

The isolation and identification of biofilm-forming bacteria in a membrane bioreactor and its removal by silver nanoparticles

Ahmadi M¹, Pourbabaee AA^{2*}, Doudi M³

1- Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, I. R. Iran.

2- Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, I. R. Iran.

3- Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, I. R. Iran.

Received April 17, 2012; Accepted September 5, 2012

Abstract:

Background: Membrane bioreactor systems are extensively used in biological treatment of the municipal and industrial wastewater. Despite the efficiency of these bioreactors in biological wastewater treatment, several problems, including bacterial biofilm formation, have limited their use. This study aimed to identify the dominant bacteria in the biofilm of such systems as well as to investigate the lethal effect of the silver nanoparticles in small size (4 nm) and higher dilutions in wastewater.

Materials and Methods: This laboratory-scale experimental study was performed on 140 samples; the dominant isolates were identified using the differential biochemical tests. Using Broth micro dilution, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were calculated. Standard discs were prepared by different concentrations of nanosilver particles (0.5, 1, 2, 4, 8 ppm) and evaluated through the disc agar diffusion method on Muller-Hinton agar plates. Finally, the inhibition zone diameter was measured.

Results: The frequencies of isolates were *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter* and *Bacillus anthracis*, respectively. Moreover, The MIC of silver nanoparticles (4nm) against the isolates were as follows: *Escherichia coli*, 2ppm; *Citobacter*, 1ppm; *Bacillus cereus*, 1ppm; *Bacillus anthracis*, 0.5 ppm; *Bacillus subtilis*, 1ppm; *Pseudomonas aeruginosa*, 4ppm and *Proteus*, 2ppm.

Conclusion: It can be concluded that silver nanoparticles, with a particle size of <10 nm, have a positive impact on the removal of dominant resistant isolates, especially gram-positive bacteria.

Keywords: Biofilm, Membrane bioreactor system, Silver nanoparticles, Minimum inhibitory concentration

* Corresponding Author.

Email: ahmadalipb@gmail.com

Tel: 0098 912 285 7394

Fax: 0098 263 222 7607

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences November, 2012; Vol. 16, No 5, Pages 433-438

Please cite this article as: Ahmadi M, Pourbabaee AA, Doudi M. The isolation and identification of biofilm-forming bacteria in a membrane bioreactor and its removal by silver nanoparticles. *Feyz* 2012; 16(5): 433-8.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم دستگاه بیوراکتور غشایی (MBR) و حذف آنها به وسیله نانو ذرات نقره

مرضیه احمدی^۱، احمدعلی پوربابایی^{*۲}، منیر دودی^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: سیستم بیوراکتور غشایی، کاربرد وسیعی در فرآیند تصفیه بیولوژیک در پساب صنعتی و شهری دارد. علی‌رغم کارایی این بیوراکتورها در تصفیه، مشکلات متعددی از جمله تشکیل بیوفیلم ناشی از باکتری‌های موجود در پساب، موجب محدودیت کاربری این سیستم‌ها شده است. هدف از این تحقیق شناسایی باکتری‌های غالب تشکیل‌دهنده بیوفیلم در این سیستم‌ها و بررسی اثر کشندگی نانوذرات نقره در سایز کوچک‌تر (۴ nm) و غلظت‌های پایین (رقت بیشتر) با توجه به اهمیت کیفیت پساب می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در مقیاس آزمایشگاهی بر روی ۱۴۰ نمونه انجام شد. با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و افتراقی ایزوله‌های غالب شنایی گردید. سپس با استفاده از روش Broth micro dilution (MIC). Minimal inhibitory concentration (MIC) و minimal bactericidal concentration (MBC) اندازه‌گیری شد و از هر کدام از رقت‌های ۰/۵، ۲/۱، ۴، ۸ ppm از نانو ذرات نقره، دیسک‌های استاندارد تهیه و به روش انتشار دیسک در آگار در محیط کشت مولر هیتون آگار ارزیابی شد و قطر هاله مهاري اندازه‌گیری شد.

نتایج: جدایه‌ها به ترتیب فراوانی شامل: اشریشیاکلی، سودوموناس آئروچینوزا، پروتئوس، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرنوس، سیتروباکتر، و باسیلوس آنتراسیس بودند. حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) ذرات نانو نقره با قطر ۴ نانومتر بر علیه جدایه‌های اشریشیاکلی برابر ۲ ppm، سیتروباکتر ۱ ppm، باسیلوس سرنوس ۱ ppm، باسیلوس آنتراسیس ۰/۵ ppm، باسیلوس سوبتیلیس ۱ ppm، سودوموناس ۴ ppm و پروتئوس برابر با ۲ ppm به دست آمد.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت نانو ذرات نقره در سایز کمتر از ۱۰ نانومتر برای حذف ایزوله‌های غالب و مقاوم به خصوص در باکتری‌های گرم مثبت موثر است.

واژگان کلیدی: بیوفیلم، سیستم بیوراکتور غشایی، نانوذرات نقره، حداقل غلظت مهار کنندگی

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۱، صفحات ۴۳۸-۴۳۳

مقدمه

فن‌آوری بیوراکتورهای غشایی یا MBR ترکیبی از فرایند لجن فعال با فیلتراسیون غشایی است [۴]. ترکیب تکنولوژی غشاء با تصفیه بیولوژیکی فاضلاب اولین بار در سال ۱۹۶۹ گزارش شد [۵]. اولین بیوراکتور مستغرق در مقیاس آزمایشگاهی در سال ۱۹۸۹ و اولین واحد تجاری در سال ۱۹۹۱ راه‌اندازی شده است [۵]. امروزه در کشورهای توسعه یافته بیش از ۹۰۰ بیوراکتور غشایی در مقیاس بزرگ صنعتی برای تصفیه فاضلاب‌های صنعتی و شهری به کار رفته است [۵]. در مورد این سیستم‌ها می‌توان به مزایای کم بودن فضای مورد نیاز و بازده بسیار بالای آنها اشاره کرد. گرفتگی غشا و بالا بودن هزینه نیز از معایب این سیستم‌ها می‌باشد. در این سیستم‌ها هیچ ماده شیمیایی یا لجنی تولید نمی‌شود و سیستم به صورت اتوماتیک کار می‌کند. انتخاب غشاء بستگی به نوع فاضلاب دارد [۶]. Thomass و همکارانش گرفتگی غشاهای مختلف لوله‌ای را در یک بیوراکتور غشایی مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند که افزایش سرعت تا محدوده خاصی باعث کاهش گرفتگی می‌شود و در صورتی که سرعت از آن محدوده فراتر رود به‌خاطر ایجاد فشار بیشتر خود باعث گرفتگی غشاء می‌شود [۷].

از دیرباز، حذف میکروارگانیسم‌های مضر مانند باکتری‌ها، کپک‌ها، مخمرها و ویروس‌ها، یکی از دغدغه‌های اصلی بشر بوده است، 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 [۳،۲]. یکی از مهمترین سیستم‌هایی که در سال‌های اخیر در حوزه تصفیه پساب‌های صنعتی و خانگی مطرح گردید بیوراکتورهای غشایی (MBR) هستند که بر بسیاری از فناوری‌های رقیب خود ترجیح داده شده است.

^۱ دانشجوی میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

^۲ استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران واحد کرج

^۳ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی، اصفهان، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

کرج، خیابان دانشکده، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

تلفن: ۰۹۱۲ ۲۸۵۷۳۹۴ | دورنویس: ۰۲۶۳ ۲۲۲۷۶۰۷

پست الکترونیک: ahmadalipb@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۹ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۱/۶/۱۵

سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند از ایزوله‌های غالب بود، قرار گرفت. در این آزمایش از روش تاثیر Broth micro dilution استفاده شد و MIC باکتری‌های غالب جداسازی شده تعیین گردید. کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد و غلظت نیم مک فارلند از باکتری‌های مورد نظر تهیه گردید. روش به- صورت میکروتیتر پلیت بوده و $80 \mu\text{l}$ از محیط کشت نوترینت برات، $80 \mu\text{l}$ از محلول نیم مک فارلند باکتری و $40 \mu\text{l}$ میکرولیتر از محلول کلونیدی نانو نقره در غلظت‌های 0.5 ppm ، 1 ppm ، 2 ppm ، 4 ppm ، 8 ppm انجام شد. این روش با سه بار تکرار انجام شد و طول موج مورد استفاده 630 nm می‌باشد. برای بررسی اختلاف از آزمون مجذور کای استفاده شد و مقادیر P کمتر از 0.05 به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

باکتری‌های مورد نظر نسبت به تست‌های انجام شده دارای این مشخصات بودند:

۱- اش‌ریشیاکلی: باسیل گرم منفی، بدون اسپور، متحرک، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، لاکتوز مثبت، دارای جلای فلزی در محیط EMB، MR مثبت، VP منفی، اندول مثبت، تولید اسید و گاز از تخمیر گلوکز مثبت است. مانیتول مثبت بوده و احیای نیترا به نیتريت مثبت است.

۲- سیتروباکتر فروندی: باسیل گرم منفی، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت، گلوکز را تخمیر می‌کند و تولید گاز می‌نماید، و متحرک می‌باشد.

۳- باسیلوس سرفوس: دارای VP مثبت، قابلیت تخمیر گلوکز را ندارد، مانیتول منفی، در شرایط بی‌هوازی قابلیت رشد دارد، سیترات مثبت، اندول منفی، و حرکت دارد.

۴- باسیلوس آنتراسیس: دارای VP مثبت، قابلیت تخمیر گلوکز را ندارد، مانیتول منفی، در شرایط بی‌هوازی قابلیت رشد دارد، سیترات متغیر، اندول منفی، و حرکت ندارد.

۵- باسیلوس سویتلیس: دارای VP مثبت، قابلیت تخمیر گلوکز را ندارد، مانیتول مثبت، در شرایط بی‌هوازی قابلیت رشد ندارد، سیترات مثبت، اندول منفی، و حرکت دارد.

۶- پروتئوس ولگاریس: باسیل گرم منفی است، متحرک، تولید H_2S مثبت، اکسیداز منفی، کاتالاز منفی، MR مثبت، VP منفی، اندول مثبت، سیترات منفی، و هیدرولیز اوره مثبت می‌باشد.

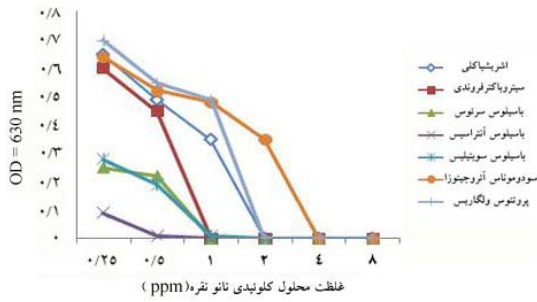
۷- سودوموناس آئروجینوزا: باسیل گرم منفی، متحرک، دارای پیگمان سبز رنگ بر روی محیط مولر هیتون آگار، دارای بوی مطبوع، عدم تخمیر قندها و لاکتوز منفی، و اکسیداز مثبت است.

اصولاً باکتری‌ها به‌علت داشتن ویژگی‌های متعدد چون پیلی و تولید EPS در یک محیط آبی تمایل برای چسبیدن به سطوح مختلفی دارند. فلز نقره و یون‌های آن به‌دلیل خاصیت ضد میکروبی در گذشته کاربرد فراوانی داشته‌اند و برای نگه‌داری از آب آشامیدنی، ترمیم زخم‌های سوختگی، و جلوگیری از عفونت- های گنوکوکی نوزادان به‌کار می‌رفتند [۸]. اگرچه با ظهور آنتی- بیوتیک‌ها، استفاده از این مواد کم‌رنگ شد، اما امروزه به‌دلیل مقاومت‌های میکروبی و هم‌چنین طیف وسیع اثر نقره، استفاده از این مواد رونق گرفته است [۹]. تفاوت در این است که امروزه استفاده از این مواد در غالب فرمول‌های جدید مانند مواد نانومقیاس (کمتر از 100 nm نانومتر) به‌کار می‌رود. این مواد به‌دلیل سطح بالای تماس (نسبت سطح به حجم) و هم‌چنین ویژگی‌های منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی، می‌توانند مواد بسیار خوبی برای ضدعفونی کردن باشند [۱۰]. با توجه به مطالب گفته شده این مطالعه اثربخشی یک محلول نانونقره را بر روی جدایه‌های غالب از سیستم بیوراکتور غشایی مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها

سیستم مورد مطالعه، بیوراکتور غشایی در تصفیه خانه جنوب اصفهان می‌باشد که بخشی از باکتری‌های موجود در آن به- صورت معلق و بخشی بر روی غشای بیوراکتور چسبیده‌اند. در این مطالعه از نانونقره به‌صورت سوسپانسیون از شرکت نانو نصب پارس تهران استفاده گردید. این ماده حاوی 500 ppm از نانو ذرات نقره است که به‌صورت معلق کلونیدی استفاده می‌گردد. این ماده در محیط کشت، پایداری خود را حفظ می‌کند. اندازه این نانو ذرات 4 nm نانومتر بوده است. تمامی مواد و وسایل به‌کار رفته در این آزمایش، از شرکت مرک آلمان تهیه شده است. جداسازی باکتری- ها بر اساس روش تهیه رقت و ریختن در پلیت حاوی محیط نوترین آگار و گرماگذاری در دمای 34 درجه سانتی‌گراد انجام شد. در این مطالعه، از آزمایش‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی شامل رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اندول، سیمون سیترات، احیای نیترا، تست وژپرسکوئر و تخمیر هیدرات‌های کربن، TSI و هم‌چنین محیط‌های کشت بلاد آگار، مولر هیتون، انوزین متیلن بلو، نوترینت آگار، برین هارت اینفیوژن آگار و API 20A جهت شناسایی نسبی استفاده گردید. ابتدا به‌روش تهیه سریال رقت غلظت‌های 0.5 ppm ، 1 ppm ، 2 ppm ، 4 ppm ، 8 ppm از این محلول تهیه شد و بلائک دیسک‌ها به‌مدت یک ساعت در غلظت‌های تهیه شده قرار داده شد و سپس این دیسک‌ها بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار (MHA) که حاوی

نتایج سنجش MIC



نمودار شماره ۲- روند حذف جدایه‌های غالب در مقادیر مختلف نانوقره

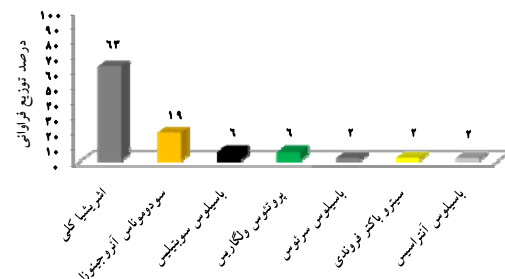
در نمودار شماره ۲ روند حذف جدایه‌ها در مقادیر مختلف نانوقره با یکدیگر مقایسه شده است. همان‌گونه که در این نمودار مشخص شده است، در OD برابر با ۰.۳۶۰nm با کاهش رقت محلول و افزایش غلظت، حذف باکتری‌ها با شدت بیشتری صورت پذیرفته است.

جدول شماره ۱- نتایج MIC و MBC در بین جدایه‌های غالب از

Bacteria	MIC (ppm)	MBC (ppm)
اشریشیا کلی	۲	۸
سیتروباکتر فروندی	۱	۸
باسیلوس سرنوس	۱	۲
باسیلوس آنتراسیس	۰/۵	۱
باسیلوس سوبتیلیس	۱	۲
سودوموناس آئروجینوزا	۴	۸
پروتئوس ولگاریس	۲	۸

جدول شماره ۱، به میزان بیشترین و کمترین غلظت کشندگی و نیز به بیشترین و کمترین غلظت مهارکنندگی نانوقره اشاره دارد.

همان‌طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، پس از انجام آزمایش برای باکتری‌های اشریشیاکلی، سیتروباکتر فروندی، سودوموناس آئروجینوزا، پروتئوس ولگاریس در هر سه بار تکرار، اولین خانه فاقد کدورت که پس از کشت، هیچ کلونی در آن رشد نکرد و برابر با ۸ ppm بود، به‌عنوان MBC گزارش شد و MIC آنها به ترتیب ۲، ۱، ۴، ۱ ppm گزارش گردید. در مورد باسیلوس سرنوس و باسیلوس سوبتیلیس MBC برابر با ۲ ppm و MIC آنها برابر با ۱ ppm گزارش شد. در مورد باسیلوس آنتراسیس MBC برابر با ۱ ppm و MIC آن برابر با ۰/۵ ppm گزارش گردید. در جدول شماره ۱ میزان غلظت مهارکنندگی و غلظت کشندگی هر یک از ایزوله‌ها مشخص گردیده است. در نمودار شماره ۱ ایزوله‌های غالب به ترتیب میزان فراوانی مشخص گردیده است. نتایج حاکی از آن است که باکتری اشریشیاکلی واجد بیشترین فراوانی می‌باشد. در جدول شماره ۱ و ۲ به نتایج تاثیر محلول نانو ذرات MIC، MBC اشاره گردیده است. همان‌گونه که در نمودار شماره ۱ ملاحظه می‌شود بیشترین درصد فراوانی مربوط به اشریشیاکلی می‌باشد.



نمودار شماره ۱- فراوانی جدایه‌های غالب در بیوفیلم موجود در سیستم MBR

جدول شماره ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد ایزوله‌ها در برابر غلظت‌های مختلف محلول‌های نانو ذرات نقره

ردیف	باکتری‌های غالب جداسازی شده	غلظت ذرات نانو نقره بر حسب ppm				
		۰/۵	۱	۲	۴	۸
۱	اشریشیاکلی	-	-	۸	۱۰	۱۴
۲	سیتروباکتر فروندی	-	۹	۱۰	۱۱	۱۳
۳	باسیلوس سرنوس	-	۱۲	۱۴	۱۵	۱۷
۴	باسیلوس آنتراسیس	۹	۱۰	۱۵	۱۶	۱۹
۵	باسیلوس سوبتیلیس	-	۸	۹	۱۱	۱۴
۶	سودوموناس آئروجینوزا	-	-	-	۸	۱۱
۷	پروتئوس ولگاریس	-	-	۱۱	۱۲	۱۴

آشامیدنی ایران جدول شماره دو حدود مجاز مواد شیمیایی سمی ذکر گردیده است، اما در مورد نانو نقره و حد مجاز آن اشاره نشده است. این در حالی است که در بند ۴-۱۱ استاندارد ۱۰۵۳، حداکثر مجاز مصرف مواد شیمیایی آن است که مصرف آن در کوتاه مدت یا دراز مدت سبب ایجاد عارضه سوء برای سلامت انسان نشود. با توجه به مطالعات نویسندگان، تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر اینکه فعالیت نانو نقره را نشان دهد وجود ندارد و مکانیسم فعالیت این ترکیب بر روی باکتری‌ها شناخته نشده است. اگرچه نشان داده شده است که فعالیت و واکنش نانو نقره بر روی غشای باکتری متمرکز می‌گردد و باعث ایجاد تغییرات ساختاری و آسیب‌های و در نهایت مرگ سلولی می‌شود. حبیبیان دهکردی و همکارانش تاثیر نانو نقره را بر روی *S.aureus* جدا شده از پستان گاو که مبتلا به ورم پستان بود بررسی نموده و نشان دادند که نانو ذرات نقره در غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ بعد از حدود هفت دقیقه می‌تواند باعث مرگ *S.aureus* گردد [۱۶]. البته *Yeo* و همکاران گزارش کرده‌اند که نانو ذرات نقره در محلول کلونیدی در غلظت ۵ ppm می‌تواند تاثیر بسیار مطلوبی را بر روی حذف و مهار باکتری‌ها نشان دهند [۱۶]. هم‌چنین، *Lee* و همکاران گزارش کرده‌اند که نانو ذرات نقره در محلول کلونیدی در غلظت ۵ ppm می‌تواند تاثیر بسیار مطلوبی را بر روی حذف و مهار باکتری‌ها نشان دهد [۱۷].

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت استفاده از نانو ذرات نقره جهت حذف و کاهش رشد باکتری‌ها موثر می‌باشد، اما کاربرد این ذرات در سیستم‌های آب آشامیدنی جهت اثبات عدم سمی بودن نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه دارد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش مربوط به پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی و مصوب دانشگاه آزاد قم بوده است. نویسندگان بدین‌وسیله از مسئولین محترم تصفیه‌خانه جنوب اصفهان و آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد فلاورجان و کلیه اساتید محترم و افرادی که در انجام این پروژه نقش موثری را ایفا نموده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

References:

[1] Kim TN, Feng QL, Kim JO, Wu J, Wang H, Chen GC, et al. Antimicrobial effects of metal ions

تشکیل بیوفیلم سبب می‌شود که باکتری‌ها به عوامل ضد میکروبی مقاوم شوند [۱۱]. Rosenberg و همکاران گزارش کردند که بالا بودن سطح آب‌دوستی سطح سلول‌ها سبب می‌شود که باکتری تمایل بیشتری برای اتصال به سطوح داشته باشند که در نتیجه سبب شروع تشکیل بیوفیلم و بروز اثرات مخرب آن می‌شود [۱۲]. Stewart و همکاران بیان نموده‌اند که حذف ناقص بیوفیلم از سطح توسط عوامل ضد میکروبی منجر به رشد مجدد سلول‌های باقیمانده در بیوفیلم می‌شود و بیوفیلم‌ها بعد از گذشت مدت زمان کوتاهی به حالت اولیه خود بر می‌گردند [۱۳]. نتایج حاصل از مطالعه *Kolter* و *O'Toole* بر روی موتانت‌های سودوموناس آئروجینوزا نشان داد که حرکت غلطیدن وابسته به پیلی نوع IV، یک نقش اساسی را در تجمع برای این ارگانسیم بازی می‌کند و نتایج ما با نتایج این محققین هم‌خوانی داشت. در این مطالعه، سیستم‌های تصفیه خانه جنوب اصفهان مورد بررسی قرار گرفت که یکی از مهمترین قسمت‌های مورد توجه، دستگاه MBR (بیوراکتور غشایی) می‌باشد [۱۴]. با توجه به اینکه در سیستم بیوراکتور، غشایی جهت فیلتراسیون وجود دارد و بعد از مدتی با ایجاد بیوفیلم کارایی سیستم تحت تاثیر قرار می‌گیرد، لذا در این تحقیق از محلول کلونیدی نانو نقره با اندازه ذرات کروی شکل ۴ نانومتر جهت حذف باکتری‌های غالب موجود استفاده شد و نتایج این تحقیق حاکی از آن است که تاثیر محلول کلونیدی نانو ذرات نقره در باکتری‌های گرم مثبت جداسازی شده اعم از باسیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس آنتراسیس به‌مراتب بیشتر از باکتری‌های گرم منفی جداسازی شده می‌باشد، برای مثال با توجه به جدول شماره یک، کمترین غلظت مهارکنندگی محلول نانو نقره مربوط به باکتری باسیلوس آنتراسیس به میزان ۰/۵ ppm و بیشترین غلظت مهارکنندگی مربوط به باکتری سودوموناس آئروجینوزا به میزان ۴ ppm می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل ملاحظه می‌شود که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره قطر هاله عدم رشد افزایش یافته است. علیراده و همکاران در پژوهشی که بر روی بروسلا ملی‌تنسیس انجام دادند از غلظت‌های صفر تا ۴۰۰۰ ppm و قطر ذرات از ۳ تا ۱۸ نانومتر استفاده نموده و مشاهده کردند که حداقل غلظت مهارکننده ۴ ppm و حداقل غلظت کشنده ۶ ppm می‌باشد [۱۵]. در استاندارد ۱۰۵۳ آب

(Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 1998; 9(3): 129-34.

- [2] Alp S. Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41(1): 155-61.
- [3] Cerf O, Carpentier B, Sanders P. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: "resistance" has different meanings. *Int J Food Microbiol* 2010; 136(3): 247-54.
- [4] Miranzadeh M, Rabbani D, Naseri S, Nabizadeh R, Mousavi S, Ghadami F. Coliform bacteria removal from contaminated water using nanosilver. *Feyz* 2012; 16(1): 31-5.
- [5] Brindle K, Stephenson T. The application of membrane biological reactors for the treatment of wastewaters. *Biotechnol Bioeng* 1996; 49(6): 601-10.
- [6] Van Dijk L, Roncken GG. Membrane Bioreactor for Wastewater Treatment: The State of Art and New Development. *Wat Sci Tech* 1997; 35(10): 35-41.
- [7] Thomass H, Jodd S. Fouling Characteristics of Membrane Filtration in Membrane Bioreactors. *Membrane Technology* 1999; (122): 10-3.
- [8] Belfort G. Membranes and Bioreactors: A Technical Challenge in biotechnology. *Biotechnol Bioeng* 1989; 33(8): 1047-66.
- [9] 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): 587-90.
- [10] Silva Paula MMD, Franco CV, Baldin MC, Rodrigues L, Barichello T, Savi GD, et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poly-{styrene-acrylic acid} with silver nanoparticles. *Mater Sci Eng* 2009; 29(2): 647- 50.
- [11] Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 2009; 27(1): 76-83.
- [12] Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* 1980; 9: 29-33.
- [13] Costerton JW, Stewart PS. Biofilms and device-related infections. In: Nataro JP, Blaser MJ, Cunningham-Rundles S, eds. Persistent bacterial infections. *Washington, DC: ASM Press*, 2000: 432-39.
- [14] O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998; 30(2): 295-304.
- [15] Alizadeh H, Salouti M, Shapouri R, Abdollahzadeh P, Nasseryan J. Antibacterial effects of silver nanoparticles on *Brucella melitensis* 16M in an animal model in Vitro. *J Arak Univ Med Sci* 2012; 14(Suppl 3): 64-70. [in Persian]
- [16] Habibian Dehkordi S, Hosseinpour F, Ebrahimi Kahrizangi A. An in vitro evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Afr J Biotechnol* 2011; 10(52): 10795-7.
- [17] Yeo SY, Lee HJ, Jeong SH. Preparation of nanocomposite fibers for permanent antibacterial effect. *J Mater Sci* 2003; 38(10): 2143-7.