

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

Ahmadi M¹, Pourbabae 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; *Citrobacter*, 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, Pourbabae 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 تشکیل دهنده بیوفیلم در این سیستم‌ها و بررسی اثر کشندگی نانوذرات نقره در سایز کوچک‌تر (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 افتراقي minimal inhibitory concentration (MIC). Broth micro dilution (MBC)، ایزوله‌های غالب شناختی گردید. سپس با استفاده از روش (MIC)، ایزوله‌های غالب شناختی گردید. سپس با استفاده از روش (MBC)، ایزوله‌های غالب شناختی گردید. سپس با استفاده از روش (MIC)، ایزوله‌های غالب شناختی گردید. سپس با استفاده از روش (MBC)، ایزوله‌های غالب شناختی گردید. نقره، دیسک‌های استاندارد تهیه و بهروش انتشار دیسک درآکار در محیط کشت مولر هیلتون آگار ارزیابی شد و قطر هاله مهاری اندازه‌گیری شد.

نتایج: جدایها به ترتیب فراوانی شامل: اشريشیاکلی، سودوموناس آئروجینوزا، بروتونوس، باسیلوس سرئوس، سیتروباکتر، و باسیلوس آنتراسیس بودند. حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) ذرات نانو نقره با قطر ۴ نانومتری بر علیه جدایها اشريشیاکلی برابر ۲ ppm، سیتروباکتر ۱ ppm، باسیلوس سرئوس ۰.۵ ppm، باسیلوس آنتراسیس ۰.۵ ppm، باسیلوس سوبتیلیس ۱ ppm، سودوموناس ۴ ppm و بروتونوس برابر با ۲ ppm بودست 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.

وازگان کلیدی: بیوفیلم، سیستم بیوراکتور غشایی، نانوذرات نقره، حداقل غلظت مهار کننده

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

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 موردنیاز 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 به خاطر ایجاد فشار بیشتر خود باعث گرفتگی غشاء می‌شود [۷].

مقدمه

از دیرباز، حذف میکرووارگانیسم‌های مضر مانند باکتری‌ها، پکک‌ها، 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 کنترل کننده رشد میکرووارگانیسم‌ها دارای انواع متفاوتی هستند که یا باعث کشتن میکرووارگانیسم‌ها یا مهار رشد آنها می‌شوند [۲، ۳]. 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

***لشان نویسنده مسئول:**

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

تلفن: ۰۲۶۳ ۲۲۲۶۰۷ - ۰۹۱۲ ۲۸۵۷۳۹۴

ایمیل: ahmadalipb@gmail.com

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

سوسپانسیون باکتریابی معادل نیم مک فارلند از ایزولهای 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 پلت بوده و 1mL از محیط کشت نوتریت براث، 1mL از محلول نیم مک فارلند باکتری و 1mL $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ میکرولیت از محلول کلوئیدی نانو نقره در غلظت‌های 0.05 ppm ، 0.1 ppm ، 0.2 ppm ، 0.4 ppm ، 0.8 ppm انجام شد. این روش با سه بار تکرار انجام شد و طول موج مورد استفاده nm ۶۳۰ می‌باشد. برای بررسی اختلاف از آزمون مجدور کای استفاده شد و مقادیر P کمتر از 0.05 به عنوان 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 MR، EMB مثبت، VP منفی، اندول مثبت، تولید اسید و گاز از تخمیر گلوكز مثبت است. مانیتول مثبت بوده و احیای نیترات به نیتریت مثبت است.

۲- سیتروبacter فرونندي: باسیل گرم منفی، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت، گلوكز را تخمیر می‌کند و تولید گاز می‌نماید، و متحرک می‌باشد.

۳- باسیلوس سرئوس: دارای VP مثبت، قابلیت تخمیر گلوكز را ندارد، مانیتول منفی، در شرایط بی‌هوایی قابلیت رشد دارد، سیترات مثبت، اندول منفی، و حرکت دارد.

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

۵- باسیلوس سوبتیلیس: دارای VP مثبت، قابلیت تخمیر گلوكز را ندارد، مانیتول مثبت، در شرایط بی‌هوایی قابلیت رشد ندارد، سیترات مثبت، اندول منفی، و حرکت دارد.

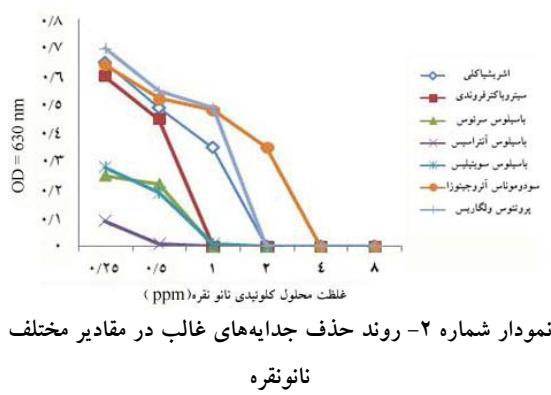
۶- پروتونوس ولگاریس: باسیل گرم منفی است، متحرک، تولید H_2S مثبت، اکسیداز منفی، کاتالاز منفی، MR مثبت، VP منفی، اندول مثبت، سیترات منفی، و هیدرولیز اوره مثبت می‌باشد.

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

اصولاً باکتری‌ها به علت داشتن ویژگی‌های متعدد چون پلی و تولید EPS در یک محیط آبی تمایل برای چسبیدن به سطوح مختلفی دارند. فلز نقره و یون‌های آن به دلیل خاصیت ضد میکروبی در گذشته کاربرد فراوانی داشته‌اند و برای نگهداری از آب آشامیدنی، ترمیم زخم‌های سوختنگی، و جلوگیری از عفونت‌های گنوکوکی نوزادان بدکار می‌رفتند [۸]. اگرچه 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 گرفته است [۹]. تفاوت در این است که امروزه استفاده از این مواد در غالب فرمول‌های جدید مانند مواد نانومقیاس (کمتر از 100 نانومتر) به کار می‌رود. این مواد به دلیل 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 نانو نقره 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 نانو نقره به صورت سوسپانسیون از شرکت نانو نصب پارس تهران استفاده گردید. این ماده حاوی 500 ppm از نانوذرات نقره است که به صورت معلق کلوئیدی استفاده می‌گردد. این ماده در محیط کشت، پایداری خود را حفظ می‌کند. اندازه این نانوذرات نقره است که به صورت معلق کلوئیدی استفاده می‌گردد. این نانوذرات در محیط کشت، پایداری خود را حفظ می‌کند. اندازه این نانوذرات $4\text{ }\mu\text{m}$ بوده است. تمامی مواد و وسایل به کار رفته در این آزمایش، از شرکت مرک آلمان تهیه شده است. جداسازی باکتری‌ها بر اساس روش تهیه رقت و ریختن در پلیت حاوی محیط نوتربین آگار و گرم‌گذاری 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 نیترات، تست وژرسکوئر و تخمیر هیدرات‌های کربن، TSI و همچنین محیط‌های کشت بلاد آگار، مولر هیبتون، API ۲۰A جهت شناسایی نسبی استفاده گردید. ابتدا بهروش تهیه سریال رقت غلظت‌های 0.05 ppm ، 0.1 ppm ، 0.2 ppm ، 0.4 ppm ، 0.8 ppm از این محلول تهیه شد و بلانک دیسک‌ها به مدت یک ساعت در غلظت‌های تهیه شده قرار داده شد و سپس این دیسک‌ها بر روی محیط کشت مولر هیبتون آگار (MHA) که حاوی



در نمودار شماره ۲ روند حذف جدایهای غالب در مقادیر مختلف نانو ذرات با یکدیگر مقایسه شده است. همان‌گونه که در این نمودار مشخص شده است، در OD برابر با ۰/۵ ppm با کاهش رقت محلول و افزایش غلظت، حذف باکتری‌ها با شدت بیشتری صورت پذیرفته است.

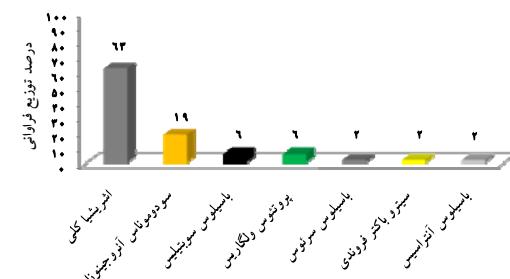
جدول شماره ۱- نتایج MIC و MBC در بین جدایهای غالب از بیوفیلم سیستم بیوراکتور غشایی (MBR)

Bacteria	MIC (ppm)	MBC (ppm)
اشتریشاکلی	۲	۸
سیتروباکتر فروندی	۱	۸
پاسیلوس سرئوس	۱	۲
پاسیلوس آنتراسپس	۰/۵	۱
پاسیلوس سوبیلیس	۱	۲
سودوموناس آئروجینوزا	۴	۸
پروتونوس ولگاریس	۲	۸

جدول شماره ۱، به میزان بیشترین و کمترین غلظت کشنیدگی و نیز به بیشترین و کمترین غلظت مهار کنندگی نانو ذرات نقره اشاره دارد.

نتایج سنجش MIC

همان‌طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، پس از انجام آزمایش برای باکتری‌های اشتریشاکلی، سیتروباکتر فروندی، سودوموناس آئروجینوزا، پروتونوس ولگاریس در هر سه بار تکرار، اولین خانه فاقد دورت که پس از کشت، هیچ کلونی در آن رشد نکرد و برابر با ۸ ppm بود، به عنوان MBC گزارش شد و آنها به ترتیب ۲ ppm، ۴ ppm، ۱ ppm گزارش گردید. در مورد پاسیلوس سرئوس و پاسیلوس سوبیلیس MBC برابر با ۲ ppm و MIC آنها برابر با ۱ ppm گزارش شد. در مورد پاسیلوس آنتراسپس MBC برابر با ۰/۵ ppm آن برابر با ۱ ppm گزارش گردید. در جدول شماره ۱ میزان غلظت مهار کنندگی و غلظت کشنیدگی هریک 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 اشتریشاکلی واجد بیشترین فراوانی می‌باشد. در جدول شماره ۱ و ۲ به نتایج تاثیر محلول نانو ذرات نقره MIC اشاره گردیده است. همان‌گونه که در نمودار شماره ۱ ملاحظه می‌شود بیشترین درصد فراوانی مربوط به اشتریشاکلی می‌باشد.



نمودار شماره ۱- فراوانی جدایهای 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 ذرات نقره بر حسب ppm					
		۸	۴	۲	۱	۰/۵	-
۱	اشتریشاکلی	۱۴	۱۰	۸	-	-	
۲	سیتروباکتر فروندی	۱۳	۱۱	۱۰	۹	-	
۳	پاسیلوس سرئوس	۱۷	۱۵	۱۴	۱۲	-	
۴	پاسیلوس آنتراسپس	۱۹	۱۶	۱۵	۱۰	۹	
۵	پاسیلوس سوبیلیس	۱۴	۱۱	۹	۸	-	
۶	سودوموناس آئروجینوزا	۱۱	۸	-	-	-	
۷	پروتونوس ولگاریس	۱۴	۱۲	۱۱	-	-	

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 ۱۱-۴ استاندارد ۱۰۵۳^۳ حداقل 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 نویسنده‌گان، 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 مرکزی می‌گردد و باعث ایجاد تغییرات ساختاری و آسیب غشایی و در نهایت مرگ سلولی می‌شود. حیبیان دهکردی و همکارانش تاثیر نانو نقره را بر روی *S.aureus* جدادشده از پستان گاو که مبتلا به ورم پستان بود بررسی نموده و نشان دادند که نانو ذرات نقره در غلظت $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ بعد از حدود هفت دقیقه می‌تواند باعث مرگ *S.aureus* گردد [۱۶]. البته Yeo و همکاران گزارش کرده‌اند که نانو ذرات نقره در محلول کلوئیدی در غلظت 5 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. نویسنده‌گان بدین‌وسیله از مسئولین محترم تصفیه‌خانه جنوب اصفهان و آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد فلاورجان و کلیه اساتید محترم و افرادی که در انجام این پژوهش نقش موثری را ایفا نموده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

بحث

تشکیل بیوفیلم سبب می‌شود که باکتری‌ها به عوامل ضد میکروبی مقاوم شوند [۱۱]. Rosenberg و همکاران گزارش کرده‌اند 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 مغرب 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 O'Toole و Kolter بر روی موتانت‌های سودوموناس آئروجینوزا نشان داد که حرکت غلطیدن وابسته به پیلی نوع IV، یک نقش اساسی را در تجمع برای این ارگانیسم 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 کلوئیدی 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 کلوئیدی نانو ذرات نقره در باکتری‌های گرم مثبت جداسازی شده اعم از با سیلوس سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس آنتراسیس به مرتبه بیشتر از باکتری‌های گرم منفی جداسازی شده می‌باشد، برای مثال با توجه به جدول شماره یک، کمترین غلظت مهار کنندگی محلول نانو نقره مربوط به باکتری باسیلوس آنتراسیس به میزان 0.5 ppm و بیشترین غلظت مهار کنندگی مربوط به باکتری سودوموناس آئروجینوزا به میزان 4 ppm می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل ملاحظه می‌شود که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره قطر هاله عدم رشد افزایش یافته است. علی‌زاده و همکاران در پژوهشی که بر روی بروسلا ملی تسبیس انجام دادند از غلظت‌های صفر تا 4000 ppm و قطر ذرات از 3 تا 18 نانومتر استفاده نموده و مشاهده کردند که حداقل غلظت مهار کننده 4 ppm و حداقل غلظت کشنه 6 ppm می‌باشد [۱۵]. در استاندارد ۱۰۵۳ آب

References:

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

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

- [2] Alp S. Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants. *Mikrobiol 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.