مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان ۱۳۸۹، دوره دوم، شماره هفتم، صفحه ۴۴-۳۷

بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره و مس و مقایسه با هیپوکلریت سدیم بر روی سلول رویشی و اسپور *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس سرئوس*

رویا خسروی اقبال[1]، عباس اخوان سپهی[1]، آنیتا خنافری[1]

۱- دپارتمان میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

نویسنده مسؤول: دکتر عباس اخوان سپهی. دپارتمان میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.
Akhavansepahy@gmail.com

دریافت: ۸۹/۱۰/۱۰ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: خواص ضدمیکروبی نانوذرات نقره و مس بر روی ***B.cereus*** **PTCC(1247),*B.subtilis*** **PTCC(6633)** بررسی شدند. متوسط اندازه نانوذرات نقره و مس بین **۱۰-٤۰nm** و عموماً به شکل حلقوی بودند. هیپوکلریت سدیم که در این مطالعه بررسی شد دارای خواص ضدمیکروبی بدلیل وجود کلر فعال است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر باکتریسیدالی نانوذرات بود که بدلیل اندازه کوچک و سطح اثر بالایشان امروزه مورد توجه بسیار قرار گرفته اند. نانوذرات با تولید رادیکال آزاد $O2^-$ و **OH** سبب اکسیداسیون و تخریب غشا میکروارگانیسم ها می شوند، در حالیکه کلر موجود در هیپوکلریت سدیم پس از ترکیب با آب اسید هیپوکلروس (**HOCL**) را تولید می کند که سبب اکسیداسیون پروتئین های غشا سلولی می شود. از اهداف مهم دیگر مورد بررسی، معرفی ماده ضدمیکروبی موثر می باشد.

روش بررسی: اثر باکتریسیدالی نانوذرات و هیپوکلریت سدیم بر پایه آزمون دیسک گذاری و چاهک گذاری و بررسی منطقه حساس و نیز کمترین غلظت بازدارندگی (**MIC**) و کمترین غلظت کشندگی (**MBC**) بر روی سلول های رویشی انجام گرفته است. اثر ضدمیکروبی نانوذرات و هیپوکلریت سدیم توسط شمارش کلنی ها در ساعات و رقت های مختلف به روش پورپلیت و کشت دولایه بررسی شدند.

یافته ها: در این مطالعه دیده شد که ***B.subtilis*** بیشترین حساسیت را به هر دو نانوذره در مقایسه با ***B.cereus*** دارد. بطوریکه (**MIC**) آن در نانوذره نقره برابر با **۷ppm** و در نانوذره مس برابر **۵۰ppm** و در هیپوکلریت سدیم برابر **۷۰۰ ppm** بدست آمد. اسپورهای ***B.subtilis*** در رقت های کمتر از مواد ضدمیکروبی و در زمان صفر از بین رفتند.

نتیجه‌گیری: مشاهده شد که اسپور و سلول رویشی ***B.subtilis*** حساسیت بیشتری نسبت به نانوذرات نقره داشتند. نتایج حاصل بیانگر موثر بودن نانوذرات نقره نسبت به سایر مواد ضدمیکروبی مورد بحث می باشد.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس سرئوس*، نانوذرات، هیپوکلریت سدیم، اثر ضدمیکروبی.

www.SID.ir

مقدمه

استفاده از مواد شیمیایی با خواص ضدمیکروبی به سال ها پیش باز می گردد، از طرفی با گسترش دانش بشر در زمینه های مختلف و ظهور نانوتکنولوژی پیشرفت های چشمگیری در این امر صورت گرفته است. تحقیقات مختلف استفاده از یون های فلزی را بعنوان عوامل ضدعفونی کنندگی برتر در تصفیه فاضلاب و عوامل بیمارستانی که دربرگیرنده میکروارگانیسم های بیماری زا هستند را توصیه می کنند(۱).

نانوذرات از زمان‌های بسیار دور مورد استفاده قرار می‌گرفتند. شاید اولین استفاده آنها در لعاب‌های چینی سلسله‌های ابتدایی چین بوده است. در یک جام رومی موسوم به جام لیکرگوس از نانوذرات طلا و نقره استفاد شده است تا رنگ‌های متفاوتی از جام برحسب نحوهٔ تابش نور پدید آید. همچنین بطور گسترده ای بعنوان یک عامل باکتریسیدال در لوازم جراحی و دندانپزشکی و سوختگی ها مورد استفاده قرار می گرفتند(۲).

تحقیقات مختلفی تأثیر فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره را تأیید کردند که باکتری های پاتوژن نظیر *باسیلوس سوبتیلیس* و *اشریشیا کلی* را می کشد. این ذرات سبب پاسخ ایمنی و مقاومت ضدمیکروبی نمی شوند و این از مزیت های فناوری نانو می باشد. مطالعات اخیر نشان داده اند که نانوذرات نقره به پروتئین های ویروس HIV حمله می کند و مانع از اتصال ویروس به سلول می شوند(۳). از طرفی استفاده از نانوذرات نقره نسبت به تکنیک های سنتی ضدعفونی کردن آب نظیر کلرزنی و اوزون زنی دارای مزیت های فراوانی است .

ردیابی اسپور باسیلوس ها در حل مسائل محیطی، صنعتی و کلینیکی در صنایع غذایی و کشاورزی بسیار حائز اهمیت هستند. حضور اسپور این باکتری ها در همه جا تهدید بالقوه ای در گستره وسیعی از مواد غذایی نظیر محصولات لبنی، گوشت، غلات، سبزیجات، چاشنی ها و غذاهای کنسرو شده آماده، می باشند. علاوه بر آن اسپور باسیلوس ها می توانند در فرآیندهای سیستم تخلیه فاضلاب و تجهیزات پردازشی غذا زنده باقی بمانند(۴). با توجه به ساختمان ویژه اسپور باسیلوس سوبتلیس و سرئوس و همچنین مقاومت آن به بسیاری از عوامل، حذف آنها در صنایع مختلفی از جمله صنایع غذایی، لبنی و کشاورزی حائز اهمیت است. هدف از این مطالعه بررسی نانوذره و هیپوکلریت سدیم بر روی اسپور *B.cereus, B.subtilis* می باشد.

روش بررسی

سوش های باکتریایی و محیط های کشت: اثر باکتریسیدالی بر روی باسیلوس ها در محیط کشت مولر هینتون آگار انجام گرفته است. *B.cereus* PTCC(1247),*B.subtilis* PTCC(6633) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری گردیدند. نوع محیط کشت مورد استفاده در این روش، در اندازه هاله عدم رشد و میزان نفوذ و انتشار مواد ضدمیکروبی نقش به سزایی دارد. محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی عصاره گوشت، آنزیم کازئین هیدرولاز و نشاسته می باشد که به عنوان محیط انتخابی به کار برده می شود، زیرا که میزان عوامل مهارکننده سولفونامیدها و تری متوپریم و تتراسایکلین در آن بسیار کم است و همچنین مقدار کاتیون های Ca^{2+} و Mg^{2+} موجود در محیط تنظیم شده می باشد.

تهیه سوسپانسیون اسپوری: باکتری را در محیط نوترینت براث کشت داده و در $37^{\circ}C$ به مدت هفت روز گرماگذاری گردید، پس از جمع آوری اسپورها توسط آب مقطر استریل آنها را در دور g ۵۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نموده، سپس سوپرناتانت را دور ریخته و رسوب بدست آمده را چند بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد، سوسپانسیون فوق را بمدت ۲۰ دقیقه در $85^{\circ}C$ قرار داده، آنگاه سوسپانسیون حاصل را سه بار دیگر شستشو داده و آن را در اتانول ۵۰٪ معلق گردید و در $4^{\circ}C$ نگهداری شد. سوسپانسیون بدست آمده در صورت عدم آلودگی برای مدت زمان یک تا دو ماه قابل استفاده است. تعداد اسپورهای جمع آوری شده با این روش برابر 10^{9} - 10^{7} spores/ml بوده است(۵).

آزمون دیسک گذاری Disk Diffusion: حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک ها بطور رایج توسط آزمون دیسک گذاری انجام می گیرد که در آن دیسک ها از آنتی بیوتیک اشباع شده اند. یک تست مشابه با دیسک های آغشته به نانوذرات در این مطالعه استفاده گردیده است. قطر دیسک ها ۶ میلی متر بودند. سوآپ استریل را درون سوسپانسیون میکروبی تهیه شده معادل نیم مک فارلند فرو برده و اضافه محلول را با فشار دادن سوآپ به کناره لوله گرفته سپس در پلیت ۱۰ حاوی محیط مولر هینتون آگار سه بار در زاویه ۶۰ درجه کشت متراکم داده شد. پس از مدت کوتاهی از تلقیح باکتری ها، توسط پنس استریل دیسک های آغشته به مواد ضدمیکروبی را بر روی محیط کشت قرار داده و برای جلوگیری از انتشار باکتری قبل

www.SID.ir
Archive of SID

از انتشار دیسک پلیت ها را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C- ۲ قرار داده (preincubation) و سپس آنها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷°C انکوبه گردید.

روش استفاده از چاهک Well Diffusion Test : از مشکلات روش دیسک دیفیوژن محدودیت جذب مواد توسط دیسک است زیرا حداکثر میزان جذب دیسک ها حدود ۴۰ میکرولیتر می باشد بدین منظور برای بهبود انتشار یون های فلزی و مواد شیمیایی کلردار از روش چاهک گذاری نیز استفاده گردید. قطر استاندارد محیط کشت برای چاهک گذاری ۴mm بودند که در این صورت هر چاهک قابلیت تلقیح ۷۵ میکرولیتر محلول را داشت. در این روش با استفاده از انتهای پیپت پاستور استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار چاهک هایی ایجاد کرده سپس از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده کشت متراکم داده شد و درون چاهک ها را با ماده ضدمیکروبی مورد نظر پر کرده، در پایان پلیت ها را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷° C انکوبه گردید.

روش تعیین MBC و MIC: MIC برابر است با کمترین غلظت از مواد، که سبب مهار رشد میکروارگانیسم می شوند. برای این آزمایش از ۱۳ لوله استریل که هر یک حاوی یک میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون براث بود استفاده گردید، سپس یک میلی لیتر از نانوذرات با غلظت اولیه مورد نظر را به لوله یک اضافه نموده و پس از مخلوط کردن نانوذره با محیط کشت یک میلی لیتر از محلول را برداشته و به لوله دوم اضافه گردید و به همین ترتیب تا لوله یازدهم نانوذره ها رقیق شد. ازلوله یازدهم یک میلی لیتر برداشته و بیرون ریخته شد. آنگاه از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده معادل نیم مک فارلند به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به هر لوله اضافه گردید. لوله شماره دوازده حاوی محیط کشت و نانوذره است که بعنوان شاهد منفی و لوله شماره سیزده حاوی محیط کشت و سوسپانسیون باکتری بود که بعنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. سپس لوله ها را در ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری کرده و برای تعیین MIC میزان کدورت لوله ها را که بیانگر مقدار رشد باکتری است خوانده شد، که برابر است با حداقل غلظت از ماده ضدمیکروبی که در آن رشد قابل رویتی مشاهده نشد.

MBC حداقل غلظت کشندگی از مواد ضدمیکروبی مورد بررسی است. برای این منظور لوله های MIC که شفاف به نظر رسیدند یعنی نشانه ای از کدورت یا رشد باکتری در آنها دیده نشد را برای بررسی MBC مورد استفاده قرارداده شد. بدین ترتیب که مقداری کمی از این لوله ها را توسط سمپلر به محیط مولر هینتون آگار منتقل کرده و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری رشد یا عدم رشد باکتری بر روی پلیت ها را بررسی شد، اولین رقتی که باکتری نتوانست در مجاورت آن بر روی محیط رشد نماید را بعنوان حداقل غلظت کشندگی از مواد ضدمیکروبی در نظر گرفته شد.

بررسی اثر نانوذرات و مواد شیمیایی کلره بر روی سلول رویشی باسیلوس ها: از روش پورپلیت برای شمارش کلنی باکتری ها استفاده شد. بدین صورت که ابتدا سوسپانسیون میکروبی برابر نیم مک فارلند و رقت های مورد نظر از مواد ضدمیکروبی تهیه گردید. سپس یک میلی لیتر از مخلوط سوسپانسیون باکتری و ماده ضدمیکروبی را در پلیت استریل ریخته و به میزان کافی از محیط کشتی که حرارت آن بیشتر از ۴۵°C نیست اضافه گردید. پس از سفت شدن محیط، پلیت ها را در دمای ۳۷°C گرماگذاری نموده و شمارش کلنی باکتری ها پس از ۲۴ ساعت انجام داده شد (۶).

بررسی اثر نانوذرات و مواد شیمیایی کلره بر روی اسپور باسیلوس ها: بدین منظور از دو روش مختلف استفاده گردید. پس از تهیه سوسپانسیون اسپوری و غلظت های مختلف از مواد ضدمیکروبی به میزان مساوی از هریک را درون یک لوله استریل ریخته و در زمان های صفر، یک ساعت بعد، دو ساعت بعد و از آنها کشت داده شد، بدین صورت که ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوق را بر روی محیط مولر هینتون آگار ریخته و با پیپت پاستور استریل در جهات مختلف متراکم ساخته و پس از ۲۴ ساعت توانایی رشد یا عدم رشد در هر یک را مورد بررسی قرار گرفت. پس از تهیه سوسپانسیون اسپوری و غلظت های مختلف از مواد ضدمیکروبی در زمان های مختلف به روش پورپلیت مورد شمارش قرار گرفت. اسپورهایی که پس از اتمام زمان تماس در مجاورت ماده ضدمیکروبی زنده باقی ماندند در محیط غنی با مواد غذایی تازه تندش یافته و به سلول رویشی تبدیل شدند.

تهیه گراف های میکروسکوپ الکترونی (SEM): نمونه نانوذرات و باکتری پس از مخلوط شدن با یکدیگر سانتریفیوژ شده و رسوب بدست آمده جمع آوری شد. از آنجایی که نمونه های مورد بررسی با میکروسکوپ الکترونی SEM باید بصورت

Archive of SID
www.SID.ir

خشک تهیه شوند، رسوب حاصل در دمای ۴۰°C خشک گردید و به شکل پودر درآمد. سپس نمونه های مذکور به بخش میکروسکوپ الکترونی دانشگاه تربیت مدرس ارسال شدند. سطح نمونه‌هایی که با میکروسکوپ SEM بررسی می شوند باید دارای هدایت الکتریکی باشند تا ایجاد شارژ ساکن نکنند، زیرا در این صورت الکترون های بعدی با شارژ ساکن و بارهای همنام برخورد کرده، دفع یا منحرف می شوند، در نتیجه تصویر حاصل ناپایدار می گردد. آنگاه نمونه ها بر روی پایه های میکروسکوپ فیکس شدند و توسط دستگاه Coater لایه ای از طلا روی آنها را پوشاند تا هدایت الکترونی پیدا کنند و الکترون ها سطحی دفع شوند، درنتیجه وضوح تصاویر نیز بهبود یابد. لایه نشانده شده آنقدر نازک است که تأثیری روی میکرو ساختارها ندارد.

یافته‌ها

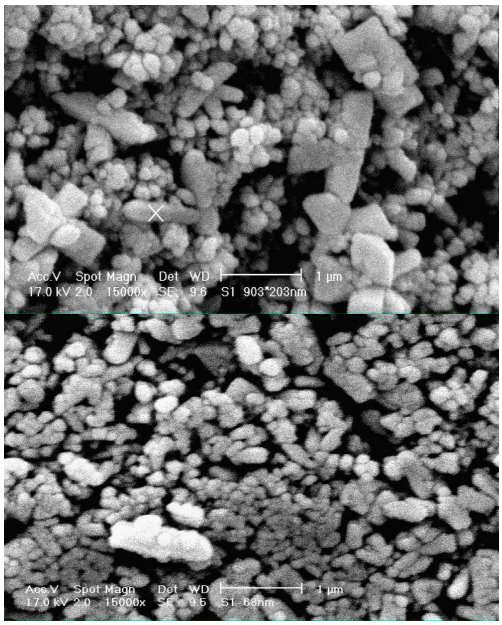
نتایج آزمون های بیوشیمیایی جهت شناسایی سویه های باسیلوس در جدول ۱ بیان شده است. در *B.cereus* تست های بررسی حرکت و تولید همولیز و در *B.subtilis* تست های VP مثبت، احیای نیترات و مثبت شدن سیترات از جمله آزمون های اصلی در بررسی سویه دو باکتری مورد بحث هستند(۷).

جدول ۱. نتایج آزمونهای بیوشیمیایی *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتلیس*

آزمایش	کازئیناز	لستیناز	ژلاتیناز	آمیلاز	احیای نیترات	سیمون سیترات	تولید اندول	حرکت	MR	VP
B.cereus	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
B.subtilis	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+

تصویر میکروسکوپ الکترونی به منظور بررسی شکل نانوذرات و خواص ضدمیکروبی آنها بر روی باکتری ها تهیه گردید. ذرات ریز موجود در شکل نانوذرات مس هستند که از طریق احاطه کردن باکتری و برهم کنش شیمیایی با پروتئین های تیول دار موجود در دیواره سلولی به باکتری متصل شده و کارهای سلولی نظیر تنفس و انتقال مواد را مختل می کنند و در نتیجه سبب مرگ سلول باکتری می شوند.

شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM از نانوذرات مس



نتایج سنجش یون های نقره و مس به روش دیسک دیفیوژن و چاهک بر روی سلول رویشی باسیلوس هادر جدول ۲ نشان داده شده است. منظور از D قطر هاله عدم رشد در روش دیسک دیفیوژن است و منظور از W قطر هاله عدم رشد در روش چاهک گذاری است. منظور قطر هاله عدم رشد همرا با باکتری های مقاوم است.

جدول ۲. نتایج سنجش یونهای نقره و مس

غلظت یون های نقره µg/ml	قطر هاله عدم رشد (mm) *B.cereus*	قطر هاله عدم رشد (mm) *B.subtilis*
۱۰۰۰	D = 38 W = 36	D = 44 W = 43
۸۰۰	D = 35 W = 34	D = 42 W = 40
۶۰۰	D = 33 W = 31	D = 38 W = 37
۴۰۰	D = 30 W = 25	D = 36 W = 35
۲۰۰	D = 24 W = 20	D = 32 W = 30
۵۰	D = 15 W = –	D = 26 W = 22
۱۰	D = – W = –	D = 14 W = 10

Archive of SID
www.SID.ir

قطر هاله عدم رشد (mm) *B.subtilis*	قطر هاله عدم رشد (mm) *B.cereus*	غلظت یون های مس µg/ml
D = 40 W = 34	D = 33 W = 31	۱۰۰۰
D = 37 W = 30	D = 30 W = 26	۸۰۰
D = 35 W = 28	D = 28 W = 24	۶۰۰
D = 33 W = 25	D = 24 W = 21	۴۰۰
D = 30 W = 21	D = 20 W = 15	۲۰۰
D = 23 W = 16	D = 12 W = 7	۵۰
D = 13 W = 8*	D = 8 W = –	۱۰

نتایج سنجش هیپوکلریت سدیم به روش دیسک دیفیوژن و چاهک بر روی سلول رویشی باسیلوس ها: قطر هاله های عدم رشد بیانگر میزان حساسیت باکتری ها به مواد ضدمیکروبی مورد استفاده است. نتایج بدست آمده در این بررسی حاکی از حساسیت بیشتر *باسیلوس سوبتیلیس* نسبت به *باسیلوس سرئوس* بوده، زیرا که این باکتری حتی در رقت های بسیار کم از نانوذرات نقره و مس(۱۰µg/ml) هاله داده است. کمترین رقت از هیپوکلریت سدیم که بر روی سلول رویشی باسیلوس ها موثر بوده است غلظت ۵۰۰ µg/ml بوده که در مقایسه با کمترین غلظت از نانوذرات عدد قابل ملاحظه ای است.

جدول۳. نتایج سنجش غلظت هیپوکلریت سدیم

قطر هاله عدم رشد (mm) B.subtilis	قطر هاله عدم رشد (mm) B.cereus	غلظت هیپوکلریت سدیم µg/ml
D = 38 W = 33	D = 31 W = 25	۵۰۰۰
D = 32 W = 24	D = 28 W = 19	۳۰۰۰
D = 22 W = 12	D = 19 W = 11	۱۰۰۰
D = 11 W = 7	D = 10 W = 6	۵۰۰
D = – W = –	D = – W = –	۱۰۰
D = – W = –	D = – W = –	۵۰

هریک از آزمایشات فوق برای تأیید و اطمینان از عدم بروز خطای انسانی ۳ بار تکرار شدند و در پایان نتایج بدست آمده توسط نرم افزار آماری spss تجزیه و تحلیل شدند و میانگین نتایج بر روی نمودار قرار گرفتند.

MIC وMBC نانوذرات و مواد شیمیایی کلره: کمترین MIC به نانوذرات نقره منسوب شده است که در این رابطه باسیلوس سوبتیلیس با MIC برابر ۵ میکروگرم در میلی لیتر حساس تر از باسیلوس سرئوس بوده است. پس از نانوذرات نقره نانوذرات مس و در انتها هیپوکلریت سدیم قرار دارد. این یافته ها بیانگر آن هستند که نانوذرات بویژه نانوذرات نقره اثر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به هیپوکلریت سدیم داشتند.

جدول ۴. نتایج MICو MBC نانوذرات و مواد شیمیایی کلره

مواد ضدمیکروبی	*B.cereus*	*B.subtilis*
	MIC,MBC	MIC,MBC
نانونقره	7,10	5,5
نانومس	100,160	50,100
هیپوکلریت سدیم	1000,1250	700,1000

نتایج سنجش نانوذرات نقره و هیپوکلریت سدیم به روش شمارش کلنی بر روی اسپور باسیلوس ها در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول۵. نتایج سنجش هیپوکلریت سدیم و نقره

غلظت هیپوکلریت سدیم µg/ ml		*B.cereus*	*B.subtilis*
۲۵۰۰	۱۰دقیقه	عدم رشد	عدم رشد
۲۵۰۰	۶۰ دقیقه	عدم رشد	عدم رشد
۲۰۰۰	۱۰دقیقه	رشد	رشد
۲۰۰۰	۶۰ دقیقه	رشد کم	عدم رشد
غلظت یون نقره	***B.cereus***	***B.subtilis***	
۳۵۰	رشد	عدم رشد در زمان صفر	
۴۰۰	عدم رشد در زمان صفر	عدم رشد	

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

امروزه تولید نانوذرات و استفاده از آنها مورد توجه و بررسی بسیار قرار گرفته و مطالعات متعددی در این زمینه صورت گرفته است. این ذرات با داشتن خواص منحصر به فردشان عامل مناسبی در ضدعفونی وسایل و تجهیزات پزشکی، زخم ها و سایر موارد هستند.

مطالعه انجام شده، جز اولین مطالعات بر روی اسپور *B.cereus, B.subtilis* بوده که در آن اثر دو نانوذره و هیپوکلریت سدیم مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به ساختمان ویژه اسپور و مقاومت آن به بسیاری از عوامل، حذف آنها در صنایع مختلفی از جمله صنایع غذایی، لبنی و کشاورزی حائز اهمیت است. اسپور این باکتری ها سبب فساد مواد غذایی و در نتیجه مسمومیت غذایی می شوند، زیرا که اسپور باسیلوس ها در بسیاری از مکان ها و حتی در هوا نیز گسترده اند.

یکی از نتایج مطالعه اخیر وجود حساسیت فوق العاده *باسیلوس سوبتیلیس* در مقایسه با *باسیلوس سرئوس* بوده است از طرفی دیده شد که این باکتری به نانوذرات نقره و مس و نیز هیپوکلریت سدیم بسیار حساس است و در رقت های برابر، قطر هاله عدم رشد بسیار قابل ملاحظه ای را ایجاد کرد، چنانکه Yoon و همکاران در سال۲۰۰۷ و Ruparelia و همکاران در سال ۲۰۰۸ اظهار داشتند که *باسیلوس سوبتیلیس* به هر دو نانوذرات نقره و مس نسبت به *اشرشیا کلی* بیشتر حساس بوده، شاید دلیل این اختلاف به وجود لیپوپلی ساراید باکتری های گرم منفی، یعنی تفاوت در ساختار دیواره سلولی مربوط باشد (۱و۸). در بررسی خاصیت اسپوروسیدالی از نانوذرات مشاهده شد که نانوذرات مس بر روی اسپور باسیلوس های مورد بحث اثری نداشته در حالیکه نانوذرات نقره در همان زمان اول از تماس در غلظت ۳۵۰ میکروگرم در میلی لیتر توانستند اسپور *باسیلوس سوبتیلیس* و در غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اسپور *باسیلوس سرئوس* را حذف کنند. هیپوکلریت سدیم نیز در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، شصت دقیقه پس از تماس توانست اسپور *باسیلوس سوبتیلیس* را حذف کند. اسپور *باسیلوس سرئوس* در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پس از شصت دقیقه از زمان تماس به میزان کمی در محیط رشد کرد و بطور کامل مهار نشد تا اینکه در رقت ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر ده دقیقه پس از تماس بطور کامل از بین رفت. در این مطالعه اثر اسپوروسیدالی هیپوکلریت سدیم بر روی *B.cereus, B.subtilis* به ترتیب برابر با ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوده است، این نتایج با یافته های Hani و همکاران در سال ۲۰۰۹ که تأثیر ضدمیکروبی عوامل شیمیایی رایج در ضدعفونی بیمارستان های شمال جردن را بررسی کردند، مطابقت داشت. Hani نتایج MIC حاصل از ترکیبات کلردار شامل کلرهگزیدین، هیپوکلریت سدیم و سدیم دی کلروایزوسیانورات را بین ۴۵۰۰-۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر گزارش کرد، که بالاترین MIC به *اشرشیا کلی* و سپس *باسیلوس استئاروترموفیلوس* نسبت داده شده است و میزان اثر اسپوروسیدالی ترکیبات مذکور بین ۴۵۰۰-۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عنوان کردند (۹). در این بررسی مشاهده گردید که اسپور *باسیلوس سرئوس* مقاوم تر از اسپور *باسیلوس سوبتیلیس* است. Hilgren و همکاران در سال ۲۰۰۹ چنین نتیجه ای را عنوان کردند. آن ها بیان داشتند که اسپور *باسیلوس سوبتیلیس* بسیار حساس تر از اسپور *باسیلوس سرئوس* در برابر مواد شیمیایی نظیر هیپوکلریت سدیم، پراکسی استیک اسید می باشد و برعکس در برابر پراکسید هیدروژن بسیار مقاوم تر از اسپور *باسیلوس سرئوس* است(۱۰).

Siva Kumar و همکاران در سال ۲۰۰۴ بیان کردند که نانوذرات نقره با گروه های سولفیدریل (S–H–) با دیواره سلولی باکتری واکنش داده و ترکیب R–S–S–R را تشکیل می دهند، این ترکیب تنفس سلولی را متوقف می کند و سبب مرگ سلولی می شود(۱۱). درباره مکانیسم اثر باکتریسیدالی نانوذرات مس گزارشی در دست نیست اما Ruparelia به نقل از Beveridge و همکاران دلیل حساسیت بیشتر *B.subtilis* به نانوذرات مس را به فراوانی گروه های آمین و کربوکسیل موجود بر روی سطح سلول *B.subtilis* و تمایل بیشتر مس به این گروه ها عنوان کرده است. همچنین یون های مس آزاد شده می توانند با مولکول DNA ترکیب شده و منجر به برهم زدن ساختار هلیکال نوکلئیک اسید درون و بین زنجیره ها شوند(۱و۱۲). Taylor و Sattar and Springthorpe و Williams و Lemarie and Hosgood به ترتیب در سال های ۲۰۰۰، ۱۹۹۹، ۱۹۹۳، ۱۹۹۵ و بسیاری از دانشمندان دیگر که ذکر نامشان در این مقال نمی گنجد ترکیبات کلرین را بر روی اسپور و سلول رویشی باسیلوس ها موثر عنوان کرده و بیان داشتند که این ترکیبات بر روی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت بالاترین اثر را دارند (۱۳-۱۷).

www.SID.ir
Archive of SID

بیشترین قطر هاله در غلظت های برابر ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذرات نقره و مس در باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* به ترتیب برابر ۴۴mm و ۴۰ mm و در *باسیلوس سرئوس* به ترتیب برابر ۳۸ mm و۳۳ mm بوده است. روش تهیه رقت در لوله برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده از مواد ضدمیکروبی بر روی دو گونه انتخابی از باسیلوس ها نتایج زیر را در بر داشت. کمترین MIC از نانوذرات نقره مربوط به *باسیلوس سوبتیلیس* برابر ۵ میکروگرم در میلی لیتر بوده و پس از نانوذرات نقره نانوذرات مس قرار دارند.

این نتایج نشان دهنده آن است که نانوذرات نقره نه تنها دارای اثر باکتریواستاتیکی بلکه اثر باکتریوسایدی قوی نسبت به نانوذرات مس دارند چرا که این نانوذرات در غلظت کم سبب مرگ باسیلوس ها شدند. در بررسی MBC از نانوذرات مس *باسیلوس سرئوس* در غلظت برابر ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر از این نانوذره از بین رفت، در حالیکه MBC بدست آمده از *باسیلوس سوبتیلیس* در نانوذرات مس برابر غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود.

بررسی نتایج MIC حاصل از هیپوکلریت سدیم که امروزه بعنوان وایتکس در زمینه های مختلف مصارف گوناگون دارد بر روی گونه های حساس باسیلوس ها نظیر *باسیلوس سوبتیلیس* نشانگر اثر باکتریسیدالی این ترکیب شیمیایی است چنانچه آنها را در غلظت ۷۰۰ میکروگرم در میلی لیتر مهار کرد و *باسیلوس سرئوس* را نیز در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر مهار کرد. از این جهت هیپوکلریت سدیم را در دسته بندی مواد ضدعفونی کننده در ردیف مواد ضدعفونی کننده متوسط قرار می دهند. لازم به ذکر است که هیپوکلریت سدیم استفاده شده در این مطالعه حاوی ۵٪ کلر فعال بوده است که برای دستیابی به غلظت اصلی از فرمول A x۱۰۰۰۰ استفاده گردید. در این رابطه A برابر میزان کلر فعال نمونه است که از مشخصات اصلی محصول بوده و بر روی آن درج می گردد. عدد بدست آمده برای محصول مورد بررسی برابر ۵۰۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر می باشد.

در بررسی خاصیت اسپوروسیدالی از نانوذرات مشاهده شد که نانوذرات مس بر روی اسپور باسیلوس ها اثری نداشته در حالیکه نانوذرات نقره در همان زمان اول از تماس در غلظت ۳۵۰ میکروگرم در میلی لیتر قادر به حذف اسپورها بوده است. هیپوکلریت سدیم در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر شصت دقیقه پس از تماس توانست اسپور *باسیلوس سوبتیلیس*، را حذف کند و اسپور *باسیلوس سرئوس* در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پس از شصت دقیقه از زمان تماس به میزان کمی در محیط رشد کرد و بطور کامل مهار نشد تا اینکه در رقت ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر ده دقیقه پس از تماس بطور کامل غیرفعال شد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج از مقایسه خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات با هیپوکلریت سدیم، آنچه که هدف این مطالعه بود، می توان چنین عنوان کرد که از میان دو نانوذره انتخابی، نانوذرات نقره بیشترین اثر باکتریسیدالی و اسپوروسیدالی را داشتند. هیپوکلریت سدیم نیز بعنوان یک ماده کلردار معدنی نسبت به مواد کلردار آلی به دلیل تولید کلر آزاد و سرعت اثر بیشتر ماده ضدعفونی مناسبی می باشد.

References

1- Ruparelia JP, Kumar Chatterjee A, Duttagupta SP, Diao M, Yao M,. Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes, water research 2009,435243-5251.
2- Pal S, Tak YK ,Song JM. *Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticles.A study of the gram negative Bacterium.* Applied and Environmental. Microbiology. 2007; 73: 1721-1720.
3- Elchiguuerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A , Gao X, Lara HH , Yacaman MJ. *Interaction of silver nanoparticles with HIV-1*. J. Nanobiotech. 2005; 3: 1477-3155.
4- Tumah HN. *Bacterial biocide resistance*. J Chemother. 2009; 21(1):5-15.
5- Rice EW, Adcock NJ, Sivaganesan M, Rose LJ. *Inactivation of Bacillus anthracis Sterne, B.cereus and Bacillus thuringiensis subsp.* Israelensis by Chlorination. Environ. Microbiol. 2005; 71, 5587–5589.
6- Finegold Sydney M, Baron Ellen J. *Baily and Scott's diagnostic microbiology book*,last edited on 2002.
7- Parry M, Turnbull PCB, Gibson JR. *A colour atlas of Bacillus species.* Published by Wolf Medical Publications Ltd, Englsnd, 1983.
8- Yoon K, Byeon JH, Park J, Hwang J. *Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles*. Sci Total Environ. 2007; 373:572–5.
9- Hani A, Masaadeh ,Adnan S Jaran. *Determination of the Antibacterial Efficacy of Common Chemical Agents in Cleaning and Disinfection in Hospitals of North Jordan.* American Journal of Applied Sciences. 2009;6 (5): 811-815.
10- Hilgren J, Swanson KM, Diez-Gonzalez F, Cords B. *Susceptibilities of Bacillus subtilis, Bacillus cereus, and avirulent Bacillus anthracis spores to liquid biocides*. J Food Prot. 2009; 72: 360-4.448.
11- Siva Kumar V, Nagaraja BM, Shashikala V, Padmasri AH, Madhavendra SS, Raju BD, et al.

Archive of SID

www.SID.ir

microorganisms in water. J Mol Catal A Chem. 2004; 223:313–9.
12- Beveridge TJ, Murray RGE. *Sites of metal deposition in the cell wall of Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 1980; 141:876–87.
13- Taylor DM. *Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review.* Vet. J. 2000.159: 10 – 17
14- Sattar SA, Springthorpe S. *Viricidal activity of biocides: activity against human viruses*. In: Russell, AD and WB Hugo, GA J. Ayliffe (eds). Principles and practice of disinfection, preservation, and sterilization, 3rd ed. Blackwell Scientific Publisher, Oxford. 19s99. pp: 168 –186.
15- Lemarie RJ, Hosgood G. *Antiseptics and disinfectants in small animal practice*.Comp. Cont. Edu. Prac. Vet. 1995; 17: 1339 – 1350.
16- Williams ND, Russell AD. *Revival of biocide-treated spores of Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 1993; 75:69–75.
17- Gan X, Liu T, Zhong J, Liu X, Li G. *Effect of Silver nanoparticles on the electron transfer reactivity and the catalytic activity of myoglobin*. Chembiochem; 2004, 5:1686–91.

Archive of SID

www.SID.ir