

بررسی اثر نانوذرات نقره بر رشد باکتری اشرشیاکلی

نوشین نقش^۱، مریم صفری^۲، پریسا حاج مهرابی^۳

^۱دکتری فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران.

^۲کارشناس بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران.

^۳کارشناس زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: نانوذرات، اجزای کوچکی هستند که در زمینه پزشکی کاربردهای زیادی دارند. یکی از شاخه‌های کاربردی در زمینه نانو تکنولوژی، استفاده از فناوری نانو سیلور (Nanosilver) است. خواص ضد میکروبی این نانوذرات و کاربرد مفید آن در زمینه بیوتکنولوژی و مهار تخصصی میکروب‌ها بررسی شده است. با توجه به نبود گزارش‌های دقیق پیرامون خواص ضد باکتریایی این نانوذره، این تحقیق با هدف بررسی مقایسه تأثیرات مهاری نقره بر باکتری *E. coli* صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه، نانو سیلورها با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ ppm بر روی دیسک‌های بلانک تلقیح شده و در محیط کشت نوترین آگار قرار داده شدند. با تنظیم میزان باکتری‌ها مطابق با غلظت استاندارد ۰/۵ مک فارلند، در روزهای اول، دوم و ششم قطر هاله‌های عدم رشد بررسی گردید. به منظور مقایسه میانگین هاله‌های عدم رشد در گروه‌های کنترل و تیمار از آزمون تی تست استفاده شد و $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در روز اول بعد از تیمار و در غلظت ۴۰۰ ppm، میانگین قطر هاله‌ها در باکتری $2/30 \pm 0/43$ mm بود که از نظر آماری در مقایسه با گروه‌های شاهد افزایش معنی داری داشت ($p = 0/01$). در روز دوم بعد از تیمار و در غلظت ۴۰۰ ppm، میانگین قطر هاله‌ها $2/48 \pm 0/39$ mm بود که از نظر آماری در مقایسه با گروه‌های شاهد افزایش معنی داری داشت ($p < 0/01$)، ولی تفاوت معنی داری با روز اول نداشت.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه نانو تکنولوژی در شاخه‌های مختلف علوم کاربردهای گوناگونی دارد، تعمیم نتایج این مطالعه می‌تواند در درمان بسیاری از بیماری‌های منتقل شده توسط باکتری در زمینه پزشکی مفید واقع شود. همچنین با توجه به عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌تواند جایگزین مناسبی نیز برای آنها باشد.

کلید واژه‌ها: نانوذرات نقره؛ نانو بیوتکنولوژی؛ مهار کنندگی؛ اشرشیاکلی.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: n_naghsh@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۳۱

مقدمه

استفاده از فناوری نانو سیلور می‌باشد. در این تکنولوژی یون‌های نقره به صورت کلوئیدی در محلول به حالت سوسپانسیون قرار داده می‌شوند. نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولید مثل میکروارگانیسم اثر می‌گذارد. در مطالعات مختلف، خواص ضد میکروبی این نانوذرات و استفاده مفید از آن در زمینه بیوتکنولوژی و مهار اختصاصی میکروب‌ها بررسی شده است

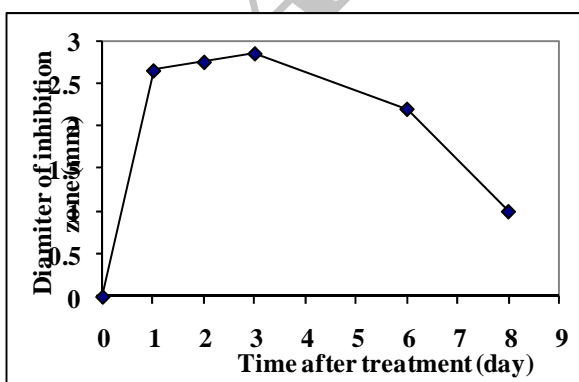
محققان نانو تکنولوژی ابعاد وسیعی از کاربردهای نانوذرات را شناسایی کرده‌اند که ممکن است نقش بسیار زیادی در پزشکی، پیشگیری و درمان بیماری‌ها داشته باشد. همچنین اثرات ضد میکروبی نانو سیلور در مطالعات گوناگون بررسی شده است (۲،۱). یکی از شاخه‌های کاربردی در زمینه نانو تکنولوژی،

هاله‌ها در روزهای اول، دوم و ششم بررسی و اندازه‌گیری گردید. به‌منظور افزایش دقت در زمانهای مختلف، این آزمایش‌ها برای هر غلظت با ۲۰ تکرار صورت گرفت.

بعد از گذشت زمانهای ۱، ۲، ۶ و روز تغییرات مورفولوژیک و میانگین قطر هاله‌های عدم رشد در گروه‌های تیمار با گروه شاهد مقایسه شد. برای سنجش آماری داده‌ها از برنامه نرم‌افزاری SPSS و برای نمودارها از برنامه نرم‌افزاری Excel استفاده گردید. به‌منظور مقایسه میانگین‌ها آزمون تی تست به کار برده شد و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در روز اول بعد از تیمار و در غلظت ۴۰۰ ppm، میانگین قطر هاله‌ها در باکتری $2/30 \pm 0/43$ mm بود که از نظر آماری در مقایسه با گروه‌های شاهد معنی‌دار گزارش شد ($p < 0/01$). در روز دوم بعد از تیمار و در غلظت ۴۰۰ ppm، میانگین قطر هاله‌ها $2/48 \pm 0/39$ mm به دست آمد که این میزان نیز از نظر آماری در مقایسه با گروه‌های شاهد معنی‌دار بود ($p < 0/02$)، ولی تفاوت قطر هاله‌ها در روز دوم با روز اول معنی‌دار نبود. در روز ششم بعد از تیمار و در غلظت ۴۰۰ ppm، میانگین قطر هاله‌ها $9/4 \pm 0/47$ mm برآورد شد که از نظر آماری در مقایسه با گروه‌های شاهد معنی‌دار بود ($p < 0/01$)، نمودار شماره ۱ و ۲). تأثیرات مهارتی نانوسیلورها بر روی باکتری، ۳ روز بعد از تیمار در غلظت ۴۰۰ ppm - ۱۰۰ به‌صورت وابسته به دوز افزایش یافت، ولی در غلظت ۴۰۰ ppm تفاوت معنی‌داری با غلظت ۵۰۰ ppm مشاهده نشد (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۱: اندازه‌گیری قطر هاله‌ها در غلظت ۴۰۰ ppm از نانوذرات نقره در زمانهای مختلف بعد از تیمار در باکتری *E. coli*

(۳،۲). مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، راه اصلی درمان عفونت‌های باکتریایی است. متأسفانه با افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های قوی‌تر، خطر افزایش بیماری‌های عفونی جان انسانها را تهدید می‌کند. امروزه روش‌های مختلفی به یاری انسانها آمده تا مصرف این آنتی‌بیوتیک‌ها روز به روز کاهش یابد. نانوذرات نقره بدون افزایش مقاومت دارویی، باعث مهار سیستم تنفسی باکتری‌ها می‌شود (۵،۴). این عنصر دارای خواص اختصاصی در میکروبی‌زدایی بوده و تهیه آن آسان و قیمت آن نیز ارزان است (۵،۳). از طرفی، باکتری‌های گرم منفی واجد یک دیوار سلولی به ضخامت ۷-۸ nm هستند که شامل لیپو پلی‌ساکاریدهای نرم می‌باشد، همچنین باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با گرم مثبت‌ها مستحکم‌ترند و نفوذ نانوذرات نقره به داخل آنها سخت‌تر می‌باشد. لذا محلول نقره کلونیدی به‌صورت ذرات ریز میکروسکوپی منتشر شده و به‌راحتی می‌تواند به داخل سلول‌های باکتری نفوذ کند.

ابعاد و نوع شکل هندسی نانوذرات در اثرات مهارتی آنها تأثیرگذار است (۶،۴)، این مطالعه با هدف تعیین اثر نانوذرات کرومی با قطر بسیار کوچک ۴ nm بر رشد *E. coli* صورت گرفت.

روش بررسی

باکتری مورد نظر از انستیتو پاستور تهران خریداری شد، و محلول کلونیدی نانوذرات نقره از شرکت نانونصب پارس با میانگین قطر ۴ nm تهیه گردید. در ابتدا غلظت‌های مورد نظر از کلونید نانوسیلور به‌وسیله آب مقطر و به روش سری رقت تهیه شد. سپس در شرایط کاملاً استریل، ۵۰ μl از نانوسیلورها در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ ppm به هر دیسک بلانک تلقیح شده و به مدت یک ساعت در دمای ۴۰ °C فور قرار داده شدند.

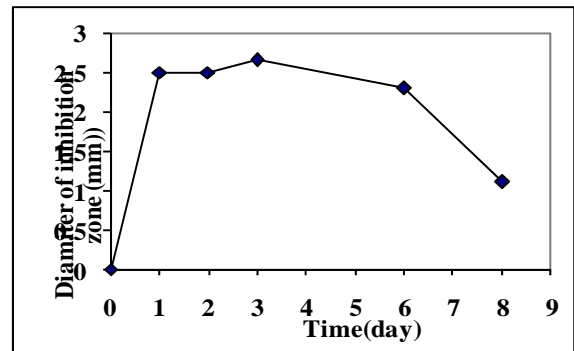
ابتدا در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه فلاورجان از کشت ۲۴ ساعته باکتری، غلظت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و توسط لوپ با روش کشت خطی بر روی پلیت حاوی محیط کشت NA تلقیح گردید. سپس دیسک‌های خشک‌شده روی محیط کشت در فواصل مناسب قرار داده شدند. سپس به همراه هر پنج غلظت در یک پلیت حاوی باکتری، یک دیسک آغشته به آب مقطر به‌عنوان شاهد منفی گذاشته شد. در مرحله بعدی قطر

ساطع می کنند. این یون ها طی واکنش جانشینی، باندهای SH را در جداره میکروارگانیسم به باندهای SA-g تبدیل کرده، که نتیجه آن از بین رفتن میکروارگانیسم است (۵، ۸). همچنین در مورد جنبه نوآوری این مطالعه لازم به توضیح است که شکل نانوذره (کروی، ستاره ای، میله ای) و اندازه آن در چگونگی اثرات فیزیولوژیک آن بر سلول های زنده اثر می گذارد. با توجه به جستجوی مقالات مختلف دانشمندان مبنی بر اثرات مهاری نانوسیلور بر میکروبها، در این تحقیق برای اولین بار اثرات مهاری نانوسیلور با قطر ۴nm به شکل کروی و با غلظت های مزبور، بر روی رشد این باکتری بررسی شد.

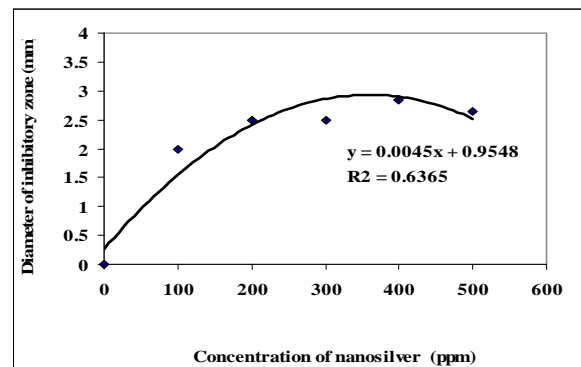
از جمله خصوصیات مهم ذرات نانوسیلور می توان به تأثیر بسیار زیاد و سریع، پایداری زیاد، سازگاری با محیط زیست، مقاومت در برابر حرارت، عدم ایجاد و افزایش مقاومت و سازگاری میکروارگانیسم اشاره نمود (۶، ۷). با توجه به خواص ضد باکتریایی نانوسیلور و عدم اطلاع دقیق از دوز و زمان تأثیر اختصاصی آنها بر *E. coli*، انجام آزمون های دقیق جهت پیگیری این تأثیرات ضروری به نظر می رسد. تحقیقات اخیر دانشمندان نشان می دهد زمانی که ذرات نانوسیلور با باکتری ها و قارچ ها مواجه شوند، سیستم تنفسی آنها را از کار می اندازند (۸)، که این عمل باعث می شود متابولیسم سلولی آنها مختل شده و از رشد سلول جلوگیری شود (۹). نانوذرات نقره با القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی (Apoptosis) نیز می تواند باعث تخریب تخصصی باکتری ها گردد (۷). از طرفی، تولید و نگهداری نانوذرات نقره احتمالاً خیلی ارزان تر و ساده تر از داروهای رایج است. همچنین نانوذرات نقره می تواند جایگزین مناسبی برای درمان های روتین توسط آنتی بیوتیک ها باشد (۱۰). لذا پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی، اشکال مختلف میله ای و ستاره ای با انواع قطرها از این نانوذره برای بررسی اثرات ضد میکروبی در این باکتری و باکتری های دیگر مدنظر قرار گیرد.

نتیجه گیری

با توجه به این که نانو تکنولوژی در شاخه های مختلف علوم، کاربردهای گوناگونی دارد. بنابراین تعمیم نتایج این مطالعه می تواند در درمان بسیاری از بیماری های منتقل شده توسط باکتری در زمینه پزشکی مفید واقع شود. همچنین با توجه به عوارض آنتی بیوتیک ها، می تواند جایگزین مناسبی برای آنها باشد.



نمودار شماره ۲: اندازه گیری قطر هاله ها در غلظت ۵۰۰ppm از نانوذرات نقره در زمانهای مختلف بعد از تیمار در باکتری *E. coli*



نمودار شماره ۳: اندازه گیری قطر هاله های عدم رشد در غلظت های مختلف از نانوذرات نقره ۳ روز بعد از تیمار در باکتری *E. coli*

بحث

با توجه به این نکته که *E. coli* در دسته باکتری های گرم منفی بوده و برای پذیرش نانوسیلورها با ممانعت بیشتری در مقایسه با باکتری های گرم مثبت مواجه می باشد، لذا دیرتر از باکتری های گرم مثبت به نانوذرات پاسخ می دهد. در این مطالعه دلیل اثرات نانوذرات نقره بر روی این باکتری گرم منفی با وجود مقاومت دیواره ای را می توان به کوچک بودن قطر یون های نقره و در نتیجه نفوذ پذیری بیشتر این نانوذرات نسبت داد. Moudgi و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که تأثیرات نانوذرات بر روی سلول های موجودات زنده به قطر، اندازه و شکل نانوذرات بستگی دارد (۴). نانوذرات نقره به دلیل اندازه کمی که دارند، سطح تماس بیشتری با فضای بیرون داشته و تأثیر بیشتری بر غشای سلول ها می گذارند (۷، ۱). نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده نشان می دهد مکانیسم مهار کنندگی نانوذرات نقره به عملکرد یون های نقره در محلول کلونیدی برمی گردد. همچنین دگرگون ساختن میکروارگانیسم به وسیله تبدیل پیوندهای SH به SA-g صورت می گیرد. در این مکانیسم ذرات نانونقره فلزی به مرور زمان یون های نقره از خود

References:

1. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager S JJ, Hofmann M. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. *Toxicological Sciences* 2005;88(2):412-419.
2. Arian S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. In Vitro Susceptibility Testing Methods for Caspofungin Against *Aspergillus* and *Fusarium* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(1):327-330.
3. Arian S, Rex JH. New Agents for Treatment of Systemic Fungal Infections. *Expert Opinion Emerging Drugs* 2000;5(2):135-160.
4. Moudgi BM, Roberts SM. Designing a Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part Nano-Interface in a Microfluidic Chip to Probe Living VI. Characterization of Nanoscale Particles for Cells: Challenges and Perspectives. *Toxicological Sciences USA* 2006;103:6419-6424.
5. Tahan C, Leung R, Zenner GM, Ellison KD, Crone WC, Miller CA. Nanotechnology and Improving Packaged Food Quality and Safety. Part 2: Nanocomposites. *Am J Physics* 2006;74(5):443-448.
6. Geho DH, Jones CD, Petricoin EF, Liotta LA. Nanoparticles: Potential Biomarker Harvesters. *Curr Opin Chem Biol* 2006;10(1):56-61.
7. Nakagawa YK, Shimazu M, Ebihara K. Nakagawa *Aspergillus Niger* Pneumonia with Fatal Pulmonary System. *J Infect Chemother* 1999;5(2):97-100.
8. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann M. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. *Toxicological Sciences* 2005;88(2):412-419.
9. Hussain SM, Javorina MK, Schrand AM, Duhart HM, Ali SF, John J. Schlager 2006. The Interaction of Manganese Nanoparticles with PC-12 Cells Induces Dopamine Depletion. *Toxicol Sci* 2006;92(2):456-463.
10. Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M, Hofmann T. Nanoparticles: Structure, Properties, Preparation and Behaviour in Environmental Media. *Ecotoxicology* 2008;17(5):326-343.