

## نانو ذرات نقره-اکسید مس: سنتز بیولوژیکی به وسیله باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و

### سودوموناس استوتزری و بررسی خاصیت آنتی باکتریال آن‌ها

#### چکیده

در این پژوهش اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره-اکسید مس به وسیله باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) و سودوموناس استوتزری (*Pseudomonas stutzeri*) به روش انتشار در آگار و دیسک بر روی دو باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس پنومونیه و سالمونلا تیفی موریم مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی و تأیید تشکیل فاز نانو ذرات از دستگاه‌های مختلف مشخصه یابی استفاده شد. دستگاه پراش پرتو ایکس (XRD) تولید نقره-اکسید مس را تأیید کرد. آنالیزهای میکروسکوپی نشان داد که ماده تولید شده در ابعاد نانومتری است. آنالیز عنصری وجود عناصر اکسیژن، مس و نقره را تأیید نمود. همچنین نتایج طیف‌سنجی نوری (جذبی) نشان داد که طیف جذبی عناصر به وجود آمده مربوط به نانوذره‌های تولید شده می‌باشد که نتایج آن با نتایج الگوی پراش تطبیق دارد. برای ارزیابی خاصیت ضد میکروبی از دو باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پنومونیه (*Streptococcus pneumoniae*) و گرم منفی سالمونلا تیفی موریم (*Salmonella typhimurium*) استفاده شد که متوسط قطر هاله برای استرپتوکوکوس پنومونیه  $16 \pm 2$  نانومتر و برای سالمونلا تیفی موریم  $14 \pm 2$  نانومتر بود. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده این واقعیت بودند که ترکیب نانو ذرات نقره-اکسید مس خاصیت آنتی باکتریال بهتری از خود نسبت به حالتی که نانو ذرات به صورت تکی استفاده شوند، نشان می‌دهند.

**واژگان کلیدی:** نانو ذرات نقره-اکسید مس، سنتز بیولوژیکی، خواص آنتی باکتریال.

نسرين قاسمی<sup>۱،۲</sup>

رویا ذکاوتی<sup>۳\*</sup>

فرید جمالی شینی<sup>۴</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، پردیس علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۳. گروه میکروبیولوژی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۴. گروه فیزیک، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

\*مسئول مکاتبات:

rzekavati45@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۶۰۲۰۴۸۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۰۴

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی

ارشد می‌باشد.

#### مقدمه

همزمان با رشد روزافزون جمعیت در نقاط مختلف جهان فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی افزایش پیدا کرده است. می‌توان گفت یکی از پیامدهای آن استفاده بی‌رویه از آفت‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و سموم آلی کلردار و ترکیبات آلی هیدروکربن دار می‌باشد که وارد محیط شده و باعث آلودگی آب‌ها می‌شوند. پیشرفت‌های فناوری نانو در عرصه پزشکی بسیار چشمگیر بوده است. بارزترین ویژگی این فناوری کاربرد نانو ذرات در سیستم‌های بیولوژیکی و زیستی می‌باشد. با توجه به این ویژگی رفتار مولکولی نانو ذرات می‌تواند سیستم‌های زنده را تحت تأثیر خود درآورد. بنابراین خصوصیات منحصر به فرد نانو ذرات امکان استفاده بیولوژیکی آن‌ها را در تشخیص و درمان بیماری - ها فراهم نموده است ( Pourali et al., 2012a).

تولید نانو ذرات فلزی به سه روش شیمیایی و فیزیکی و بیولوژیکی امان پذیر است (Nanda *et al.*, 2009). که روش بیولوژیکی به دلیل عدم تولید مواد سمی در محیط به عنوان روش سبز خوانده می‌شود. در میان نانو ذرات مختلف می‌توان به نانو ذرات اکسید مس اشاره کرد. این نانو ذرات کاربردهای متنوعی در علوم و صنایع مختلف دارند. خاصیت ضد میکروبی، استفاده در مکمل‌های غذایی و کاتالیست‌ها نمونه‌هایی از طیف وسیع کاربردی این نانو ذرات می‌باشد (Thakkar *et al.*, 2010). امروزه از نانو ذرات نقره در صنعت دام و طیور، کشاورزی، باند‌های مورد استفاده در زخم‌بندی، لوازم جراحی، ژل‌های مرطوب‌کننده، ضد جوش‌ها، شلوارهای طبی، دستمال‌کاغذی و نیز کولرها، یخچال‌ها و ... استفاده می‌شود. نانو ذرات نقره به دلیل مقاومت بالا در برابر اکسایش و فعالیت‌های باکتریایی، استفاده زیادی در صنایعی همچون الکترونیک، شیمیایی و دندانپزشکی دارند. در مورد استفاده‌های پزشکی از نانو ذرات نقره نیز تحقیقات گسترده‌ای انجام شده است به طوری که محصولات مختلف تجاری حاوی این فلز به صورت وسیعی استفاده می‌شود. از این نانو ذرات به عنوان روکشی در ابزارهای مصنوعی که در بدن مورد استفاده قرار می‌گیرند، استفاده شده است. به طور معمول این ابزارها چنانچه فاقد روکشی از نانو ذرات باشند، از عواملی با ریسک بالا در برابر عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌آیند و افرادی که دارای این ابزارهای مصنوعی در طول درمان در بدن خود باشند، به عفونت‌ها بسیار حساس‌اند (Tedesco *et al.*, 2010).

از جمله تحقیقاتی که در زمینه سنتز نانو ذرات اکسید مس در مناطق مختلف صورت گرفته است می‌توان به رشد اکسید مس به روش بیولوژیک از باکتری پseudomonas fluorescens توسط Shantkriti and Rani اشاره کرد (Shantkriti *et al.*, 2014). تحقیقات مشابه توسط Ramanathan و همکاران انجام گرفته است که توانستند نانو ذرات اکسید مس را از باکتری مورگانلا به روش بیولوژیک رشد دهند. اندازه این نانو ذرات بین ۲۰-۱۵ نانومتر بود و بیشترین پیک جذب را در طول موج ۶۱۰ نانومتر داشت (Ramanathan *et al.*, 2011). Ashajyothi و همکاران نیز موفق به تولید نانو ذرات اکسید مس از باکتری انتروکوکوس فکالیس (*Enterococcus faecalis*) شدند که اندازه نانو ذرات تولید شده بین ۹۰-۲۰ نانومتر بود. همچنین بررسی خاصیت آنتی باکتریال آن بروی باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*)، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین و اشرشیاکلی به روش نفوذ در آگار انجام شد. نتایج هاله عدم رشد ۲۵ میلی‌متر در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین و اشرشیاکلی و همچنین ایجاد هاله ۱۸ میلی‌متری در کلبسیلا پنومونیه بود (Ashajyothi *et al.*, 2014a). Karimiyan و همکاران خاصیت ضد قارچی اکسیدهای مس، روی، منیزیم و سلیکون را بر روی کاندیدا البیکنس بررسی کردند که با مقایسه MIC و MFC دریافتند از این مواد می‌توانند در درمان عفونت‌های قارچی استفاده کرد (Karimiyan *et al.*, 2015). Kumar و همکاران رشد خارج سلولی نانو ذرات نقره را از کشت سوپرناتانت سودوموناس آروژینوزا انجام دادند. با انجام آزمون‌های تأییدی مشخص شد اندازه نانو ذرات در حدود ۱۳ نانومتر می‌باشد. همچنین خاصیت آنتی باکتریال این نانو ذرات بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی و یک‌گونه کاندیدا بررسی گردید (Kumar *et al.*, 2011). Kushwaha و همکاران موفق به جداسازی و شناسایی باکتری اشرشیاکلی برای رشد نانوذره نقره و بررسی خواص ضد میکروبی آن شدند (Kushwaha *et al.*, 2015). پژوهشی دیگر توسط Pourali و همکارانش بر روی اثر دما بر فعالیت ضد میکروبی بیوسنتز نانو ذرات نقره انجام شده است. در این پژوهش به منظور دستیابی به ساختارهای بلوری نانو ذرات نقره از عملیات حرارتی با بازه‌های زمانی مختلف استفاده شد (Pourali *et al.*, 2012b). از آنجائی که برای تولید نانو ذرات اکسید مس و نقره از روش بیولوژیکی با استفاده از سوش‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس استوتزری تاکنون گزارشی صورت نگرفته است، لذا این موضوع باعث انگیزه ای جهت انجام این تحقیق شد. باید توجه داشت که این باکتری‌ها بطور مستقیم نیز توانایی از بین بردن آلودگی‌های میکروبی را دارا هستند. بطور مثال آلودگی‌های موجود در تالاب‌ها که یکی از اجزاء اصلی چرخه‌های زیستی هستند، نیز توسط این باکتری‌ها تصفیه شده و میزان اکسیژن موجود در آب تالاب‌ها در حد نرمال نگه داشته

می‌شود. Liang و همکارانش تحقیقاتی در این زمینه بروی تالاب Wuhan چین انجام دادند که به نتایج جالبی رسیدند (Liang *et al.*, 2003).

## مواد و روش‌ها

**مواد اولیه.** نیترات نقره ( $\text{AgNO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) و سولفات مس ( $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. سوش های میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس ATCC=33591 و سودوموناس استوتزری ATCC=17588 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران جهاد دانشگاهی (IBRC) تهیه شدند. جهت انجام آزمایش‌ها از محیط‌های تریپتیک سوی براث (Tryptic soy broth (TSB)، تریپتون سوی آگار (Trypton soy agar (TSA)، مولر- هینتون آگار (Mueller-Hinton agar)، نوترینت براث (Nutrient broth)، بلاد آگار ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد. و باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پنومونیه و گرم منفی سالمونلا تیفی موریم از دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه گردید.

برای تولید نانو ذرات نقره باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را در محیط تریپتون سوی براث در ارلن های ۱۰۰ سی‌سی کشت داده و در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از رشد، محلول به‌وسیله سانتریفیوژ در سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه از محیط کشت جداسازی گردید. سپس به ۵۰ میلی‌لیتر از مایع رویی به‌دست‌آمده نیترات نقره با رقت  $10^{-5}$  به میزان ۴۰ میکرو لیتر افزوده شد (برای تهیه رقت موردنیاز برای نیترات نقره ابتدا نیترات نقره یک مولار را تهیه کرده سپس از آن رقت‌های موردنیاز را بر اساس وزن مولکولی به دست می‌آوریم). و در نهایت نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. تجمع ذرات نانو با تغییر رنگ محیط کشت بررسی گردید. برای شاهد مثبت شامل محیط کشت استریل به همراه نیترات نقره و برای شاهد منفی محیط کشت همراه با باکتری بودند. برای تهیه نمونه‌ها به میزان ۱۰ سی‌سی از محیط کشت را برداشته و در سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس با آب مقطر دیونیزه و اتانول  $0.98/1$  به مدت ۲۰ دقیقه دو بار شستشو داده و رومانند (محلول رویی) را برای انجام آزمون‌های تأییدی و بررسی تولید نانوذره نقره جدا و خشک کرده به‌صورت پودر درمی‌آید. برای تولید نانو ذرات اکسید مس نیز باکتری سودوموناس استوتزری را در محیط تریپیک سوی براث کشت داده و همانند روشی که برای تولید نانو ذرات نقره به‌کاربرده شد استفاده گردید با این تفاوت که از سولفات مس ۵ میلی‌مول به میزان ۵۰ میکرو لیتر بجای نیترات نقره استفاده شد (پورعلی و همکاران، ۲۰۱۳).

**طیف‌سنج نوری.** تأیید تولید نانو ذرات بر اساس تغییر رنگ محیط آزمون به دلیل تغییر ماهیت مواد به‌صورت نانوذره می‌باشد. پس از مشاهده تغییر رنگ حاصله نمونه‌ها توسط طیف‌سنج نوری در محدوده طول‌موج ۱۰۰۰-۲۰۰ نانومتر برای نانو ذرات نقره و برای نانو ذرات اکسید مس ۱۰۰۰-۳۰۰ نانومتر بررسی شدند. شاهد‌های منفی آزمایش محیط کشت استریل به همراه یون فلزی افزوده‌شده و بلانک مورد استفاده رومانند باکتری کشت داده‌شده در محیط کشت بود (Gericke *et al.*, 2006; Jiale *et al.*, 2007).

**پراش پرتو ایکس.** ساختار بلوری نانو ذرات ایجادشده حاصله توسط آنالیز پراش پرتو ایکس با دستگاه (Xpert-Philips) که دارای آندی مسی و طول‌موج تحریک ۱/۵۴۰۶ آنگستروم بود، مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت (Amato *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2007).

**میکروسکوپی الکترونی روبشی.** جهت پی بردن به توزیع اندازه و ریخت نانو ذرات نقره و اکسید مس تهیه شده با این روش، از تصویربرداری با دستگاه میکروسکوپی الکترونی روبشی SEM (VEGA, TESCAN-LMU)، استفاده شده است. نمونه نانو ذرات تهیه شده پس از خشک شدن و تبدیل به پودر تحت آنالیز SEM قرار گرفتند (Kalimuthu et al., 2008; Kalishwaralal et al., 2008).

**بررسی خاصیت ضد میکروبی نانو ذرات.** به منظور استاندارد نمودن غلظت تلقیح برای بررسی خاصیت آنتی باکتریال نانوذره Minimum bactericidal Concentrations (MBC) و Minimum inhibitory concentration (MIC) استفاده گردید. از سطح غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم بر لیتر استفاده شد. از روش نفوذ در آگار و دیسک برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره-اکسید مس سنتز شده استفاده گردید. خاصیت آنتی باکتریال ذرات نانو تولید شده به روش بیولوژیکی بر روی باکتری گرم مثبت مثل استرپتوکوکوس پنومونیه و باکتری گرم منفی سالمونلاتیفی موریم مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که نیترات نقره و سولفات مس باید در غلظتی که موجب از بین رفتن باکتری‌ها نشوند به محیط کشت اضافه شوند، در ابتدا به بررسی حداقل غلظت بازدارندگی نیترات نقره و سولفات مس بر روی جدایه‌های باکتریایی پرداخته شد. برای این منظور از پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. نیترات نقره در رقت‌های  $10^{-3}$  و  $10^{-4}$  و  $10^{-5}$  و  $10^{-6}$  و  $10^{-7}$  تهیه گردید. به تمامی چاهک‌ها ۲۰۰ میکرو لیتر محیط کشت نوترینت براث افزوده شد. سپس به خانه اول از سمت چپ ۲۰۰ میکرو لیتر نیترات نقره اضافه شد (برای هر کدام از رقت‌ها جداگانه انجام شد). پس از پیمت نمودن محلول درون چاهک، ۲۰۰ میکرو لیتر از این محلول به خانه شماره ۲ از همان ردیف (به صورت افقی) که دارای ۲۰۰ میکرو لیتر نوترینت براث از قبل بود، اضافه گردید. پس از پیمت نمودن این فرآیند، تکرار و تهیه رقت تا چاهک شماره ۱۰ ادامه یافت. در نهایت از چاهک شماره ۱۰، جهت تیتراسیون مناسب به میزان ۲۰۰ میکرو لیتر دور ریخته شد. چاهک شماره ۱۲ کنترل مثبت (دارای باکتری و نوترینت براث و فاقد نیترات نقره) و چاهک شماره ۱۱ کنترل منفی (فاقد باکتری تلقیح شده و حاوی ۲۱۰ محیط کشت استریل) بودند. به تمامی چاهک‌ها (به جز چاهک شماره ۱۱) از کشت ۲۴ ساعته باکتری در نوترینت براث با کدورت مشخص (۰/۵ مک فارلند) به میزان ۱۰ میکرو لیتر اضافه شد. این عمل برای هر جدایه از باکتری، هر کدام در یک ردیف مجزا در درون یک پلیت انجام شد. پلیت درون شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۸۰ دور بر دقیقه قرار گرفت. در مرحله بعد از تمامی چاهک‌ها برای هر باکتری روی محیط کشت نوترینت آگار برده شد تا ایجاد و یا عدم ایجاد کلنی مشخص شود. در این مطالعه کمترین رقتی که باعث از بین رفتن ۹۹٪ از باکتری‌ها شود به عنوان رقت کمترین غلظت کشندگی، رقت پس‌از آن که رشد باکتری‌ها در روی نوترینت آگار سبب شود به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای انجام آزمون آنتی باکتریال باکتری را روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. پس از طی شدن ۱۵ دقیقه که محیط خشک شد دیسک را روی محیط قرار داده و ۳۰ میکرو لیتر از Ag-CuO رقیق شده را به آن اضافه می‌گردد. در انتها محیط کشت را در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه می‌شود. در انتهای مدت‌زمان سپری شده نتیجه تست آنتی باکتریال بررسی می‌شود. شایان ذکر است که کلیه آزمون‌ها طی سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج بر اساس میانگین ثبت گردید (پورعلی و همکاران، ۲۰۱۳).

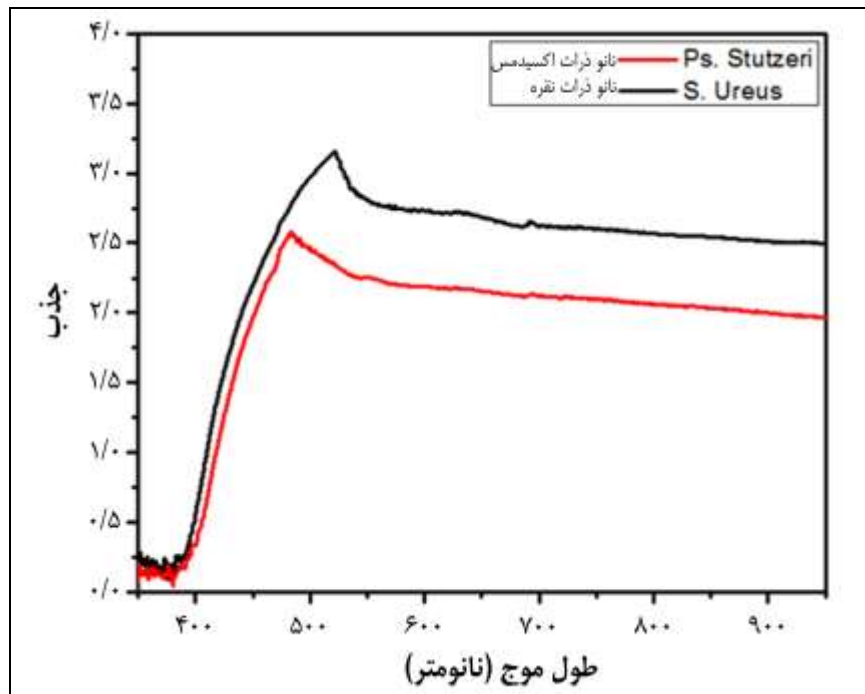
## نتایج

شکل ۱ تولید ذرات نقره و اکسید مس را نشان می‌دهند که ابتدا برای نانو ذرات نقره از طریق تغییر رنگ محیط کشت از زرد به قهوه‌ای و برای ذرات اکسید مس از زرد به نارنجی تیره مورد ارزیابی گردید.



شکل ۱: تغییر رنگ محیط کشت ذرات حاوی نقره و اکسید مس.

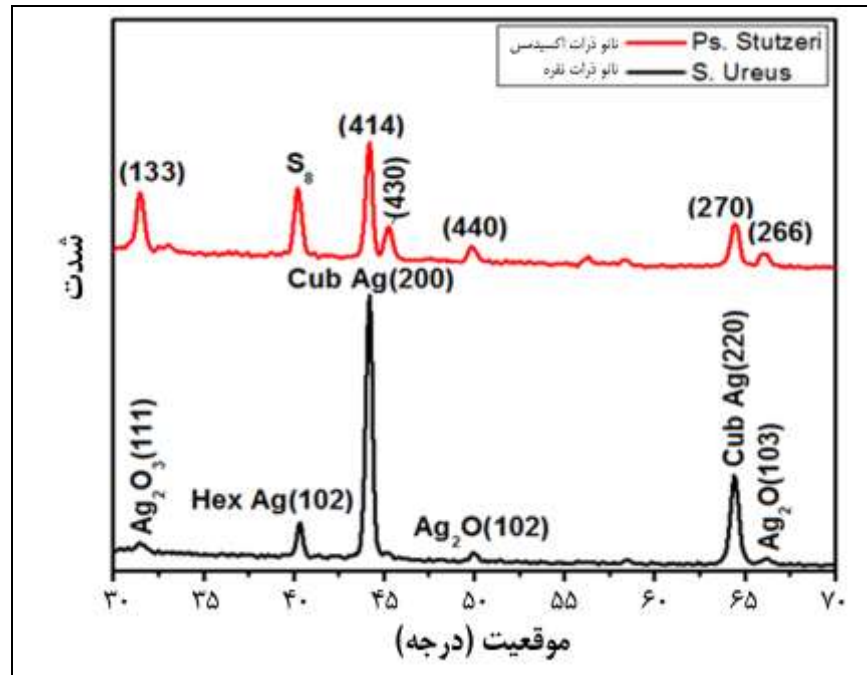
نتایج طیف جذبی در شکل ۲ نشان داده شده است. ذرات نقره تولیدی توسط استافیلوکوکوس اورئوس دارای بیشینه جذب نوری در محدوده ۵۱۶ نانومتر می‌باشد و بیشینه جذب نوری در محدوده ۴۸۹ نانومتر برای ذرات اکسید مس تولیدی توسط سودوموناس استواتزی به دست آمد.



شکل ۲: طیف جذبی باکتری‌های مورد استفاده برای تولید نانو ذرات نقره و اکسید مس.

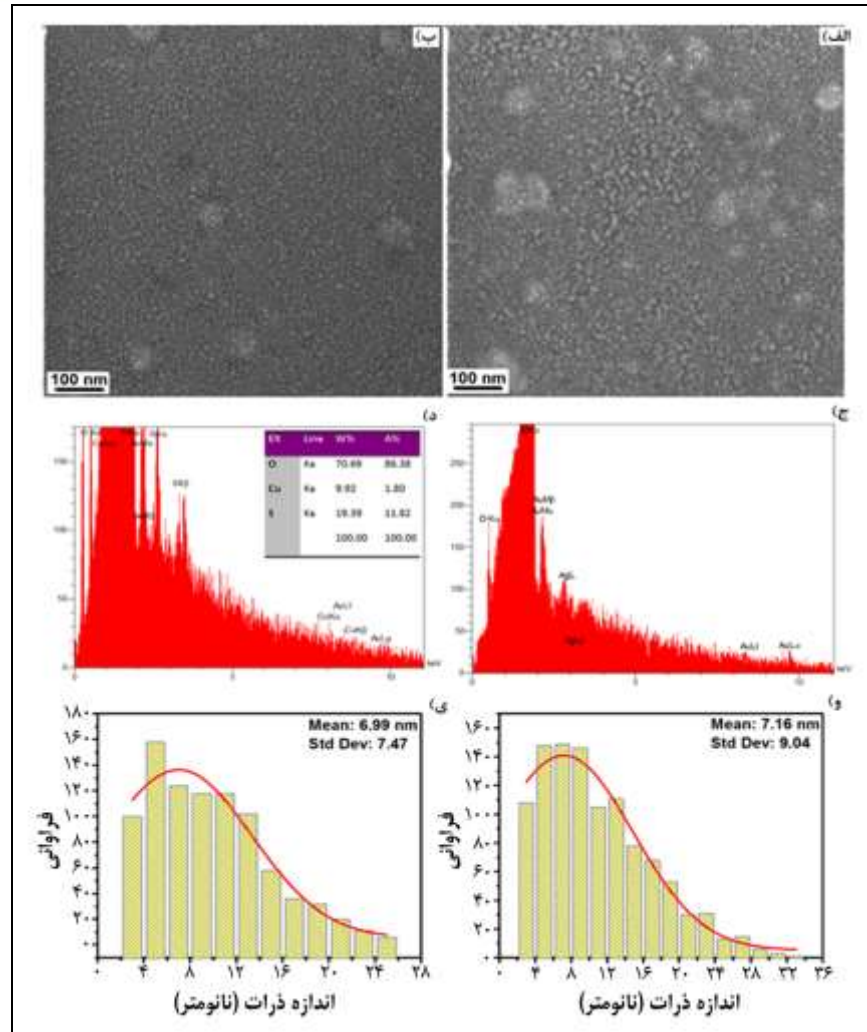
نانو ذرات نقره-اکسید مس: سنتز بیولوژیکی به وسیله باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس ... / قاسمی و همکاران

آنالیز پراش پرتوایکس نیز نشان داد که نمونه‌های ساخته شده دارای فازهای مورد انتظار بوده است. شکل ۳ الگوی پراش نانو ذرات را نشان می‌دهد.



شکل ۳: الگوی پراش پرتو اشعه ایکس نانو ذرات نقره و اکسید مس.

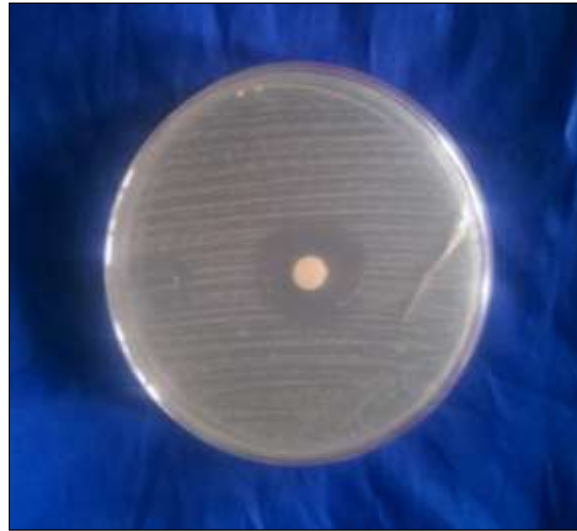
جهت پی بردن به توزیع اندازه و ریخت نانو ذرات نقره و اکسید مس تهیه شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM استفاده شد. شکل ۴ به ترتیب تصاویر میکروسکوپ الکترونی، آنالیز عنصری و نمودار توزیع اندازه ذرات ثبت شده از نانو ذرات نقره و اکسید مس رشد داده شده را نشان می‌دهند. تصاویر نشان می‌دهد که ذرات دارای ابعاد نانومتری و به صورت کروی هستند. نمودار توزیع اندازه ذرات با استفاده از برنامه *Imagj* استخراج شده است و بیانگر این است که نانو ذرات دارای اندازه میانگینی کمتر از ۱۰ نانومتر هستند. پس می‌توان آن‌ها را نقاط کوانتومی نیز نامید. آنالیز عنصری نیز وجود عناصر نقره، مس و اکسیژن را نشان می‌دهد.



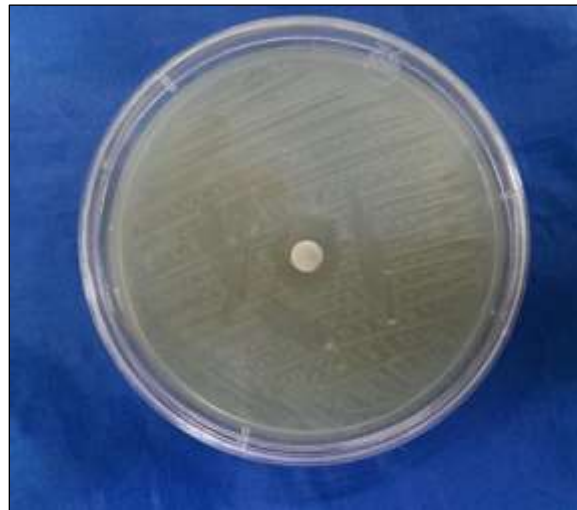
شکل ۴: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، آنالیز عنصری و نمودار توزیع اندازه نانو ذرات نقره-اکسیدمس رشد

#### داده با باکتری الف، ج، و) *P. Stutzeri* (ب، د، ی) *Ps. Sp* (ج) *B. Cereus*

غلظت به دست آمده در استاندارد نمودن غلظت تلقیح برای بررسی خاصیت آنتی باکتریال  $10^{-2}$  می‌باشد. که از این غلظت در انجام بررسی خاصیت ضد باکتریایی نانو ذرات نقره-اکسیدمس استفاده شد. ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات تولید شده در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. همان گونه که مشخص است نمونه‌ها دارای هاله عدم رشد توسط نانو ذرات تولیدی را نشان می‌دهد. برای ارزیابی خاصیت ضد میکروبی از دو باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پنومونیه و گرم منفی سالمونلا تیفی موریم استفاده شد که متوسط قطر هاله برای استرپتوکوکوس پنومونیه  $16 \pm 2$  میلی‌متر و برای سالمونلا تیفی موریم  $14 \pm 2$  میلی‌متر به دست آمد.



شکل ۵: تصویر مربوط به میزان فعالیت آنتی باکتریال و بازدارندگی محلول نانوذره Ag-CuO تولیدشده توسط باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و پسودوموناس استوتزری بر روی باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه.



شکل ۶: تصویر مربوط به میزان فعالیت آنتی باکتریال و بازدارندگی محلول نانوذره Ag-CuO تولیدشده توسط باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و پسودوموناس استوتزری بر روی باکتری سالمونلا.

### بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه درمان برخی از بیماری‌های عفونی از اهمیت خاصی برخوردار است و درمان این بیماری‌ها جزء اولویت‌های درمانی در سازمان بهداشت جهانی می‌باشد و همچنین افزایش مقاومت دارویی و اثرات جانبی ناشی از آن‌ها که از محدودیت‌های درمان این بیماری می‌باشد، دستیابی به روش‌های مناسب و بی‌ضرری که بتواند با عفونت‌های حاصله از آن‌ها مقابله نماید احساس می‌گردد. نانو ذرات تولیدشده به روش



بیولوژیکی دارای اثرات ضد باکتریایی مناسبی علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس پنومونیه و سالمونلا می‌باشند. تأثیر سینرژیسیم نانوذره نقره به همراه نانوذره اکسید مس نشان‌دهنده فعالیت ضد باکتریایی بسیار خوبی می‌باشد. غلظت نانوذره مورد استفاده هم‌افزایی و جلوگیری از رشد باکتری نتیجه بسیار خوبی داشته است. تاکنون اثر سینرژیسیم نقره-اکسیدمس به صورت گسترده مورد مطالعه قرار نگرفته است اما در پژوهش پیش رو علاوه بر رشد این نانو ذرات توسط باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و پseudomonas استواتزی اثر سینرژیسیم آنتی باکتریال این نانو ذرات بر روی دو باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پنومونیه و گرم منفی سالمونلا تیفی موریم نیز مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج ملاحظه شده با اضافه شدن نانو ذرات نقره به اکسید مس قطر هاله عدم رشد باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس پنومونیه افزایش بیشتری داشته که این امر نشان‌دهنده فعالیت ضد باکتریایی بسیار خوب نانو ذرات نقره-اکسیدمس بر علیه باکتری گرم مثبت بوده است. حساسیت باکتری‌ها نسبت به نانو ذرات مختلف وابسته به گونه باکتری تولیدکننده نانو ذرات، اندازه، شکل و غلظت نانو ذرات تولیدی و همچنین شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط واکنش دارد (Rai et al., 2009; Sadhasivam et al., 2010).

Yoon و همکارانش (Yoon et al., 2007) اثرات ضد باکتریایی اکسید مس و نقره را برای اشرشیاکلی و باسیلوس سابتیلیس گزارش کردند، که نانو ذرات اکسید مس فعالیت ضد باکتریایی بیشتری در مقایسه با نانو ذرات نقره از خود نشان دادند. نانو ذرات اکسید مس و نقره نشاندهنده روی مواد مناسب مختلف از قبیل کربن، فوم پلی اورتان، پلیمرها نیز به طور مؤثری برای کاربردهای ضد باکتریایی مناسب می‌باشند (Azam, 2008; Raffi et al., 2008; Li et al., 2006; Kumar et al., 2004; Esteban-Cubillo et al., 2006). همکاران در تحقیقات خود بر روی نانو ذرات اکسید مس نشان دادند که نانو ذرات اکسید مس فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی را هم در مورد باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی از خود نشان می‌دهد (Azam, 2012). آن‌ها مشاهده کردند که خاصیت ضد میکروبی این نانو ذرات به اندازه آن‌ها وابسته است. اطلاعات اندکی در مورد فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات اکسید مس در دسترس است (Xu et al., 1999). نتایج نشان می‌دهد که محیط نوترینت می‌تواند به آزاد شدن یون‌های مس را تسهیل کند. آزاد شدن قابل توجه یون‌های مس در محیط نوترینت احتمالاً ناشی از برهمکنش یون‌های کلرید با لایه اکسید سطح نانو ذرات می‌باشد (Cioffi et al., 2005). حضور اتم‌های اکسیژن در ساختار نانو ذرات در پی آزاد شدن یون‌های مس می‌تواند با تشکیل گونه‌های پراکسید همراه باشد که این فاکتور نیز می‌تواند نقش مؤثری در فعالیت ضد باکتریایی به واسطه اثرات اکسیدی ایفا نماید. یون‌های فلزات سنگین دارای اثرات متفاوتی بر روی عملکرد سلول باکتری می‌باشند. برای یون‌های مس، مکانیزم می‌تواند شامل استرس‌های اکسیدی باشد. چرخه ریداکس (اکسایش و کاهش) یون‌های مس در نتیجه کاهش گلوکوتایون و تأثیر بر گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها سبب تخریب DNA و اکسید شدن لیپیدها می‌شود (Cioffi et al., 2005). اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات به غلظت نانو ذرات و غلظت ابتدایی باکتری وابسته است (Colaizzi et al., 1965). باسیلوس سوبتیلیس حساسیت بالاتری نسبت به نانو ذرات مس نشان می‌دهند. آن‌ها به طور طبیعی دارای گروه‌های آمین و کربوکسیل در روی سطح سلول هستند و میل ترکیبی مس نسبت به این گروه‌ها بالاست. یون‌های مس ممکن است با مولکول‌های DNA متصل شده و باعث تخریب چرخه مارپیچی می‌گردند. همچنین یون‌های مس در داخل سلول‌های باکتری باعث از هم گسیختگی چرخه‌های بیوشیمیایی می‌گردد. یون‌های نقره و مس به اندازه کافی کوچک هستند که غشای سلول‌های باکتری مختل گردد و با ورودشان سبب تخریب عملکرد آنزیمی می‌شود. تأثیر غیرمستقیم تغییرات محیط باردار اطراف ذرات است که سبب کارایی بالای ذرات فلزی در برابر میکروارگانیسم‌ها می‌گردد. مکانیسم‌های پیشنهادی دیگر اتصال نانو ذرات به دیواره باردار منفی سلول‌های باکتری است که باعث تخریب شکل پروتئین و مرگ سلول می‌گردد. همچنین مکانیسمی توسط Azam و همکاران و همچنین Lin و همکاران پیشنهاد شد (Azam, 2012; Lin et al., 1998). یکی از علت‌های مهم برای این تفسیر می‌تواند واکنش مستقیم بین نانو ذرات و سطح غشای سلول باکتری باشد که نمونه آن تولید انواع اکسیژن‌های فعال در حضور نانوذره می‌باشد. در ضمن

نانو ذرات نقره-اکسید مس: سنتز بیولوژیکی به وسیله باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس ... / قاسمی و همکاران

خاصیت ضد میکروبی با افزایش غلظت نانوذره اکسید مس افزایش پیدا می‌کند و ممانعت از رشد احتمالاً به دلیل شکستن دیواره سلولی و یا بدکاری آنزیم‌های سلولی می‌باشد (Das et al., 2013).

از جمله تحقیقاتی که در زمینه رشد نانوذرات نقره و اکسید مس در مناطق مختلف صورت گرفته است می‌توان به رشد اکسید مس به روش بیولوژیک از باکتری پسدوموناس فلوروسنس توسط Shantkriti and Rani اشاره کرد (Shantkriti and Rani, 2014). تحقیقات مشابه توسط Ramanathan و همکاران انجام گرفته است که توانستند نانوذره اکسید مس را باکتری مورگانلا به روش بیولوژیک سنتز کنند. اندازه این نانو ذرات بین ۲۰-۱۵ نانومتر بود و بیشترین پیک جذب را در طول موج ۶۱۰ نانومتر داشت (Ramanathan et al., 2011). علاوه بر این، Ashajyothi و همکاران نیز موفق به تولید نانوذره اکسید مس از باکتری اتروکوکوس فکالیس شدند که اندازه این نانو ذرات تولید شده توسط MES بین ۹۰-۲۰ نانومتر بود. همچنین آن‌ها خاصیت ضد باکتریایی این نانو ذرات را بروی باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*)، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین و اشرشیاکلی به روش نفوذ در آگار انجام دادند. نتیجه آن هاله عدم رشد ۲۵ میلی‌متر در استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین و اشرشیاکلی و همچنین ایجاد هاله ۱۸ میلی‌متر در کلبسیلا پنومونیه بود (Ashajyothi et al., 2014b). Pandiyarajan و همکاران سنتز و فعالیت ضد باکتریایی نانو فلاسک اکسید مس را به روش سل-ژل انجام داد و خاصیت آنتی باکتریال آن را بر روی باکتری‌های شیگلا فلاکسنری (*S. Flexner*)، استافیلوکوکوس اورئوس و اپیدرمیدیس، سالمونلا تایفی موریم (*Salmonella typhimurium*)، باسیلوس سوبتلیس، اشرشیاکلی و پسدوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) مورد بررسی قرارداد که در این بین شیگلا فلاکسنری و باسیلوس سوبتلیس بیشترین حساسیت را به اکسید مس نشان دادند (Pandiyarajan et al., 2013).

نقره و نانو ذرات حاصل از آن در فازهای مایع، می‌توانند یون‌های نقره را آزاد نموده که به صورت بیولوژیکی فعال و سبب ایجاد خواص باکتری کشی شوند. در این راستا مکانیسم عمل به طور کامل شناسایی نشده ولی نشان داده شده است که یون‌های نقره می‌توانند با ۳ جزء مهم از سلول باکتری واکنش داده و اثرات ضد میکروبی خود را از طریق واکنش با دیواره پپتیدوگلیکان و غشاء سلولی، واکنش با DNA سلولی، واکنش با پروتئین‌های سلولی به خصوص آنزیم‌های مهم در روندهای اساسی سلول، مانند زنجیره انتقال الکترون اعمال نمایند (Heunis et al., 2010; Klasen, 2000). Kumar and Mamidyala سنتز خارج سلولی نانو ذرات را از کشت سوپرناتانت سودوموناس آئروژینوزا انجام داد. که با آزمون‌های تأییدی مشخص شد سایز نانو ذرات ۱۳ nm و همچنین خاصیت آنتی باکتریال آن را بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی و یک‌گونه کاندیدا بررسی کرد (Kumar and Mamidyala, 2011). Shahverdi و همکاران سنتز خارج سلولی نانوذره نقره را برای بعضی از باکتری‌ها انجام دادند که شامل کلبسیلا نومونیه، اشرشیاکلی، اتروباکتر کلوآکه، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتلیس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کاندیدا البیکنس می‌باشند (Shahverdi et al., 2007). Ghorbani بیوستتزر نانو ذرات نقره را با استفاده از سالمونلا تایفی موریم انجام داد که سایز نانو ذرات تولیدی ۸۷ nm بود (Ghorbani, 2013). همچنین Kushwaha و همکاران موفق به جداسازی و شناسایی باکتری اشرشیاکلی برای سنتز نانوذره نقره و بررسی خواص ضد میکروبی آن شدند (Kushwaha et al., 2015). نظافتی و پور آقایی سنتز نانو ذرات نقره با ساختار مثلثی شکل و بررسی خواص باکتریایی آن را در روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد تحقیق قراردادند که در این میان نشان دادند برهمکنش‌های نانو ذرات نقره با باکتری‌ها به اندازه و شکل نانو ذرات بستگی دارد. بررسی‌های قابل توجهی در خصوص سنتز و بررسی برهمکنش نانو ذرات نقره به صورت کروی شکل با باکتری‌ها انجام شده است، اما مطالعات کمی در مورد شکل نانو ذرات بر فعالیت باکتری صورت گرفته است. در این پژوهش، نانو ذرات نقره با ساختار مثلثی شکل سنتز و اثر ضد باکتریایی آن‌ها بر روی سه نوع باکتری شایع ای.کولای، آرئوس و آرجینوزا بررسی شدند. نتایج حاصل از آزمون هاله نشان داد که قطر هاله تشکیل شده برای باکتری گرم مثبت آرئوس نسبت به دو باکتری دیگر گرم منفی کمتر بود (نظافتی و پور آقایی، ۱۳۹۲).

## سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و شیراز استان فارس و همچنین دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز به خاطر حمایت‌های آنان از این کار قدردانی و تشکر می‌نمایند.

## منابع

- پورعلی، ص.، باصری صالحی، م. افشارنژاد، س. و بهروان، ج.، ۲۰۱۳. تولید بیولوژیکی و بررسی خواص ضد باکتریایی نانو ذرات طلا. فصلنامه علمی پژوهشی دنیای میکروبیها، شماره ۳ (پیاپی ۱۶)، صفحات ۱۹۸-۲۱۱.
- نظافتی، ن. و پورآقایی، س. ۱۳۹۲. سنتز نانو ذرات نقره با ساختار مثلثی شکل و بررسی خواص ضد باکتریایی آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت. اولین همایش ملی کاربردهای نانو فناوری در صنعت، معدن، کشاورزی و پزشکی، کرج.
- Amato, E., Diaz-Fernandez, Y. A., Taglietti, A., Pallavicini, P., Pasotti, L., Cucca, L. and Necchi, V., 2011.** Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity against Gram Positive and Gram Negative Bacteria of Biomimetically Coated Silver Nanoparticles. *Langmuir*, 27(15), 9165-9173.
- Ashajyothi, C., Jahanara, K. and Chandrakanth, R. K., 2014a.** Biosynthesis and characterization of copper nanoparticles from *Enterococcus faecalis*. *Int J Pharm Bio Sci*, 5, 204-211.
- Ashajyothi, C., Jahanara, K. and Chandrakanth, R. K., 2014b.** Biosynthesis and characterization of copper nanoparticles from *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Pharma Biosci*, 5(4), 204-211.
- Azam, A., 2012.** Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against gram-positive and -negative bacterial strains. *International Journal of Nanomedicine*, 3527.
- Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L. and Traversa, E., 2005.** Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties. *Chemistry of Materials*, 17(21), 5255-5262.
- Colaizzi, J. L., Knevel, A. M. and Martin, A. N., 1965.** Biophysical study of the mode of action of the Tetracycline antibiotics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(10), 1425-1436.
- Das, D., Nath, B. C., Phukon, P. and Dolui, S. K., 2013.** Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 430-433.
- Esteban-Cubillo, A., Pecharrromán, C., Aguilar, E., Santarén, J. and Moya, J. S., 2006.** Antibacterial activity of copper monodispersed nanoparticles into sepiolite. *Journal of Materials Science*, 41(16), 5208-5212.
- Gericke, M. and Pinches, A., 2006.** Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy*, 83(1), 132-140.
- Ghorbani, H. R., 2013.** Biosynthesis of silver nanoparticles using *Salmonella typhirium*. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3(1), 29.
- Heunis, T. D. J. and Dicks, L. M. T., 2010.** Nanofibers offer alternative ways to the treatment of skin infections. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1-10.
- Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X. and He, N., 2007.** Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18(10), 105104.

- Jiale, H., Qingbiao, L., Daohua, S., Yinghua, L., Yuanbo, S., Xin, Y. and Cuixue, C., 2007.** Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18(10), 105104.
- Kalimuthu, K., Babu, R. S., Venkataraman, D., Bilal, M. and Gurunathan, S., 2008.** Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(1), 150-153.
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ramkumar Pandian, S., Nellaiah, H. and Sangiliyandi, G., 2008.** Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*. *Materials Letters*, 62(29), 4411-4413.
- Karimian, A., Najafzadeh, H., Ghorbanpour, M. and Hekmati-Moghaddam, S. H., 2015.** Antifungal effect of magnesium oxide, zinc oxide, silicon oxide and copper oxide Nanoparticles against *Candida albicans*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 17(10).
- Klasen, H. J., 2000.** Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns*, 26(2), 117-130.
- Kumar, C. G. and Mamidyala, S. K., 2011.** Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(2), 462-466.
- Kumar, V. S., Nagaraja, B. M., Shashikala, V., Padmasri, A. H., Madhavendra, S. S., Raju, B. D. and Rao, K. S. R., 2004.** Highly efficient Ag/C catalyst prepared by electro-chemical deposition method in controlling microorganisms in water. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 223(1), 313-319.
- Kushwaha, A., Singh, V. K., Bhartariya, J., Singh, P. and Yasmeen, K., 2015.** Isolation and identification of *E. coli* bacteria for the synthesis of silver nanoparticles: characterization of the particles and study of antibacterial activity. *Eur J Exp Biol*, 5(1), 65-70.
- Li, Z., Lee, D., Sheng, X., Cohen, R. E. and Rubner, M. F., 2006.** Two-Level Antibacterial Coating with Both Release-Killing and Contact-Killing Capabilities. *Langmuir*, 22(24), 9820-9823.
- Liang, W., Wu, Z.-b., Cheng, S.-p., Zhou, Q. h. and Hu, H.-y., 2003.** Roles of substrate microorganisms and urease activities in wastewater purification in a constructed wetland system. *Ecological Engineering*, 21(2), 191-195.
- Lin, Y.-s. E., Vidic, R. D., Stout, J. E., McCartney, C. A. and Yu, V. L., 1998.** Inactivation of *Mycobacterium avium* by copper and silver ions. *Water Research*, 32(7), 1997-2000.
- Nanda, A., & Saravanan, M., 2009.** Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5(4), 452-456.
- Pandiyarajan, T., Udayabhaskar, R., Vignesh, S., James, R. A. and Karthikeyan, B., 2013.** Synthesis and concentration dependent antibacterial activities of CuO nanoflakes. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 2020-2024.
- Pourali, P., Baserisalehi, M., Afsharnezhad, S., Behravan, J., Alavi, H. and Hosseini, A., 2012a.** Biological synthesis of silver and gold nanoparticles by bacteria in different temperatures (37 C and 50 C). *J Pure Appl Microbiol*, 6, 757-763.
- Pourali, P., Baserisalehi, M., Afsharnezhad, S., Behravan, J., Alavi, H. and Hosseini, A., 2012b.** Biological synthesis of silver and gold nanoparticles by bacteria in different temperatures (37 C and 50 C). *JPAM*, 6, 757-763.
- Raffi, M., Hussain, F., Bhatti, T. M., Akhter, J. I., Hameed, A. and Hasan, M. M., 2008.** Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224. *Journal of materials science and technology*, 24(2), 192-196.
- Rai, M., Yadav, A. and Gade, A., 2009.** Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76-83.

- Ramanathan, R., Bhargava, S. K. and Bansal, V., 2011.** Biological synthesis of copper/copper oxide nanoparticles. *Chemeca 2011: Engineering a Better World*, 1991.
- Sadhasivam, S., Shanmugam, P. and Yun, K., 2010.** Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 358-362.
- Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R. and Minaian, S., 2007.** Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(3), 168-171.
- Shantkriti, S. and Rani, P., 2014.** Biological synthesis of Copper nanoparticles using *Pseudomonas fluorescens*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 3(9), 374-383.
- Tedesco, S., Doyle, H., Blasco, J., Redmond, G. and Sheehan, D., 2010.** Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 100(2), 178-186.
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S. and Parikh, R. Y., 2010.** Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 262-267.
- Xu, J. F., Ji, W., Shen, Z. X., Tang, S. H., Ye, X. R., Jia, D. Z. and Xin, X. Q., 1999.** Preparation and characterization of CuO Nanocrystals. *Journal of Solid State Chemistry*, 147(2), 516-519.
- Yoon, K.-Y., Hoon Byeon, J., Park, J. H. and Hwang, J., 2007.** Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 373(2), 572-575 .