INSO
19583
1st. Edition
2015

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۱۹۵۸۳
چاپ اول
۱۳۹۴

فناوری نانو – ارزیابی کمی فعالیت نانو ذرات نقره از طریق آزادسازی مورامیک اسید از *استافیلوکوکوس اورئوس*

Nanotechnologies - Quantitative assesment of silver nanoparticles by release of muramic acid from *Staphylococcus aureus*

ICS:07.030

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است .

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان ، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] ،کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور ، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود .

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2 - International Electrotechnical Commission
3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

" فناوری نانو – ارزیابی کمی فعالیت نانو ذرات نقره از طریق آزادسازی مورامیک اسید از *استافیلوکوکوس اورئوس*"

رئیس:	**سمت و/ یا نمایندگی**
کوهی، مجمد کاظم (دکتری سم شناسی)	عضو هیئت علمی دانشگاه تهران
دبیر:	
فاطمه میرزاجانی دمنه (دکتری فیتوشیمی)	عضو هیئت علمی دانشگاه شهید بهشتی
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اسلامی پور، الهه (کارشناس ارشد زیست شناسی)	کارشناس ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
پوی پوی، حسن (کارشناس ارشد شیمی)	کارشناس ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
جعفری نژاد، سمیه (کارشناس ارشد نانو تکنولوژی پزشکی)	کارشناس ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
چوخاچی زاده، مقدم (کارشناس ارشد مواد)	کارشناس ستاد ویژه توسعه فناوری نانو
سیفی، مهوش (کارشناس ارشد مدیریت دولتی)	نایب رئیس کمیته فنی متناظر فناوری نانو
آتوسا علی احمدی (دکتری میکروبیولوژی)	عضو هیئت علمی دانشگاه شهید بهشتی
مسروری، حسن (دکتری شیمی)	عضو هیئت علمی دانشگاه تهران

پیش‌گفتار

استاندارد " فناوری نانو – ارزیابی کمی فعالیت نانوذرات نقره از طریق آزادسازی مورامیک اسید از *استافیلوکوکوس اورئوس*" که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط توسط ستاد ویژه توسعه فناوری نانو مستقر در نهاد ریاست جمهوری تهیه و تدوین شده است و در بیست و یکمین اجلاسیه کمیته ملی فناوری نانو مورخ ۹۴/۰۳/۲۶ مورد تصویب قرار گرفته است. اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین باید همواره از آخرین تجدید نظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

منبع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

ISO/TS 16550: 2014, Nanotechnologies - Determination of silver nanoparticles potency by release of muramic acid from Staphylococcus aureus

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد	ب
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	پ
پیش‌گفتار	ت
مقدمه	ث
۱ هدف و دامنه کاربرد	۱
۲ نمادها، اختصارات، اصطلاحات و تعاریف	۱
۲- ۱ نمادها و اختصارات	۱
۲- ۲ اصطلاحات و تعاریف	۱
۳ اصول	۴
۴ آماده سازی نمونه برای تعیین مورامیک اسید	۵
۴- ۱شرایط رشد باکتری و تیمار نانو ذرات نقره	۵
۴- ۱- ۱ اصول و روش آزمون	۵
۴- ۱- ۲ شرح روش آزمون	۶
۴- ۱- ۲- ۱ مواد	۶
۴- ۱- ۲- ۲ شرایط انجام آزمون	۷
۴- ۱- ۲- ۳ حلال / حامل	۷
۴- ۱- ۲- ۴ غلظت تیمار دهی	۷
۴- ۱- ۲- ۵ روش کار	۷
۴- ۱- ۲- ۶ شرایط تیمار دهی	۷
۴- ۱- ۲- ۷ گرماگذاری	۸
۴- ۲ هیدرولیز دیواره سلولی	۸
۴- ۳ مشتق‌سازی دیواره سلولی	۹
۴- ۴ کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری جرمی	۹
۵ تجزیه و تحلیل نتایج و تفسیر	۱۰
۶ روش آزمون نمونه نانو ذرات نقره	۱۱
پیوست الف (اطلاعاتی)- کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری جرمی	۱۲
پیوست ب (اطلاعاتی)- استاندارد داخلی	۱۳
پیوست پ (اطلاعاتی)- تهیه نانو ذرات بومی در آزمایشگاه	۱۴
پیوست ت (اطلاعاتی)- آماده سازی سوسپانسیون نانوذرات نقره	۱۵
پیوست ث (اطلاعاتی)- شرایط نمونه‌های کنترل، کنترل مثبت و منفی	۱۶
پیوست ج- منابع و کتابشناسی	۱۷

مقدمه

به دلیل خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره، به‌طور فزاینده از آنها در محصولات مصرفی استفاده شده است. از این ترکیبات به‌طور گسترده‌ای برای توسعه بسیاری از فرآیندهای زیستی و دارویی، محصولات و برخی کاربردها مانند مواد پوشش‌دهنده برای دستگاه‌های پزشکی، مواد ارتوپدی و یا دندان‌پزشکی، کمک‌های اولیه و پانسمان موضعی ترمیمی، لباس، لباس زیر و جوراب، محصولات نساجی و حتی در ماشین‌های لباسشویی مورد استفاده قرار می‌گیرند [به مرجع شماره۱ مراجعه شود]. صنایع به تولید انواع گسترده‌ای از نانوذرات نقره به‌عنوان عوامل ضدباکتری با خواص فیزیکی مختلف و بدون توجه به عوارض جانبی آنها می‌پردازند. علاوه بر این، خطر فراهمی زیستی ناشی از افزایش نانوذرات در محیط‌های مختلف وجود دارد [به مراجع شماره‌های۲ و۳ مراجعه شود] که ممکن است بر فلور میکروبی مفید خاک، گیاهان، حیوانات و انسان اثرگذار باشد. از این رو باید میزان فعالیت نانو ذرات نقره با توجه به فعالیت‌های زیستی نهایی آنها ارزیابی و بر این اساس طبقه‌بندی شوند.

از این استاندارد نمی‌توان برای ارزیابی خصوصیات نانو ذره استفاده کرد.

فناوری نانو – ارزیابی کمی فعالیت نانو ذرات نقره از طریق آزادسازی مورامیک اسید از *استافیلوکوکوس اورئوس*

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد ارزیابی میزان فعالیت و قدرت نانوذرات نقره از طریق میزان تخریب دیواره سلولی *استافیلوکوکوس اورئوس* و انتشار مورامیک اسید از طریق روماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی است. این استاندارد شامل اطلاعات مربوط به طیف گسترده عملکرد نانوذرات نقره بر علیه باکتری‌ها نیست.

۲ نمادها، اختصارات، اصطلاحات و تعاریف

۲-۱ نمادها و اختصارات

DLS	Dynamic Light Scatering	پراکندگی نور پویا
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry	کروماتوگرافی گازی – طیف‌سنجی جرمی
LDR	Linear Dynamic Range	محدوده پاسخ خطی منحنی کالیبراسیون
LOD	Limit of Detection	حد تشخیص
LOQ	Limit of Quantification	حد اندازه‌گیری کمی
MHB	Muller Hinton Brath	محیط کشت مایع مولر- هینتون- براث
NA	Nutrient Agar	محیط کشت آگار مغذی
OD_{600}	Optical Density at 600 nm	میزان جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانو متر
SIM	Selected Ion Monitoring	طیف‌سنجی جرمی به روش یون انتخاب شده
TEM	Transmision Electron Microscopy	میکروسکوپ الکترونی
UV-Vis	UV Visible Spectroscopy	طیف‌سنجی مرئی فرابنفش
XRD	X-ray Differaction	پراش پرتو ایکس

۲-۲ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و تعاریف زیر به‌کار می‌رود:

۲-۲-۱

فعالیت ضد باکتری

خاصیت یا ترکیب یا ماده‌ای که باکتری‌ها را می‌کشد و یا رشد آنها را کند می‌کند.

۲-۲-۲

پراکندگی نور پویا

طیف‌سنجی همبستگی فوتون

روشی است در فیزیک که می‌توان از آن برای تعیین مشخصات توزیع اندازه ذرات کوچک در سوسپانسیون و یا محلول‌های پلیمری استفاده کرد.

۳-۲-۲

کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی‌جرمی[1]

روشی که شامل ترکیبی از ویژگی‌های کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنجی جرمی است و برای مطالعه کمی و کیفی ترکیبات فرار مورد استفاده قرار می‌گیرد (به پیوست الف مراجعه شود).

۴-۲-۲

باکتری‌های گرم مثبت

باکتری‌هایی هستند که در روش رنگ‌آمیزی گرم نسبت به شستشوی رنگ ایجاد شده توسط حلال‌های آلی مقاومت دارند.

۵-۲-۲

استاندارد داخلی

ترکیبی است با غلظت مشخص که به منظور تسهیل شناسایی به نمونه اضافه شده و امکان مطالعه کیفی و یا کمی اجزای نمونه را فراهم می‌کند (به پیوست ب مراجعه شود).

[منبع ISO 20752 : تعریف ۳-۲و۴]

۶-۲-۲

حد تشخیص[2]

حداقل مقدار یا غلظت آنالیت در نمونه که می‌تواند به‌صورت قابل اعتماد تشخیص داده شود، اما قابل اندازه‌گیری قطعی نبوده و اعتبار ندارد.

[منبع: ISO 8196-1، تعریف ۳-۴ و۵]

۷-۲-۲

حد اندازه گیری کمی[3]

کم‌ترین غلظت نمونه آزمون است که می‌تواند به صورت کمی با سطح قابل قبول از صحت و دقت مشخص شده، قطعی بوده و اعتبار دارد.

[منبع: ISO / TS 15216-1، تعریف ۳-.۶ و۱۸]

۸-۲-۲

محدوده پاسخ خطی منحنی کالیبراسیون[4]

محدوده‌ای که منحنی پاسخ Y بر اساس مقادیر X خطی راست بوده و ضریب همبستگی آن که معادل شیب خط می‌باشد با ضریب انبساط آن یکسان است.

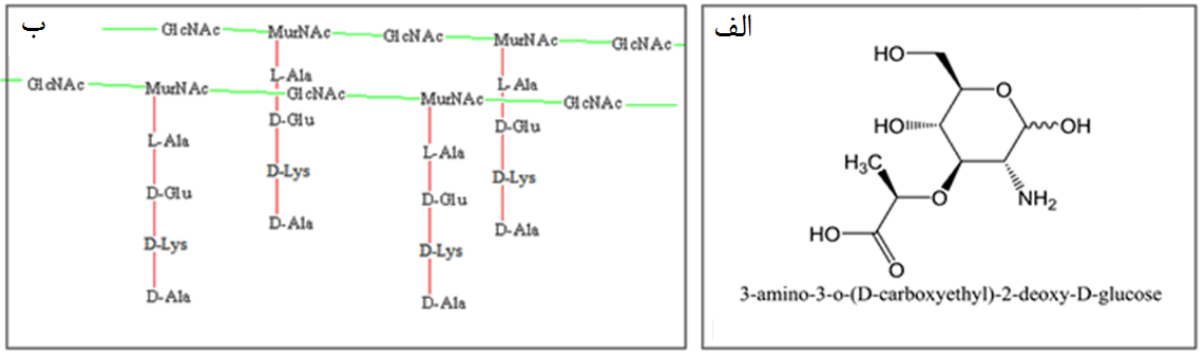
[منبع: ISO 3534-1، تعریف ۱ .۷و۳۴]

1- GC-MS
2 -LOD
3 - LOQ
4 -LDR

۹-۲-۲

مورامیک اسید

قندی آمیدی که از نظر شیمیایی از اتصال بین اسید لاکتیک و گلوکوزامین تولید شده است. این ترکیب به طور طبیعی به عنوان یک مشتق N-استیل در پپتیدوگلیکان (شکل ۱- ب) ایجاد می‌شود [مرجع شماره۸].



شکل ۱- ساختار پپتیدوگلیکان دیواره (الف) و مورامیک اسید (ب)

۱۰-۲-۲

پپتیدوگلیکان

پلیمری متشکل از قندها و اسیدهای آمینه است که لایه ای خلل و فرج دار خارج از غشای پلاسمایی از باکتری تشکیل می‌دهد.

یادآوری- پپتیدوگلیکان ساختاری خاص و ضروری در دیواره سلولی تقریبا تمام باکتری‌ها است. مقدار آن در دیواره‌های سلولی باکتری‌های گرم مثبت قابل توجه است (شکل ۱- الف).

۱۱-۲-۲ فعالیت نانوذرات نقره

واکنش نانوذرات نقره با دیواره باکتری که به‌طور غیر مستقیم با میزان آزادسازی مورامیک اسید ارزیابی می‌شود.

۱۲-۲-۲

استافیلوکوکوس اورئوس

باکتری بی‌هوازی اختیاری، کوکسی گرم مثبت است که در مشاهدات میکروسکوپی به شکل خوشه انگور مشاهده می‌شود. این باکتری قادر به رشد در محیط نمکی بوده و در حضور مانیتول به‌عنوان تنها منبع کربن تولید رنگدانه زرد می‌کند.

۱۳-۲-۲

مقادیر بسیار کم[1]

1 -Trace

غلظت میکروگرم / میلی‌لیتر و یا پایین‌تر

۱۴-۲-۲

میکروسکوپ الکترونی عبوری[1]

روشی است که در آن تصویر بزرگنمایی شده یا الگوی پراش از نمونه بوسیله تابش پرتو الکترونی به آن و برهم‌کنش با آن ایجاد می‌شود.

[منبع، ISO/TS 10797: 2012، تعاریف ۳-۸ واستاندارد ملی: ۱۸۰۸۵مراجعه شود]

۱۵-۲-۲

طیف‌سنجی مرئی فرابنفش[2]

طیف‌سنجی جذب و یا **طیف‌سنجی** بازتابش در محدوده فرابنفش- مرئی است.

یادآوری- از امواجی با طول موج محدوده نور مرئی و ناحیه مجاور مادون قرمز در آن استفاده می‌شود.

۱۶-۲-۲ پراش پرتو ایکس[3]

روشی که در آن از پرتو ایکس یا پراش الکترونی در نمونه پودری و ریز برای توصیف ساختار مواد استفاده می‌شود.

[منبع ISO / TS 80004-6، تعریف ۳-۲-۴ و استاندارد ملی ۷۱۰۶ مراجعه شود]

۳ اصول

پپتیدوگلیکان ترکیبی ضروری و خاص دیواره سلولی باکتری‌ها است، [به مرجع شماره ۸ مراجعه شود]. ساختمان اصلی این ترکیب متشکل از زنجیره‌های قندی است که توسط قطعات کوتاه پپتیدی و به صورت عرضی بهم متصل شده‌اند. رشته‌های اسکلت قندی از اتصال متناوب N- استیل گلوکز آمین و N-استیل مورامیک اسید، ساخته شده است که به صورت β-1 → 4 بهم متصل شده‌اند. زنجیره‌های پپتیدی که اتصالات عرضی را ایجاد می‌کنند از L-آلانین، D-گلوتامین، L-لیزین تشکیل شده، و در مورد *استافیلوکوکوس ارئوس*، D -آلانین (شکل ۱- الف)، [به مراجع شماره‌های ۸ و۹ مراجعه شود] تشکیل شده‌اند. تحقیقات نشان داده‌اند که نانو ذرات نقره می‌توانند به دیواره سلولی باکتریایی آسیب رسانده و قطعات پپتیدو گلیکان را تولید نموده و منجر به افزایش غلظت مورامیک اسید در محیط کشت گردند [به مراجع شماره‌های ۸ و۱۲ مراجعه شود].

نانوذرات نقره به‌عنوان بخش فعال کلوئید نانو ذرات نقره می‌توانند به اندازه‌ها، ویژگی‌های سطح، اشکال، پتانسیل زتا و غلظت‌های مختلف در محصولات تجاری وجود داشته باشند. فعالیت نانوذرات نقره به ویژگی‌های ذکر شده که می‌توانند وابسته به اثرات همسو و یا متقابل این عوامل باشد، بستگی دارد [به مرجع شماره۱۰مراجعه شود]. تشخیص اثرات ناشی از هر یک از این پارامترها مستلزم تهیه تعداد زیادی نمونه و استفاده از انواع زیادی از تجهیزات است. بر این اساس، می‌توان از بررسی تغییرات غلظت مورامیک اسید در

1 -TEM

2 -UV-Vis

3 - XRD

آزمون به عنوان شاخصی از اثرات مجموع مشخصه‌ها، و مقایسه غیر مستقیم فعالیت نانو ذرات نقره استفاده کرد. [به مراجع شماره‌های ۱۴-۱۰ مراجعه شود]

این استاندارد، روش اندازه‌گیری بسیار حساسی از آنالیت مورامیک اسید را به عنوان روشی غیر مستقیم برای بررسی و اندازه گیری قدرت و توانایی تخریب دیواره سلولی ارایه می‌دهد. حساسیت این روش اجازه می‌دهد تا برای تعیین مقدار مورامیک اسید در مقادیر کمتر از حداقل غلظت مهار کننده[1] نیز روش پاسخگو باشد. [به مراجع شماره‌های ۱۷ و ۱۸ مراجعه شود] با این حال، اثر نانوذرات نقره از طریق میزان آزادسازی مورامیک اسید شاهدی از مرگ سلولی و یا توقف رشد سلول نیست.

علاوه بر این، این روش نیازمند یک آزمایشگاه سنتز نمونه کالیبراسیون برای ایجاد یک منحنی دوز-پاسخ برای استفاده‌های بعدی و مقایسه محصولات مواد تجاری است. نانوذرات دارای نوعی دوگانگی رفتار ذره‌ای-شیمیایی هستند که در آن، ذرات علاوه بر خصوصیات ذره‌ای، ممکن است منبع آزادسازی در محیط محلول باشند.

تاثیرات مطالعه شده بر *استافیلوکوکوس اورئوس* نمی‌تواند عملکرد نانو ذرات نقره را بر سایر موجودات گرم مثبت مشخص کند و بطور قطع به دلیل تفاوت ساختاری عمیق بین دو نوع دیواره سلولی نتایج حاصله قابل بسط دادن به باکتری‌های گرم منفی نیست. بنابراین، این استاندارد، جهت بررسی جامعی از اثرات نانوذرات بر باکتری نیست.

با توجه به این ملاحظات، مشخصات نانوذرات نقره و روش کالیبراسیون آزمایشگاه که به‌صورت بومی تهیه شده پیوست پ ارایه شده است.

۴ آماده سازی نمونه برای تعیین مورامیک اسید

۴-۱ شرایط رشد باکتری و تیمار نانو ذرات نقره

۴-۴-۱ اصول و روش آزمون

هنگامی که کشت تازه *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 در محیط کشت مولر هینتون براث[2]، در OD_{600} به مقدارجذب ۰/۵ تا ۰/۴۵ (که دارای حدود $۱-۲ \times ۱۰^{۹}$ CFU/mL سلول است و کشت در اواسط فاز رشد لگاریتمی قرار دارد) رسید، باید با نانو ذرات نقره تیمار شده و برای ۱۸ ساعت در انکوباتور در $۳۷C^{\circ}$ و تحت هم‌زدن ۲۰۰rpm-۱۸۰ قرار داده شود. در مرحله بعدی محیط کشت با سانتریفوژ و فیلتراسیون عاری از سلول‌های باکتری شده و سپس تحت فشار کم و با استفاده از روتاری و فریزدرایر خشک شده و در مرحله بعد، غلظت مورامیک اسید با استفاده از روش شرح داده شده در این استاندارد تعیین خواهد شد. ضروری است که در هر آزمون میزان سلول‌های باکتریایی زنده در محیط کشت مورد استفاده در این استاندارد با دقت بالایی تعیین شود و در هر آزمون نمونه کنترل در نظر گرفته‌شده و منحنی کالیبراسیون در OD_{600} (دارای جذب تقریبی ۰/۵ تا ۰/۴۵)، در یک بازه زمانی مشخص و تا حصول اطمینان از وجود تعداد کافی سلول باکتریایی زنده رسم گردد.

---

1 -Minimum Inhibition Concentration, MIC

۴-۱-۲ شرح روش آزمون

۴-۱-۲-۱ مواد

استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923

محیط کشت مولر هینتون براث، MHB

پلیت نوترینت آگار[1]

اسید کلریدریک

هیدرواکسید پتاسیم

سولفات منیزیم بدون آب

هیدروکسیل آمین هیدروکلراید

۴-(دی متیل آمینو) پیریدین

پیریدین

متانول

استیک انیدرید

میواینوسیتول[2]

دی کلرومتان

۴-۱-۲-۲ شرایط انجام آزمون

الف- محیط کشت تازه باکتری به صورت کشت خطی برای جدا سازی تک کلنی در پلیت NA آماده شود.

ب - یک ارلن ml ۱۰۰ ؛ که حاوی ml ۲۰ محیط کشت استریل MHB مورد نیاز برای سنجش هر یک از غلظت‌های نانو ذرات نقره هستند، استفاده شود.

پ - پیش کشت باکتریایی اولیه باید ۲ تا ۳ ساعت قبل از تلقیح سلول‌های باکتریایی به ارلن حاوی محیط کشت MHB، تهیه شود. بدین منظور باید لوله آزمون حاوی ml ۵ از MHB توسط یک تک کلنی باکتری تلقیح شده و در ۳۷°C برای رسیدن به کدورت حداکثر معادل لوله استاندارد ۱ مک فارلند گرماگذاری شود. برای آماده سازی ml ۲۰ از سوسپانسیون باکتریایی، باید ml ۰/۱ از محلول MHB پیش کشت در شرایط استریل به ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ml ۲۰ MHB اضافه شده، و در انکوباتور در دمای ۳۷°C برای رسیدن به مقدارجذب ۰/۵- ۰/۴۵ در OD_{600} (دارای حدود $۱-۲\times۱۰^{۹}$ CFU/mL سلول و یا اواسط فاز رشد لگاریتمی) گرماگذاری شود. این OD_{600} بر اساس آزمون‌های قبلی مورد استفاده برای رسم منحنی رشد و با توجه به اطلاعات به دست آمده از خواندن OD_{600} به موازات تعیین CFU یا شمارش سلول‌های محیط تعیین و توصیه می‌شود. سوسپانسیون‌های باکتریایی باید تحت شرایط استریل، بر اساس جدول ۱ آماده شوند.

ت- محیط کشت در فاز سکون (پس از فاز رشد لگاریتمی) مورد استفاده قرار نگیرد.

1- Muller Hinton Broth - MHB

2 *myo*-inosytol

ث- دمای پیشنهادی و دور همزن برای این مرحله عبارتند از: $37C^{\circ}$ و rpm ۱۸۰ تا ۲۰۰.

۴-۱-۲-۳ حلال / حامل

در مورد نانوذرات نقره پودری، حلال و یا حامل مورد استفاده نباید با مواد مورد استفاده و خود باکتری و محیط کشت واکنش بدهد. توصیه می‌شود از حلال آبی و حامل‌های محلول در آب استفاده شود (به پیوست ت مراجعه شود).

۴-۱-۲-۴ غلظت تیمار دهی

حداقل پنج شرایط مختلف تیمار دهی (با توجه به جدول ۱) از ماده آزمون باید استفاده شود.

۴-۱-۲-۵ روش کار

پیش‌کشت *استافیلوکوکوس ارئوس* ATCC 25923 باید در محیط MHB بر اساس بند ۴-۱-۲-۲ تهیه شود. قبل از زمان مواجهه نانو ذرات نقره، حدود ۲۰ ml از MHB توسط ۰/۱ ml از پیش کشت تلقیح شده و در ۳۷ °C ، در حال همزدن با سرعت ۲۰۰-۱۸۰ rpm گرماگذاری شود تا به OD_{600} در حدود ۰/۵-۰/۴۵ برسد.

۴-۱-۲-۶ شرایط تیمار دهی با مواد مورد آزمون

نانوذرات نقره بومی تهیه شده در آزمایشگاه (به پیوست پ مراجعه شود) نانو ذرات نقره نمونه مورد بررسی، در غلظت‌های متفاوت تهیه شوند. تیمارهای متفاوت باید با توجه به جدول شماره ۱ و بر اساس حجم سوسپانسیون کلوئیدی نانو ذرات نقره، محیط کشت و سوسپانسیون باکتریایی در حجم نهایی ۵ ml تهیه شوند. در مورد نانو ذرات پودری به پیوست ت مراجعه شود.

جدول ۱:- نسبت ترکیبات مورد نیاز برای هر آزمون

	۱ [۱و۳]	۲	۳	۴	۵
نانو ذرات نقره [۲] (ml)	۰	۰/۰۵	۰/۲۵	۰/۵۰	۱/۲۵
سوسپانسیون باکتری (ml)	۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰	۲/۵۰
$\frac{\text{محیط کشت}(g)}{\text{آب مقطر}(ml)}$	۰/۵۲۵ / ۲/۵۰	۰/۵۲۵ / ۲/۴۵	۰/۵۲۵ / ۲/۲۵	۰/۵۲۵ / ۲/۰۰	۰/۵۲۵ / ۱/۲۵

[۱] برای روش کار و شرایط نمونه‌های کنترل مثبت و منفی به پیوست "ث" مراجعه شود.

[۲] برای روش کار و شرایط کلوئیدی و سوسپانسیون نانو ذرات نقره پودری به پیوست "ت" مراجعه شود.

[۳] در نمونه آزمون شماره ۱، مقدار محیط کشت مورد نیاز که توسط تولید کننده پیشنهاد شده برای تولید محلول ۱ برابر است. در مورد بقیه تیمارها حجم محیط کشت طوری تنظیم شده است که در محلول نهایی (۵ ml) مقادیر یکسانی از محیط کشت موجود باشد. بر این اساس در تمام تیمارها باید ۰/۰۵۲۵ g از محیط کشت با مقادیر متفاوتی از آب مقطر ترکیب شود. این مقدار آب مقطر برای تیمارهای مختلف عبارتند از: ۲/۵۰ ml برای آزمون شماره ۱، ۲/۴۵ ml برای آزمون شماره ۲، ۲/۵۲ ml برای آزمون شماره ۳، ۲/۰۰ ml برای آزمون شماره ۴، ۱/۲۵ ml برای آزمون شماره ۵. جزئیات شرایط در جدول آمده است.

۴-۱-۲-۷ گرماگذاری[1]

ظروف حاوی نمونه‌ها که بر اساس جدول ۱ آماده شده‌اند باید به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C روی همزنی با سرعت ۱۸۰-۲۰۰ rpm گرماگذاری شوند. پس از این مدت نمونه‌ها باید در دمای ۴°C به مدت ۲۰ دقیقه ۴ و در ۸۵۰۰ rpm سانتریفوژ شوند. سپس باید مایع رویی با استفاده از فیلتر ۳ µm آبدوست (PTFE[2]) فیلتر شود. حجم مایع فیلتر شده باید با استفاده از روتاری تا ۰/۵ mL کاهش پیدا کرده و در نهایت در دمای ۵۰°C- و با استفاده از دستگاه فریز درایر خشک شود. پودر بدست آمده برای مراحل بعد در دمای ۲۰°C- نگهداری شود.

۲-۴

هیدرولیز دیواره سلولی

به منظور هیدرولیز و مشتق‌سازی، باید ۰/۳ mg از پودر بدست آمده از مرحله قبل با ۱۰ mL اسید کلریدریک ۶ مولار توسط گاز نیتروژن به مدت ۲۱ ساعت تحت دمای ۱۱۵°C رفلاکس شود. پس از خنک شدن، محلول باید با استفاده از صافی ۰/۴۵ µm صاف شده و در دمای ۴۰°C و در خلاء کاملاً خشک شود. سپس باید باقی مانده در ۲۰ mL آب حل شده و pH آن با استفاده از ۰/۴ مولار هیدرواکسید پتاسیم در محدوده ۶/۸-۶/۶ تنظیم شود. سپس نمونه در دمای ۴۰°C و تحت خلاء کاملاً خشک شود. باقی مانده در ۳ mL متانول خشک (آب گیری شده با سولفات منیزیم بدون آب) حل شده و برای حذف باقی مانده نمک به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده و محلول رویی توسط گاز نیتروژن یا هوای خشک کاملاً خشک گردد [به مرجع شماره ۱۱مراجعه شود].

۴-۳ مشتق‌سازی دیواره سلولی

برای تبدیل مورامیک اسید به شکل فرار از نمونه خشک شده، باید از روش مشتق‌سازی آلدونونیتریل استفاده شود [به مرجع ۹شماره مراجعه شود]. جهت مشتق‌سازی از معرف مشتق کننده حاوی ۳۲ mg/ml هیدروکسیل آمین هیدروکلراید، ۴۰ mg/ml محلول ۴-(دی متیل آمینو) پیریدین در محلول پیریدین:متانول در نسبت ۴ به ۱ استفاده می‌گردد. به ۱۵ ml از این واکنش‌گر ۰/۰۵ mg میو-اینوسیتول (به عنوان استاندارد داخلی) اضافه شود. برای تهیه نمونه‌های آزمون باید به ۳ mg از نمونه خشک شده مرحله قبل، ۰/۳ ml از محلول معرف حاوی استاندارد داخلی اضافه شده و درب آن کاملاً بسته و به مدت ۳۰ ثانیه شدیداً هم‌زده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰°C – ۷۵°C گرمادهی شوند. سپس نمونه باید در دمای اطاق خنک شده و به آن ۱ ml انیدرید استیک بدون آب افزوده شده و پس از بستن در آن هم‌زده شده و دوباره به مدت ۲۰ دقیقه گرمادهی شود. دوباره نمونه باید خنک شده و به آن ۲ ml دی کلرومتان افزوده شود. برای آماده سازی نمونه برای تزریق به دستگاه GC-MS نمونه ۳ بار و هر بار توسط ۱ ml اسید کلریدریک ۱ M و سپس ۱ ml آب شسته شده و باقی مانده آب توسط سولفات منیزیم بدون آب کاملاً حذف شود. فاز آلی (پایینی) در

[1] Incubation
[2] Polytetrafluoroethylene

دمای ۴۵°C و در اتمسفر نیتروژن خشک شده و در ۲۰۰ µl مخلوط دی کلرومتان حل شود [به مرجع شماره۱۱ مراجعه شود].

۴-۴ کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی

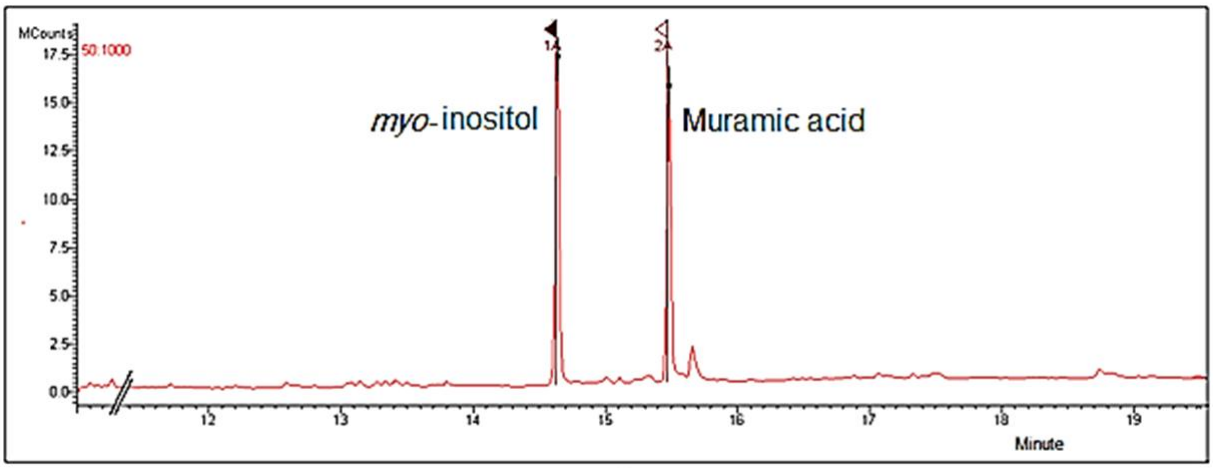
برای ارزیابی مشتقات مورامیک اسید باید از دستگاه کروماتوگراف گازی مجهز به ستون غیر قطبی VF-1ms (CP8924) به طول ۳۰ متر، قطر داخلی (id) ۰/۲۵ mm و ضخامت فیلم ۰/۲۵ µm در نسبت تزریق ۱:۳۰ تحت برنامه دمایی زیر استفاده شود:

الف – دمای اولیه به مدت ۱ دقیقه در ۹۰°C نگهداشته شده و سپس با سرعت ۱۰°C/min به دمای ۲۵۰°C رسانده شده و ۳ دقیقه در همین دما نگهداری شود.

ب – برای حذف پیک‌های حلال و پیک‌های آلودگی‌ها سیستم یونیزاسیون تا ۱۰ دقیقه خاموش نگه داشته شود و سپس برای آنالیز مقادیر بسیار کم در حالت SIM[1] به مدت ۱۰ دقیقه در محدوده m/z ۵۰-۱.۰۰۰ استفاده شود.

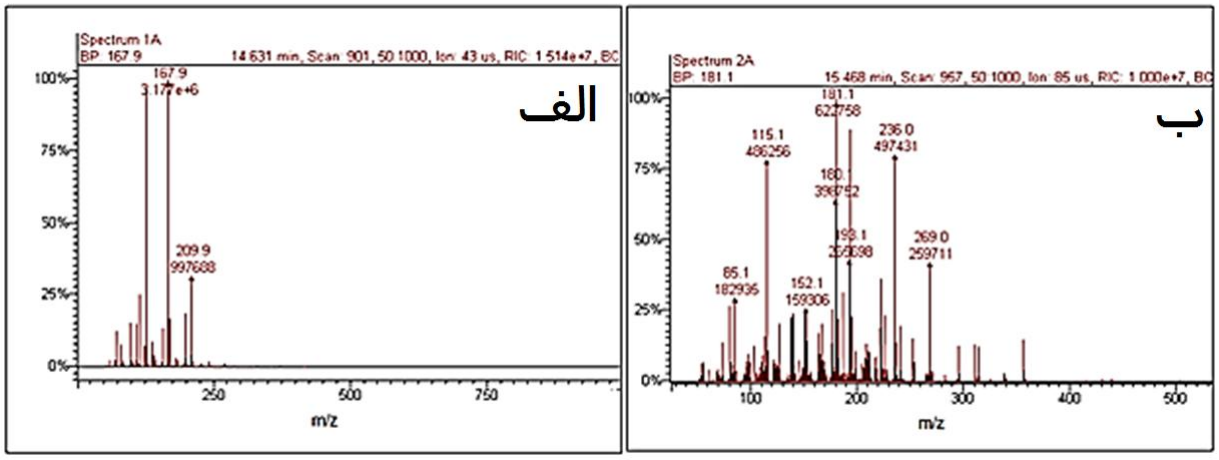
ج – دمای منبع یون ساز در تمامی مراحل روی ۲۰۰°C تنظیم شود.

برای بهبود کیفیت آنالیز کمی از میو-اینوسیتول به عنوان استاندارد داخلی استفاده شود. شکل ۲ و ۳ نتیجه آنالیز مورامیک اسید و میو-اینوسیتول را نمایش می‌دهد.



شکل ۲ – کروماتوگرام آنالیز GC-MS محلول استاندارد

1 -Selected ion monitoring



شکل ۳ – طیف‌های جرمی آنالیز GC-MS میو اینوسیتول (الف) و مورامیک اسید (ب).

۵ تجزیه و تحلیل نتایج و تفسیر

محلول شاهد مورامیک اسید (۱.۰۰۰ µg/ml) باید بر اساس روش شرح داده شده آماده شود. این محلول که حاوی استاندارد داخلی میو- اینوسیتول است باید تا رسیدن به غلظت نهایی در محدوده ۱-۱.۰۰۰ µg/ml رقیق گردد. سطح زیر پیک میو-اینوسیتول برای اصلاح کردن سطح زیر پیک مورامیک اسید و حذف خطاهای ناشی از تزریقات متفاوت استفاده می‌شود. هر یک از غلظت‌های آماده شده باید ۳ بار مورد ارزیابی قرار گیرند. برای اصلاح سطح زیر پیک مورامیک اسید از فرمول شماره ۱ استفاده شود.

فرمول شماره ۱

$$\text{پاسخ اصلاح‌شده} = \frac{\text{میانگین سطح زیر پیک مورامیک اسید}}{\text{میانگین سطح زیر پیک میو-اینوسیتول}}$$

نموداری بر اساس سطح زیر پیک اصلاح شده بر حسب غلظت متعارف آن رسم می‌شود. نتایج حاصله از یک نمونه در جدول شماره ۲ ارائه شده است. کمترین حد قابل تشخیص و کمترین حد قابل اندازه گیری کمی با این روش بر اساس ۳ و ۱۰ برابر سیگنال زیر پیک اصلاح شده نسبت به نویز محاسبه شده است. برای محاسبه LOD و LOQ، هر یک از غلظت‌ها باید ۳ بار مورد آنالیز قرار گیرند و سپس نتایج سیگنال به نویز بررسی شوند. انحراف استاندارد در سه تکرار انجام شده ۰/۰۱۲۸ ± بود.

جدول ۲: نتایج محاسبات کمی و اعتبار سنجی

LOD (µg/ml)	۱
LOQ (µg/ml)	۳/۳
LDR (µg/ml)	۳/۳ تا ۱.۰۰۰
ضریب همبستگی (r^2)	۰/۹۹۵۰

۶ روش آزمون نمونه نانو ذرات نقره

محلول نانو نقره مورد بررسی و نمونه نانو نقره بومی (برای آگاهی از شرایط نانو ذرات نقره بومی به پیوست پ، مراجعه شود) را می‌توان بر اساس جدول شماره ۱ و در غلظت‌های متفاوت تهیه شوند. مقدار فعالیت نانو ذره مورد بررسی بر اساس مقدار مورامیک اسید حاصل از دیواره سلولی تیمار دیده در مقایسه با میزان مورامیک اسید حاصل از دیواره سلولی تیمار دیده با نانو نقره بومی بدست می‌آید. سطوح قابل قبول از توانایی و فعالیت و یا سمیت بر اساس توافق بین طرفین تولید کننده و مصرف کننده تعیین خواهند شد. نمونه کنترل منفی باید حاوی حلال/ حامل نانو نقره نمونه مورد بررسی باشد.

در شرایطی که میزان تولید مورامیک اسید بسیار ناچیز باشد و یا نمونه‌ها بسیار پیچیده باشند، روش‌های طیف‌سنجی جرمی متوالی و SIM برای افزایش حساسیت روش قابل استفاده هستند.

پیوست الف

(اطلاعاتی)

کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتری جرمی

الف- ۱ کروماتوگرافی گازی

جداسازی مخلوط نمونه‌های گازی را از طریق عبور یک گاز حامل بی‌اثر (مانند هلیوم) از درون ستونی حاوی فاز ساکن دارای تمایلات شیمیایی متفاوت امکان‌پذیر می‌سازد. ستون درون گرمخانه‌ای با قابلیت کنترل دقیق و برنامه‌ریزی شده دما قرار می‌گیرد.

الف- ۲ طیف‌سنجی جرمی

روشی است که نسبت جرم مولکول‌ها و عناصر را به تعداد بارهای یون حاصل از آنها محاسبه می‌کند. این روش از طریق شتاب دادن به یون‌های تولید شده درون بخش آنالایزر یا تجزیه‌گر، شکستن این یون‌ها و آشکارسازی یون‌های تولیدی، شناسایی ترکیبات را ممکن می‌سازد.

الف-۳ آشکار سازی‌یون گزینش شده

یون انتخاب شده یکی از ویژگی‌های نمونه هدف است. در این روش تنها یک یا چندی از یون‌های تولیدی ترکیب مورد نظر مطالعه می‌شوند. این روش با افزایش حساسیت کلی پاسخ‌دهی اسپکترومتری جرمی همراه است و با کاهش زمان طیف گیری زمان مطالعه را کاهش می‌دهد. برای اجرای این روش می‌توان از اسپکترومتری جرمی متوالی[1] استفاده کرد.

الف-۴ طیف‌سنجی جرمی متوالی

این روش به MS/MS و یا MS^2 نیز معروف است و در آن چندین بار مراحل اسپکترومتری جرمی به صورت متوالی تکرار می‌شوند. به این منظور می‌توان از طیف‌سنج‌هایی که پشت سر هم و متوالی قرار گرفته‌اند استفاده کرد و یا از یک طیف‌سنج که بالقوه توان چندین بار طیف‌سنجی را دارد استفاده نمود. این روش برای بهبود حداقل غلظت قابل مشاهده و مطالعه و شناسایی ترکیبات در غلظت‌های بسیار ناچیز استفاده می‌شود.

1 - MS/MS

پیوست ب

(اطلاعاتی)

استاندارد داخلی

روش استاندارد داخلی به منظور بهبود و افزایش دقت مطالعات کمی استفاده می‌شود. این روش معمولا در مطالعاتی استفاده می‌شود که ماده مورد بررسی نمونه و یا نتیجه فعالیت دستگاه در میان تکرارهای مختلف با خطایی مواجه است که کنترل عامل ایجاد خطا و حذف آن بسیار سخت و یا نا ممکن است. بر این اساس روش استاندارد داخلی برای کالیبراسیون یا استاندارد سازی استفاده می‌شود. در این روش برای منحنی استاندارد بجای سیگنال ناشی از نمونه، سیگنال حاصل از نمونه تقسیم بر سیگنال حاصل از استاندارد داخلی استفاده می‌شود. بنابراین عوامل ایجاد خطا روی نمونه با عوامل ایجاد خطا روی ماده استاندارد داخلی یکدیگر را حذف و اثر خطای غیر قابل کنترل حذف می‌شود. ماده استاندارد داخلی ترکیبی است بسیار شبیه به ماده مورد مطالعه، که دقیقاً همان ماده نیست و به روشی یکسان و در کنار نمونه مورد مطالعه، تهیه و بررسی می‌شود.

پیوست پ

(اطلاعاتی)

تهیه نانوذرات بومی در آزمایشگاه

جهت سنتز نانو ذرات نقره از روش احیای شیمیایی، µl ۱۲۵۰ محلـول آبـی نمـک نیتـرات نقـره، (۰/۳ مولار) و ml ۵۰ محلول آبی ٪ ۰/۱ از پلی وینیل الکل به حجم ml ۵۰۰ رسانده و تحت هم زدن تا جوشـیدن حرارت داده می‌شود. سپس ml ۱۰ محلول ٪ ۱۰ تری سدیم سیترات به شکل قطره قطـره اضـافه و دمـادهی ادامه داده می‌شود. پس از ۲۰ دقیقه محلول زرد خاکستری رنگ و حاوی نانو ذرات بدست می‌آید. نمونه حاصل ۵ دقیقه در دمای محیط و ۱۰ دقیقه در حمام آب و یخ سرد شده و پیش از استفاده مجدد بـه دمـای محـیط برسد. الگوی اسپکتروفتومتری UV-Vis نمونه‌های تولیـدی پـیش از اسـتفاده بررسـی شـوند، (بـه مرجـع ۱۲ مراجعه شود). برای مطالعات شکل و ریخت‌شناسی از روش TEM استفاده می‌شود. اندازه نانو ذرات نقره تهیـه شده پیش از کاربرد با DLS مجهز به لیزر HeNe; ۶۲۳/۸ nm مورد مطالعه قرار می‌گیرد. اندازه ایـن ذرات بـر اساس میزان جذب نوری ذاتی (□) آنها در ۶۲۳/۸ nm و ضریب انکسارشان (RI) محاسبه می‌شـود. در ادامـه نانو ذرات با استفاده از ۴ مرحله سـانتریفوژ ۱۰.۰۰۰ rpm و شستشـو بـا آب بـین هـر مرحلـه، آمـاده مصـرف می‌شوند. برای مطالعات کریستالوگرافی (XRD) نمونه میکروکریستالی و پودری شکل به منظور کاهش اثـرات جهت گیری ترجیحی و بهبود آمارگیری ابعاد، نانو ذرات، بر روی صفحات آلومینیومی دورانی قـرار مـی‌گیـرد. نتایج انکسار در دستگاه پراش اشعه ایکس پودر مجهز به آشکارساز سینتیلیشن[1]، تک فام ساز ثانویه و تابشـگر Cu Ka1 با A° ۱/۵۴۰۶ =λ و در محدوده (□۲) ۸۰-۱ از نمونه قرار گرفتـه بـر روی نگهدارنـده آلومینیـومی جمع آوری شد. نتایج نشان دادند کـه انـدازه ذرات در محـدوده nm ۱۹-۱۶ هسـتند، (بـه مرجـع شـماره ۱۲ مراجعه شود). سایر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نمونه و استاندارد نانو ذرات نقره با استفاده از گزارشات فنی ISO قابل مطالعه هستند، [به مراجع ۱۹ و ۲۰ مراجعه شود]. بررسی‌هـای فیزیکـی DLS و UV-Vis بـر روی ماده نانو ذره نقره بومی باید قبل و بعد از استفاده از آن و در طول زمان آزمون (حداکثر طی ۱۸ ساعت) انجام گیرد. مقایسه آماری نتایج بدست آمده بر روی نمونه نانو ذره نقره بومی قبل و بعد از انجـام آزمـون حـاکی از این مطلب است که ذرات در طول انجام آزمون پایدار و فعال بوده اند یا خیر. مطالعه این خصوصیات در طـول هر آزمون تضمین می‌کند که این که نانوذرات نقره بومی در روزها و آزمایشگاه‌های مختلف پاسخ یکسانی ایجاد می‌کنند. نمونه نانو ذرات نقره بومی تهیه شده در آزمایشگاه پس از ۲۴ ساعت غیر قابل استفاده بوده و بایـد از بین برده شوند.

یادآوری ۱-: نانو ذره نقره آزمایشگاهی بومی تولید شده به این روش کلوئیدی و کروی است. این نمونه تا زمانی که نمونه مرجع دیگری معرفی نشده است برای مطالعات استفاده خواهد شد.

یادآوری ۲- اعتبار نانو ذره بومی معرفی شده در این استاندارد تا زمانی خواهد بود کـه مرجـع جدیـدی توسـط مراجـع داخلی و یا ISO ارائه شود.

یادآوری ۳- نمونه نانو ذره مورد مطالعه در هر آزمون، نمونه/نمونه‌هایی هستند که مورد مقایسه و ارزیابی قرار می‌گیرند.

1- Scintillation

پیوست ت

(اطلاعاتی)

آماده سازی سوسپانسیون نانوذرات نقره

نانوذرات نقره به شکل پودر باید در محیط کشت تهیه شده با آب دو بار تقطیر، مطابق جدول ۳ سوسپانسیون شوند. برای تهیه سوسپانسیون همگن از نانو ذرات پودری درون محلول محیط کشت و اطمینان از همگن بودن آن از حمام التراسونیک با توان W ۳۵۰ استفاده شود. سپس ml ۲۵ از سوسپانسیون باکتریایی به سوسپانسیون نانو ذره نقره تهیه شده اضافه شود.

در کلیه مراحل، سوسپانسیون نانو ذرات نقره باید طی ۲۴ ساعت مصرف شده و پس از آن برای استفاده مناسب نیستند.

جدول ۳- شرایط تیمار (هرکدام در ۳ بار تکرار انجام شوند)

شماره نمونه	۱	۲	۳	۴	۵
نانو ذرات نقره $(mg)^{۲}$	۰	۰/۰۰۵	۰/۰۲۵	۰/۰۵۰	۱/۱۲۵
آب مقطر (ml)	۱/۰	۱/۰	۱/۰	۱/۰	۱/۰
محیط کشت $(1X - ml)$	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
یادآوری- انحلال در میزان سمیت نانو ذرات نقره نقش مهمی دارد. در مورد برخی فرمولاسیون‌های خاص مانند انواعی که با سیترات حفاظت می‌شوند، نیمه عمر پایداری و میزان انحلال وابسته به زمان، متغیر باشد.					

پیوست ث

(اطلاعاتی)

شرایط نمونه‌های شاهد، کنترل مثبت و کنترل منفی

در آنالیزهای روزمره آزمایشگاهی نیاز به تکرار نمونه‌های کنترل‌های مثبت و منفی نیست. در صورت نیاز از روش‌های زیر برای انجام کنترل‌های مثبت و منفی استفاده شود:

ث-۱ شاهد

این کنترل بر اساس نوع ماده محیطی یا حامل نانو ذرات مورد مطالعه، تهیه و بررسی می‌شود. در مورد نانو ذرات بومی پیشنهاد شده در این استاندارد، این نمونه محلول آبی حاوی % ۰/۱ از پلی وینیل الکل، % ۱۰ از تری سدیم سیترات و M ۰/۰۰۱ از نیترات سدیم است. شرایط انجام آزمون مطابق جدول ۱ بوده و آزمون طی ۱۸ ساعت در حال همزدن نمونه انجام می‌شود.

ث-۲ سفکسیم (کنترل مثبت)

مقدار ml ۳ از سوسپانسیون باکتریایی و ml ۲ از محیط کشت حاوی µg/ml ۱۶ سفکسیم.

ث-۳ کنترل منفی - مقدارml ۳ از سوسپانسیون باکتریایی و ml ۲ از محیط کشت.

ث-۴ کنترل مناسب بودن سوسپانسیون باکتریایی

در این آزمون از یون نقره کاملا محلول تهیه شده در محیط کشت آبی از نمک نیترات نقره و در غلظت‌های µM ۳ ،۰/۱، ۰/۰۳، ۰/۰۱ ، ۰/۰۰۳ استفاده می‌شود. هر بار باید سوسپانسیون جدید باکتریایی استفاده شود، تا اطمینان حاصل شود که پاسخ آزاد سازی مورامیک اسید، وابسته به غلظت‌های یون‌های نقره است و نه تفاوت میان محیط‌های باکتریایی. این کنترل به این منظور طراحی و استفاده می‌شود که تغییرات شدید در حین کشت و حساسیت به یون‌های نقره احتمالی آزاد شده در طول آزمون مورد مطالعه قرار گیرند. غلظتی از نقره که در آن به طور نسبی ٪ ۵۰ مورامیک اسید آزاد می‌شود ثبت شده و به عنوان ویژگی کشندگی (EC50[1]) نقره در نظر گرفته می‌شود. مقدار EC50 برای نقره و در شرایط این آزمون حدود µM ۰/۹ است.

1- Effective concentration

پیوست ج
منابع و کتابشناسی

[1] Chen, X., Schluesener, H.J. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicol. lett*. **176**, 2008, pp. 1-12

[2] Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., Dash, D. Characterization of enhanced antimicrobial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, **18**, 2007 225103 (9 pp)

[3] Asharani, P.V., Wu, Y.L., Gong, Z. Valiyaveettil S, Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology,* **19**, 2008 255102 (8 pp)

[4] ISO 20752, *Cork stoppers -- Determination of releasable 2, 4, 6-trichloroanisol (TCA)*

[5] ISO 8196-1, *Milk -- Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis -- Part 1: Analytical attributes of alternative methods*

[6] ISO/TS 15216-1, *Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification*

[7] ISO 3534-1, *Statistics -- Vocabulary and symbols -- Part 1: General statistical terms and terms used in probability*

[8] Vollmer, W., Blanot, D., de Pedro, M.A. Peptidoglycan structure and architecture. FEMS. *Microbiol. Rev*. **32**, 2008, pp**.** 149-167

[9] ISO/TS 10797, Nanotechnologies — Characterization of single-wall carbon nanotubes using transmission electron microscopy.

[10] ISO/TS 80004-6, Nanotechnologies — Vocabulary — Part 6: Nano-object characterization.

[11] Zhang, X. Amelung, W. Gas chromatography determination of muramic acid, glucosamine, mannosamine and galactosamine in soils, *Soil. Boil. Biochem*. **28**, 1996, pp. 1201-1206

[12] Mirzajani, F., Ghassempour, A., Aliahmad, A., Esmaeili, M.A. *Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. Res. in Microbial*.**162**, 2011, pp. 542-549

[13] Li, W.R.,Xie, X.B., Shi, Q.S., Zeng, H.Y., OU-Yang, Y.S., Chen, Y.B. Antibacterial activity and mechanism of *silver nanoparticles* on *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 2010, pp. 1115-1122

[14] Li, W.R., Xie, X.B., Shi, Q.S., Duan, S.S., Ouyang, Y.S., Chen, Y.B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biomedical and Life Science,* **24**(1), 2011, pp. 135-141

[15] Jung, W.K., Koo, H.C., Kim, K.W., Shin, S., Kim, S.H., Park, Y.H. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol*. **74**(7), 2008, pp**.** 2171-8.

[16] Sondi, I., Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticle as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria*. Journal of Colloid and Interface Science*. **275**, 2004 pp. 177-182.

[17] Kozar, M.P., Krahmer, M.T., Fox, A., Lennart, L., Allton, J. Lunar dust: a negative control for bio marker analyses of extraterrestrial samples? Geochim. Cosmochim. Acta. 65(19), 2001, pp 3307-3317

[18] Reliability of muramic acid as a bacterial bio marker is influenced by methodological artifacts from streptomycin. Microb. Ecol. 2009, 57 (3) pp. 494–500. Available at: Liang, C and Read, H.W and Balser, T.C.

[19] ISO/TS 12805, Nanotechnologies — materials specifications — Guidance on specifying nano-objects.

[20] ISO/TR 13014, Nanotechnologies — Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale aterials for toxicologic assessment.