‌رود. این مواد به دلیل سطح بالای تماس (نسبت سطح به حجم بالا) و همچنین ویژگی‌های منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی، می‌توانند مواد بسیار خوبی برای ضدعفونی باشند (۶). به دلیل همین اثرات ضد میکروبی، این مواد در بسیاری از محصولات تجاری بهداشتی، پزشکی، دندانپزشکی و... به کار می‌روند و سالانه میلیارد ها دلار سود از ساخت این مواد عاید شرکت‌های سازنده می‌شود. این شرکت‌ها با استفاده از نانوذرات نقره محصولات چوب پوشش‌های زخم، البسه، سرامیک و اسپری‌های ضد میکروبی ساخته‌اند و حتی ماشین لباسشویی و یخچال‌هایی با پوشش‌های نانونقره تولید

کرده‌اند (۶). از طرف دیگر، اگر این مواد قادر باشند باکتری‌هایی همچون *Escherichia coli* (مدل باکتریایی شاخص گرم منفی) (۷)، *Staphylococcus aureus* (مدل باکتریایی گرم مثبت) (۸) و *Pseudomonas aeruginosa* (باکتری گرم منفی) (۹) را از بین ببرند، می‌توان این مواد را به صورت وسیع در بیمارستان‌ها به‌عنوان ماده ضدعفونی‌کننده سطوح به کار برد یا از این مواد برای ضدعفونی کردن آب (۱۰) استفاده کرد. همچنین از این ماده می‌توان برای شست‌وشو و بانداژ زخم‌ها به-خصوص زخم‌های سوختگی (۱۱-۱۳) بهره برد، چرا که این سه باکتری به ترتیب عامل بیماری‌های دستگاه ادراری و آلودگی آب‌ها (۱۴)، عامل بیماری‌های پوستی و مسمومیت غذایی (۱۵) و عامل عفونت‌های سوختگی هستند (۱۶). از طرف دیگر، برای استفاده بهتر از هر محصولی لازم است، مطالعات سم‌شناسی بر روی آن انجام شود. از آنجا که ماکروفاژها مهم‌ترین عامل برای پاک‌سازی نانوذرات از مبادی ورودی آن به بدن هستند (۱۷) و نیز ماکروفاژها در پاک‌سازی میکروبی و فاگوسیتوز میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان یکی از سلول‌های مهم ایمنی ذاتی نقش دارند، بنابراین در به‌کارگیری این نانوذرات باید اثرات سم‌شناسی آن بر ماکروفاژها در نظر گرفته شود.

با توجه به مطالب گفته‌شده در این مطالعه، ضمن مطالعه اثر ضدباکتریایی نانوذرات کلوییدی نقره بر سه باکتری *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus*، به‌طور هم‌زمان اثر دوزهای مختلف نانوذرات نقره کلوییدی بر ماکروفاژهای صفاقی موش در دوره کشت ۲۴ ساعته بررسی شده‌است. با استفاده از این مطالعه می‌توان غلظت مؤثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره کلوییدی و غلظت ایمن این مواد برای ماکروفاژها تعیین شود تا در کاربرد آن، ایمنی لازم برای کاربران مدنظر قرار گیرد.

**مواد و روش‌ها****نانوذره نقره**

در این مطالعه، از نانوذرات نقره کلوییدی با نام تجاری Nanocid L2000 (شرکت نانونصب نیرو، ایران) استفاده شده است. این ماده حاوی ppm 4000 از نانوذرات نقره است که به صورت محلول معلق کلوییدی استفاده می‌شود. این ماده در محیط کشت پایداری خود را حفظ می‌کند. اندازه این نانوذرات بین 18 تا 34 نانومتر بوده و پتانسیل زتای این ماده 33/5- اندازه‌گیری شده است که پایداری متوسط این ماده را نشان می‌دهد.

**مواد شیمیایی و وسایل**

تمامی مواد به کاررفته در این آزمایش، از شرکت مرک آلمان و تمامی وسایل پلاستیکی و پلیت‌های میکروتیتر 96 خانه‌ای، از شرکت نائک امریکا تهیه شده است.

**باکتری‌های استفاده شده**

در این آزمایش، از سه باکتری شامل: *Escherichia coli* ATCC/25922، *Staphylococcus aureus* ATTC/25923 و *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 که از «سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی» تهران گرفته شده، استفاده شده است.

**شناسایی باکتری‌ها**

قبل از شروع هر آزمون باید برای اثبات درستی تشخیص باکتری مورد نظر آزمایشی انجام شود. در این آزمایش، از آزمایش‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی شامل رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اندول، احیای نیترات، تست وژپرسکوئر و تخمیر هیدرات‌های کربن استفاده شد.

**نتایج سنجش MIC:**

این آزمایش به روش رقت‌سازی در پلیت‌های میکروتیتر بر اساس پروتوکل CLSI در دمای 37 درجه انجام گرفت و حداقل غلظت مهاری MIC و حداقل غلظت کشندگی MBC نانوذرات نقره کلوییدی برای باکتری‌های مذکور بررسی شد. تلقیح باکتری از کشت 24 ساعته به درون سالی‌ن نرمال معادل کدورت استاندارد 0/5 مک فارلند و سپس رقیق کردن به اندازه 1 به 100 و در نهایت قرار دادن آن در چاهک‌های پلیت به اندازه 100 µL انجام شد. محلول کلوییدی نانوذرات نقره با غلظت ppm 4000 به اندازه 1 به 10 رقیق شده و این محلول با غلظت ppm 400 به عنوان نمونه اولیه در چاهک‌ها با رقیق‌سازی سریالی وارد شده به طوری که غلظت‌های (ppm) 100 تا 0/1 (100 و 50 و 25 و 12/5 و 6/25 و 3/125 و 1/56 و 0/78 و 0/39 و 0/19 و 0/04 و 0/02 و 0/01) از این ماده تهیه شد. غلظت مؤثر محلول (MIC یا MBC) نانوذرات نقره برای سه باکتری تعیین و این آزمایش سه بار تکرار شد.

**جداسازی، کشت سلولی و تیمار ماکروفاژهای****صفاقی با نانوذرات نقره کلوییدی**

موش‌های 6-8 هفته‌ای balb/c سالم نر از مرکز نگه‌داری حیوانات دانشکده پزشکی شاهد گرفته شد. این موش‌ها در شرایط دما و رطوبت کنترل شده و فاقد پاتوژن نگه‌داری شده بودند. موش‌ها به وسیله اتر کشته شدند و تحت شرایط استریل پوست سینه و شکم آن‌ها باز و سرم فیزیولوژی سرد به درون صفاق موش تزریق شد. پس از مدت کوتاهی دوباره به درون سرنگ کشیده و به لوله منتقل شد. به این ترتیب، ماکروفاژهای صفاقی جمع‌آوری شدند. سوسپانسیون به دست آمده از صفاق موش به وسیله محیط کشت RPMI شست‌وشو و در هر چاهک از پلیت 96 خانه تعداد 4x10<sup>5</sup> سلول کشت داده شد و پلیت به مدت دو ساعت در انکوباتور 37 درجه و پنج درصد CO<sub>2</sub> نگه‌داری و پس از مدت دو ساعت چاهک‌ها با سرم فیزیولوژی شست‌وشو شد و

## نتایج

### شناسایی باکتری‌ها

باکتری‌های موردنظر نسبت به تست‌های انجام شده، دارای این مشخصات بودند:

۱. *Escherichia coli* ATCC/25922: باسیل گرم منفی، بدون اسپور، متحرک، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، لاکتوز مثبت، احیای نیترات به نیتريت مثبت، دارای جلای فلزی در محیط EMB، MR مثبت، VP منفی، اندول مثبت، تولید اسید و گاز از تخمیر گلوکز و مانیتول مثبت است که مشخصات باکتری موردنظر خود را تأیید می‌کند.

۲. *Staphylococcus aureus* ATCC/25923: کوکوس گرم مثبت، بدون اسپور، بدون حرکت، دارای پیگمان زرد رنگ، کاتالاز مثبت، کوآگولاز مثبت، تحمل‌کننده نمک، همولیز در بلاد آگار و مانیتول مثبت است که مشخصات باکتری خود را تأیید می‌کند.

۳. *Pseudomonas aeruginosa* PAOI.۳: باسیل گرم منفی، متحرک، دارای پیگمان سبز رنگ، دارای بوی مطبوع، اکسیداز مثبت، عدم تخمیر قندها و لاکتوز منفی است که ویژگی‌های باکتری موردنظر خود را تأیید می‌کند.

دوزهای موردنظر از نانوذرات نقره در هر ردیف از پلیت به ماکروفاژها اضافه شد. به نحوی که در نهایت، حجم هر چاهک به  $200 \mu\text{L}$  رسید. دوزهای استفاده شده در این آزمایش شامل دوزهای ۲۵، ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۵ ppm بود.

### اندازه‌گیری فعالیت حیاتی سلول‌های ماکروفاژ

پس از بیست ساعت تیمار سلول‌های ماکروفاژ با نانوذرات نقره، بیست میکرولیتر (یکدهم حجم محیط روی سلول‌ها) از محلول MTT به هر کدام اضافه شد. پس از چهار ساعت و ایجاد کریستال‌های بنفش رنگ، مایع رویی برداشته و یکصد میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی اضافه شد تا کریستال‌ها را حل کند. پس از چند بار به هم زدن، مایع بنفش رنگ را برداشته و در پلیت‌های مخصوص الیزا وارد می‌کنیم و جذب نوری آن را به کمک دستگاه جذب‌سنج خواننده الیزا (ELIZA reader) می‌خوانیم. میزان جذب، نشانه‌ای برای تعداد سلول‌های زنده است.

### آنالیز آماری

داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از تست آماری Student's unpaired T-test Differences با مقدار p-value کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان تفاوت معنادار، آنالیز شد.



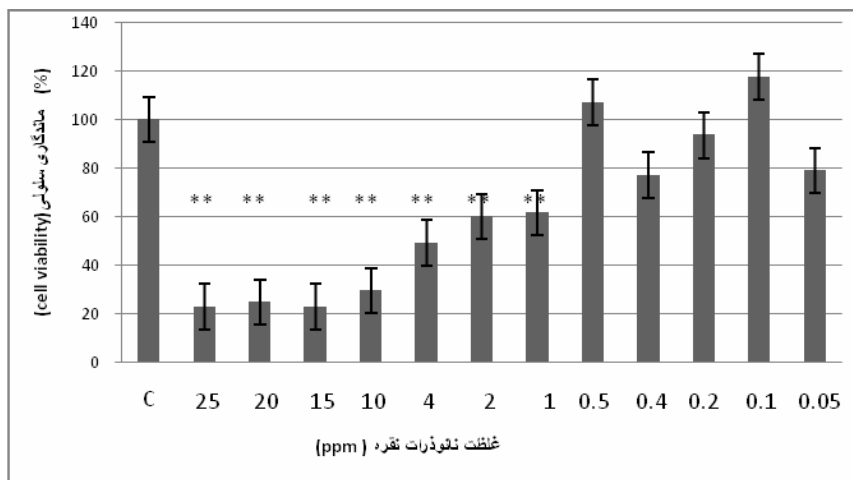
شکل ۱. نمودار مربوط به MBC سه باکتری مورد آزمایش. همان‌طور که در این نمودار دیده می‌شود، مقدار MBC مربوط به باکتری سودوموناس دو برابر دو باکتری دیگر است.

## نتایج اندازه‌گیری فعالیت حیاتی ماکروفاژها پس از ۲۴ ساعت تیمار با نانوذرات نقره کلوییدی

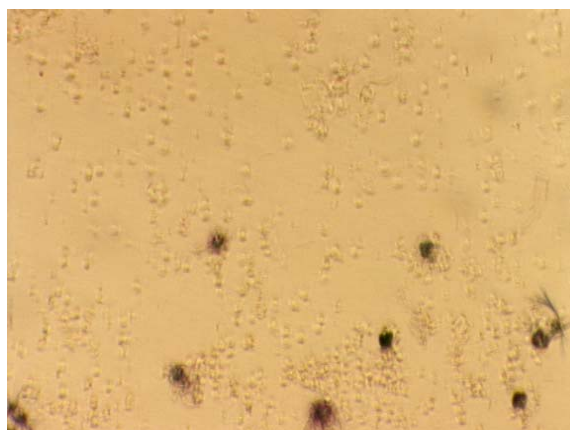
در این مطالعه دیده شد که ماکروفاژها پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های ۲۵ppm تا ۰/۵ppm از نانوذرات نقره، کاهش معناداری در ماندگاری سلولی ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت ۲۵ ppm تا ۱ ppm از نانوذرات نقره نسبت به کنترل دیده شد. غلظت‌های کمتر از ۱ ppm هیچ تفاوت معناداری با گروه کنترل نداشت (شکل ۲). همچنین در تصویر میکروسکوپ معکوس، تعداد معدودی از کریستال‌های فرمازان MTT در کشت ماکروفاژ پس از ۲۴ ساعت تیمار با نانوذرات نقره، در غلظت ۲ ppm دیده شد (شکل ۳).

## نتایج سنجش MIC

نتایج، همان‌طور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود، پس از انجام آزمایش برای باکتری *Escherichia coli* ATCC/25922 در هر سه بار تکرار اولین خانه فاقد کدورت که پس از کشت، هیچ کلنی در آن رشد نکرد و برابر با ۱/۵۶ppm بود که به‌عنوان مقدار MBC گزارش شد. برای باکتری *Staphylococcus aureus* ATCC/25923 نیز مقدار MBC برابر با ۱/۵۶ppm و همچنین برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 /27853، مقدار MBC برابر با ۳/۱۲۵ppm بود. لازم است این نکته یادآوری شود که کشت دوباره از اولین چاهک فاقد کدورت برای سنجش MBC به‌کار رفت که در هر سه سویه هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشد، پس می‌توان نتیجه گرفت، MIC برابر با MBC است.



شکل ۲. میزان ماندگاری سلولی ماکروفاژها ۲۴ ساعت پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره. کاهش معناداری در ماندگاری سلولی ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت ۲۵ ppm تا ۱ ppm از نانوذرات نقره کلوییدی نسبت به کنترل دیده می‌شود. غلظت‌های کمتر از ۱ ppm هیچ تفاوت معناداری با گروه کنترل ندارند. توجه: \*\* تفاوت معنادار است ( $P < 0/01$ ).



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ معکوس. تعداد معدودی از کریستال‌های فرمازان MTT در کشت ماکروفاژ پس از ۲۴ ساعت تیمار با نانوذرات نقره کلوییدی در غلظت ۲ ppm دیده می‌شود.

Table 2  
MIC of the tested CSSs

No. of CSS sample	Composition and concentration of the CSSs		CMI (ppm)		
	Stabilizers composition	Ag conc. (ppm)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
4	3 g/l PVP 25 + 0.5 g/l Na-NS	31.80	31.80	7.95	7.95
5	3 g/l PVP 10 + 0.5 g/l Na-LS	26.40	6.60	1.65	1.65
6	3 g/l PVP 10 + 0.5 g/l SDBS	5.88	5.88	2.94	2.94

جدول ۱. مطالعه Petica و همکاران درباره اثر نانوذرات نقره کلوییدی CSS بر سه باکتری *Escherichia coli* ، *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* (۱۸)

## بحث

مطالعه، اثر نانوذرات نقره کلوییدی بر باکتری‌ها (گرم مثبت و گرم منفی) ارزیابی شد و کمترین غلظت کشنده محلول (MBC) برای *Escherichia coli* ATCC/25922 برابر با ۱/۵۶ ppm ، برای *Staphylococcus aureus* ATTC/25923 برابر با ۱/۵۶ ppm و برای *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 برابر با ۳/۱۲۵ ppm اندازه گیری شد. در مطالعات دیگری که برای سنجش اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره بر این سه باکتری انجام گرفته، اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره به اثبات رسیده است (۷-۸، ۱۸-۱۹) اما نانوذرات به کاررفته از نظر ویژگی‌های نانوذرات نقره با نانوذرات به کاررفته در مطالعه حاضر تفاوت دارد (۲۰-۲۱). به عنوان مثال، Petica و همکاران در مطالعه‌ای اثر نانوذرات نقره کلوییدی را بر سه سویه مورد نظر سنجیده‌اند. همان‌طور که در جدول (۱) نتایج این مطالعه آمده است (۱۸)، میزان MIC با نتایج کار ما متفاوت است که این تفاوت به دلیل تفاوت در نوع نانوذره به کاررفته در این دو مطالعه است، به طوری که

از قدیم، فلزات سنگین به عنوان یکی از مواد ضد عفونی کننده برای مهار رشد میکروارگانیسم‌ها کاربرد داشته است. امروزه استفاده از این مواد در مقیاس نانو مطرح شده است. نانوذرات نقره با خواص ضد میکروبی دارای کاربردهای روزافزونی است. *Escherichia coli* ، *Staphylococcus aureus* ، *Pseudomonas aeruginosa* به عنوان سه باکتری مهم هستند که می‌توان با نانوذرات نقره آن‌ها را از بین برد اما در کاربرد نانوذرات نقره باید مسائل سم شناختی و احتمال خطر برای انسان در نظر گرفته شود. از آنجا که ماکروفاژها مهم ترین عامل پاک سازی نانوذرات در مبادی ورودی به بدن هستند، شناخت اثر نانوذرات بر ماکروفاژها ضروری به نظرمی‌رسد. بررسی اثر نانوذرات نقره کلوییدی بر باکتری‌ها و اثرات سم شناسی آن بر ماکروفاژها در تعیین غلظت مؤثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره کلوییدی و غلظت ایمن این مواد برای ماکروفاژها ما را یاری می‌دهد. در این

از آنجا که در آزمایش مشابه، مطالعات انجام گرفته روی ماکروفاژهای موشی با اثرات نانوذرات نقره بر ماکروفاژهای انسانی مقایسه شده است، بنابراین می توان این نتایج را برای ماکروفاژهای انسانی تعمیم داد (۳۵-۳۴).

در نتیجه، با توجه به اثرات سمی نانوذرات نقره بر ماکروفاژها در دوزهای نزدیک به دوز های ازین برنده باکتری ها و با توجه به اهمیت ماکروفاژها در تعیین سرنوشت نانوذرات نقره در بدن، به نظر می رسد، باید در استفاده از این مواد دز انفاکتان احتیاط لازم صورت گیرد و در استفاده های دارویی و ضد عفونی کننده های آب و هرگونه کاربرد درون بدن تجدیدنظر شود. هر چند این مطالعات به صورت *in vitro* انجام گرفته است و سلول های باکتری و نیز سلول های ماکروفاژ، به دور از فاکتورهای تأثیرگذار *in vivo* بررسی شده اند. در حالی که در محیط، باکتری ها اغلب به صورت کلونیزه و با تعامل با سایر باکتری ها قرار دارند که این موضوع باعث کاهش اثر مواد ضد باکتری بر روی باکتری ها می شود. همچنین ماکروفاژها درون بدن و در تعامل با سایر سلول ها و مواد قرار دارند که این باعث می شود، نانوذرات نقره اثرات سمی کمتری روی آن ها داشته باشد (۲۳) اما به نظر می رسد، باکتری ها در محیط، نسبت به ماکروفاژها در سیستم پیچیده بدن با سد های فیزیکی بازدارنده تا حدود زیادی آسیب پذیرتر باشند که این برای به کارگیری این مواد، به عنوان نسل جدید مواد ضد میکروبی جای امیدواری دارد. هر چند مطالعات بیشتر *in vivo* در این زمینه ضروری به نظر می رسد.

### تشکر و قدردانی

به این وسیله، از همکاری سرکار خانم فلاحی در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه الزهرا که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می شود.

غلظت نانوذرات نقره در این دو با یکدیگر متفاوت بوده و نشان دهنده این موضوع است که هر نوع از مواد نانو با توجه به ویژگی هایی همچون اندازه، شکل، غلظت نانوذرات به کاررفته، نوع ترکیب سورفکتانت و پایدارکننده و... منحصر به فرد است (۲۲) و این ویژگی ها نانوذرات بر خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اثر دارد (۲۳). این موضوع را می توان با مقایسه این کار با مطالعات مشابه دیگر نیز دریافت (۲۰، ۲۴-۲۵).

اثر این نانوذرات بر ماکروفاژها به روش سنجش فعالیت حیاتی ماکروفاژها سنجیده شد و حداکثر غلظتی از نانوذرات نقره کلوییدی که باعث مرگ کامل ماکروفاژها پس از ۲۴ ساعت نشده است، برابر با ppm ۲ و حداکثر غلظت غیرسمی نانوذرات در مقایسه با گروه کنترل برابر با ppm ۰/۵ اندازه گیری شد. نتایج به دست آمده چند موضوع را روشن می کند. اول آن که، اثر نانوذرات نقره کلوییدی، هم بر باکتری ها و هم بر ماکروفاژها، وابسته به غلظت است. این موضوع در بررسی های انجام گرفته سایر سلول ها مانند اثر نانوذرات نقره بر سلول های فیبربلاست، سلول های کبدی، کراتینوسیت ها، سلول های نرونی، سلول های بنیادی اسپرماتوگونی و مست سل ها نیز دیده شده است (۳۳-۲۶، ۱۳، ۱۱). دوم آن که، اثر نانوذرات نقره کلوییدی در باکتری های مذکور به صورت کشندگی است و نه مهارکنندگی، بنابراین در هر سه باکتری MIC برابر MBC است. سوم آن که، MBC تعیین شده برای *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 دو برابر MBC تعیین شده برای دو باکتری دیگر است که این موضوع نشان دهنده مقاوم تر بودن این باکتری نسبت به دو باکتری دیگر است. این مقاومت *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 در انواع مواد ضد عفونی کننده دیگر نیز دیده می شود. چهارم آن که، غلظت بیش از ppm ۲، کاملاً برای ماکروفاژها سمی است و باعث مرگ آن ها می شود و به کارگیری غلظت کمتر از ۰/۵ که برای ماکروفاژها سمیت ندارد، اثر ضد باکتریایی مؤثری ندارد.

### منابع

- 1- Kim, T.N., et al., Antimicrobial effects of metal ions (Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) in hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1998. 9(3): p. 129-134.
- 2- Alp, S., [Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants]. *Mikrobiyoloji bülteni*, 2007. 41(1): p. 155-161.
- 3- Cerf, O., B. Carpentier, and P. Sanders, Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts. *International Journal of Food Microbiology*. 136(3): p. 247-254.
- 4- Chopra, I., The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007. 59(4): p. 587-590.
- 5- da Silva Paula, M.M., et al., Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poly-{styrene-acrylic acid} with silver nanoparticles. *Materials Science & Engineering C*, 2009. 29(2): p. 647-650.
- 6- Rai, M., A. Yadav, and A. Gade, Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. 27(1): p. 76-83.
- 7- Sondi, I. and B. Salopek-Sondi, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*, 2004. 275(1): p. 177-82.
- 8- Ruparelia, J.P., et al., Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 2008. 4(3): p. 707-716.
- 9- Huang, H.-I., et al., In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: implications for on-site disinfection for hospital infection control. *Water Research*, 2008. 42(1-2): p. 73-80.
- 10- Qilin Li, S.M., Delina Y. Lyon, Lena Brunet, Michael V. Liga, Dong Li, and P.J.J. Alvarez\*, Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *water research*, 2008. 42: p. 4 5 9 1 - 4 6 0 2.
- 11- Lam, P.K., et al., In vitro cytotoxicity testing of a nanocrystalline silver dressing (Acticoat) on cultured keratinocytes. *British journal of biomedical science*, 2004. 61(3): p. 125-127.
- 12- Arora, S., et al., Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 2008. 179(2): p. 93-100.
- 13- Poon, V.K.M. and A. Burd, In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns*, 2004. 30(2): p. 140-147.
- 14- Read about *E. coli* causes and symptoms on MedicineNet.com. 2009; Available from: [http:// www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=53262](http://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=53262).
- 15- Staph Infection (*Staphylococcus Aureus*) Symptoms, Causes and Treatment on MedicineNet.com. 2009; Available from: [http://www.medicinenet.com/staph\\_infection/page3.htm](http://www.medicinenet.com/staph_infection/page3.htm).
- 16- Prasanna, M. and C. Thomas, A profile of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection in the burn center of the Sultanate of Oman. *Burns*, 1998. 24(7): p. 631-636.
- 17- Chellat, F., et al., Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. *Biomaterials*, 2005. 26(35): p. 7260-7275.
- 18- A. Petica a, S. Gavriliu a, M. Lungua, N. Burunteaa, C. Panzarub, Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering B*, 2008. 152: p. 22-27.
- 19- Aline Cristina Teixeira, M., Quantification and identification of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila* in water dairy farms. 2007.
- 20- Marcos Marques da Silva Paula , C.V.F., Mario César Baldin , Larissa Rodrigues , Tatiana Barichello , Geovana Dagostim Savi , Luiz Felipe Bellato , Márcio Antônio Fiori , Luciano da Silva Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poly-{styrene-acrylic acid} with silver nanoparticles. *Materials Science and Engineering* 2009. 29: p. 647-650.
- 21- Jun Sung Kim, D., PhD,a Eunye Kuk, MS,b Kyeong Nam Yu, MS,a Jong-Ho Kim, MS,g, et al., Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2007. 3: p. 95-101.
- 22- Virender K. Sharma , R.A.Y., Yekaterina Lin, Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2009. 145: p. 83-96.
- 23- Chen, X. and H. Schluesener, Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett*, 2008. 176(1): p. 1-12.
- 24- Yu, D.-G., Formation of colloidal silver nanoparticles stabilized by Na<sup>+</sup>-poly(glutamic acid)-silver nitrate complex via chemical reduction process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007: p. 171-178.
- 25- Hindi, K.M., et al., The antimicrobial efficacy of sustained release silver-carbene complex-loaded L-tyrosine polyphosphate nanoparticles: Characterization, in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*, 2009. 30: p. 3771-3779.
- 26- Suzuki, Y., et al., Exposure of RBL-2H3 mast cells to Ag(+) induces cell degranulation and mediator release. *Biochemical and biophysical research communications*, 2001. 283(3): p. 707-714.
- 27- Hussain, S., et al., In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro*, 2005. 19(7): p. 975-83.
- 28- Hussain, S.M., et al., The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 2006. 92(2): p. 456-463.
- 29- Paddle-Ledinek, J.E., Z. Nasa, and H.J. Cleland, Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation. *Plastic and reconstructive surgery*, 2006. 117(7 Suppl): p. 110-118.
- 30- Yoshimaru, T., et al., Silver activates mast cells through reactive oxygen species production and a thiol-sensitive store-independent Ca<sup>2+</sup> influx. *Free radical biology & medicine*, 2006. 40(11): p. 1949-1959.
- 31- Burd, A., et al., A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 2007. 15(1): p. 94-104.
- 32- Chung, T.H., et al., The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells. *Biomaterials*, 2007. 28(19): p. 2959-2966.
- 33- Arora, S., et al., Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 2009. 236(3): p. 310-318.
- 34- Soto, K.F., et al., Biological effects of nanoparticulate materials. *Materials Science & Engineering C*, 2006. 26(8): p. 1421-1427.
- 35- Soto, K., K. Garza, and L. Murr, Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. *Acta Biomater*, 2007. 3(3): p. 351-8.