زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 6، شماره 2، پاییز و زمستان 1394

بررسی تأثیرخواص ضدمیکروبی نانو ذرات نقره، تیتانیوم دی اکسید بر دو گونه باکتری بیماری زا با منشا غذایی

پرستو رضایی[1]، روحاکسری کرمانشاهی[2*]

1- دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشگاه الزهرا، تهران

2- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه الزهرا، تهران

[*] **تهران، صندوق پستی 1993893973**

rkasra@alzahra.ac.ir

(دریافت مقاله: 92/11/6 پذیرش مقاله: 94/6/3)

چکیده- امروزه کاربرد نانوذرات در حذف باکتری‌های بیماری‌زا بسیار مورد توجه است. افزایش بیماری‌های غذایی سبب مشکلات اجتماعی و اقتصادی بسیاری شده است و از سویی دیگر پیشرفت مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، محققین را به سمت استفاده از نانوتکنولوژی سوق داده است. در این پژوهش به بررسی اثر ضد میکروبی برخی نانوذرات برای استفاده در بسته‌بندی‌های ضد میکروبی پرداخته شد.

در این پژوهش ابتدا نانوذره نقره را به روش سبز سنتز نموده و سپس با تعیین خصوصیات آن از طریق رنگ‌سنجی و زتا سایزر به اثر ضدمیکروبی آن بر علیه *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Listeria monocytogenes* از طریق تعیین MIC و MBC پرداخته شد. سپس این اثر در مورد نانوماده TiO2خریداری شده با اندازه 21 نانومتر نیز انجام گرفت.

نانوذرات نقره ساخته شده با اندازه 103 نانومتر با غلظت 1 میلی‌مولار، نانوذرات TiO2با اندازه 21 نانومتر با غلظت 1% دارای اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Listeria monocytogenes* 4b می‌باشند. نانوذرات نقره و تیتانیوم دی اکسید دارای اثر ضدمیکروبی بر علیه باکتریهای نامبرده بود. با توجه به ساخت نانوذره نقره به روش سبز و عدم وجود مواد شیمیایی و با توجه به غلظت‌های مجاز مورد استفاده از نانوذره نقره و TiO2 می‌توان گفت که از این مواد در کنترل آلودگی‌های میکروبی مواد غذایی در بسته‌بندی‌های ضدمیکروبی موادغذایی استفاده شود.

کلیدواژگان: نانوذرات نقره، TiO2، اثرات ضدمیکروبی، *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Listeria monocytogenes* 4b.

1- مقدمه

نانوتکنولوژی به ساختن مواد در سطح اتمی، برای بدست آوردن خصوصیات منحصربه فرد آن‌ها می‌پردازد که این خصوصیات می‌توانند برای کاربردهای مطلوب،

Archive of SID
www.SID.ir

مناسب باشند. نانوتکنولوژی می‌تواند بسیاری از مشکلات زیست پزشکی را حل کرده و سبب تحول در زمینه سلامت و داروسازی شود. [1].

افزایش بیماری‌های غذایی، همراه با مشکلات اجتماعی و اقتصادی حاصل و پیشرفت مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک-های مختلف، محققان و داروسازان را به سمت استفاده از نانوتکنولوژی سوق داده است [2].

نانوذرات خواص ضدمیکروبی خوبی از خود نشان میدهند که به دلیل دارا بودن نسبت سطح به حجم بالای آن‌هاست [3]. نانونقره می‌تواند بر روی باکتری‌های گرم مثبت، باکتری‌های گرم منفی، کپک و قارچ اثر کرده و آن‌ها را از بین ببرد [4].

دی‌اکسید تیتانیوم از اکسیدهای فلزی است که با دارا بودن قابلیت‌های مختلفی مانند اکسیداسیون قوی، زیست‌سازگاری و ویژگی‌های مورد قبول مکانیکی و خواص ضدمیکروبی یکی از نانوذراتی است که در گستره وسیعی از علوم کاربرد فراوان یافته است. TiO2 را به صورت افزودنی در بسته‌بندی‌های مواد غذایی استفاده می‌کنند. بیشترین دامنه مجاز آن از طرف سازمان FDA 1% می‌باشد [5].

لیستریا منوسایتوژنز و *استافیلوکوکوس اورئوس* از باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی بسیار رایج با بیماری‌های قابل توجه هستند. *لیستریا منوسایتوژنز* یک باکتری بیماری‌زا غذایی است و در یک محدوده وسیع دمایی از0/4تا 45 درجه سانتی‌گراد وهمچنین 4/4pH تا 4/9 رشد می‌کند و باعث مسمومیت غذایی می‌شود. پراکندگی گسترده در محیط، توانایی رشد در دمای یخچال، توانایی آغاز رشد در pH نسبتاً پایین و تحمل مقادیر زیاد نمک، این باکتری، یک باکتری بیماریزای خطرناک در غذا است [6]. *لیستریا منوسایتوژنز* می‌تواند عامل بالقوه مننژیت و گندخونی در انسان باشد. زنان حامله، نوزادان و افراد با نقص ایمنی مستعد ابتلا به عفونتهای این باکتری می‌باشند. همچنین افراد سالم ممکن است به این باکتری آلوده شوند. مهمترین روش انتقال این باکتری از راه مواد غذایی است [7]. *استافیلوکوکوس اورئوس* یک باکتری بیماری‌زای مهم با دامنه وسیعی ازعفونت‌های انسانی و حیوانی است که شامل بیماری‌های غذایی ناشی از تولید توکسین است. در بسیاری از کشورها، این باکتری پس از سالمونلا و *کلستریدیوم پرفرینجنس* به عنوان دومین باکتری از سه باکتری بیماری‌زایی است که موجب شیوع مسمومیت‌ها و عفونت‌های غذایی می‌شود. انسان‌ها و اغلب حیوانات اهلی به عنوان میزبانانی برای این باکتری هستند ولذا استافیلوکوک‌ها دراغلب یا تمام محصولات غذایی با منشأ دامی یا آن‌هایی که به طور مستقیم توسط انسان‌ها دستکاری می‌شوند، حضور داشته باشند [8].

با توجه به اثبات خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات، هدف از این مطالعه بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره و دی اکسیدتیتانیوم بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا با منشا غذا در جهت استفاده در بسته‌بندی‌های ضدمیکروبی مواد غذایی است.

2- مواد و روش کار

باکتری ***Staphylococcus aureus*** PTCC 1431 از کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و باکتری ***Listeria monocytogenes*** 4b از اانستیتو پاستور ایران تهیه شد. محیط‌های کشت و نیترات نقره مورد استفاده از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. تیتانیوم دی اکسید با اندازه 21 نانومتر از شرکت نانواسپار تک تهیه شد.

2-1- تهیه نانوذرات

الف) روش تهیه نانوذره نقره: در این پژوهش برای تهیه نانوذره نقره از روش سبز (احیا نمودن با مواد طبیعی)

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شد. به این ترتیب که 0/017 گرم نیترات نقره در 1 میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و به محلول 1% نشاسته در آب مقطر اضافه شد. بعد از انحلال کامل، به مدت 5 دقیقه در دمای 121 درجه سانتی‌گراد فشار 1 اتمسفر اتوکلاو نموده و برای بررسی ساخت نانوذره نقره از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS 9000cecil استفاده و با دستگاه زتا سایزر

(Malvern Instruments Ltd) اندازه نانوذره نقره ساخته شده مورد بررسی قرار گرفت [9].

ب) آماده نمودن نانوماده TiO2: نانوماده TiO2 با اندازه 21 نانومتر را به نسبت (w/v) 1% در آب مقطر استریل حل شد [10].

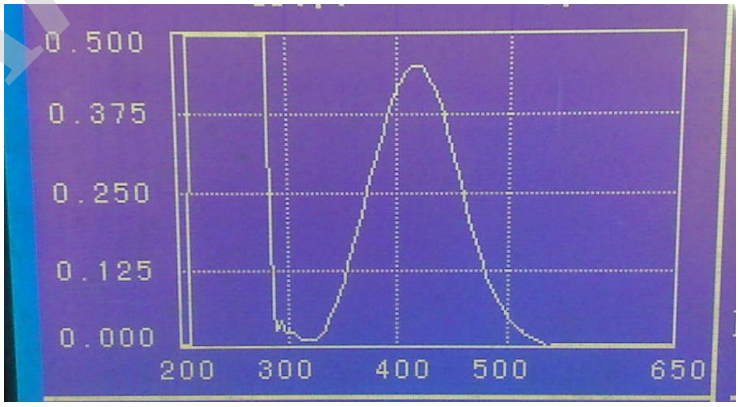
2-2- بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات بر روی باکتری‌های بیماری‌زا بامنشا غذایی

برای این مورد به بررسی کمترین غلظت بازدارنده نانوذرات (MIC) و کمترین غلظت کشنده (MBC) آن بر علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Listeria monocytogenes* 4b پرداخته شد. از نانوذرات ساخته شده جهت تعیین MIC سری رقت 10 تای در میکروتیتر پلیت تهیه و با کدورت سنجی چشمی به طور مقایسه‌ای با کنترل مثبت بر روی 0/01 نیم مک فارلند باکتری‌های نام برده بعد از 24 ساعت گرماگذاری در دمای 30درجه سانتی‌گراد پرداخته شد همینطور یک لوپ کامل از هر چاهک را در جهت بررسی MBC در محیط MHA کشت داده شد [11،10]. به ترتیب کنترل مثبت حاوی محیط MHB و باکتری‌های مورد نظر و کنترل منفی حاوی محلول نانوذره و محیط MHB بود.

3- نتایج

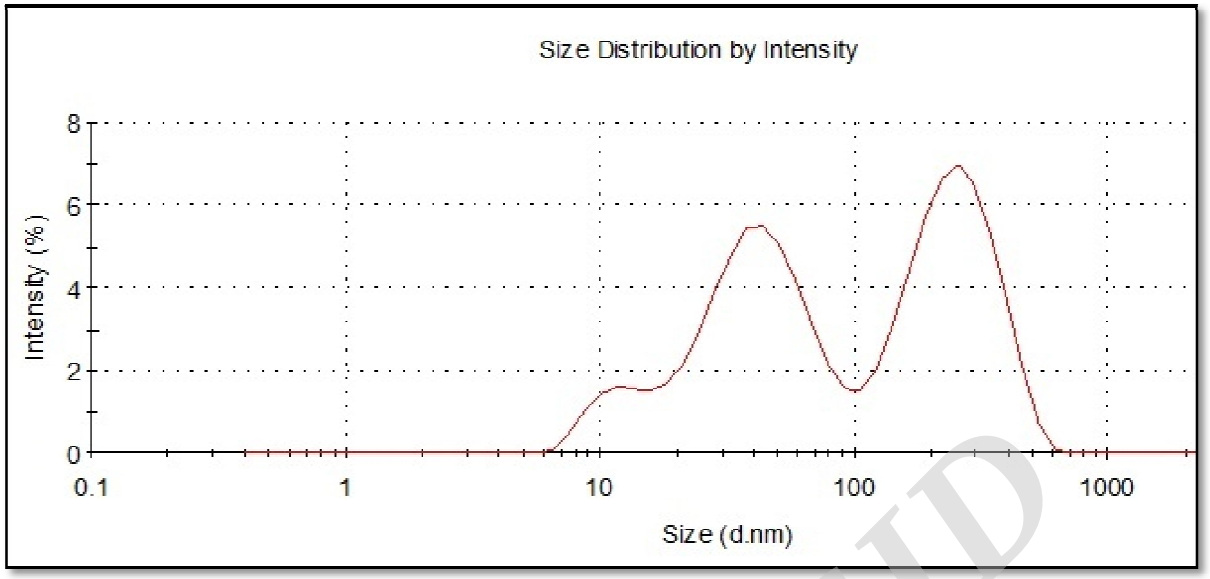
نقره در حالت عادی سفید رنگ و بعد از تشکیل نانوذره، به رنگ زرد درمی‌آید. طیف جذبی نانوذره نقره ساخته شده در شکل 1 نشان داد که در محدوده طول موج 650 تا 300 در طول موج 412 نانومتر دارای بیشترین جذب بوده است. اندازه نانوذره نقره تشکیل شده با استفاده از دستگاه زتاسایزر 102 نانومتر را نشان می‌دهد (شکل 2).

MIC, MBC نانوذرات نقره برای هر دو باکتری مورد نظر 1میلی‌مولار و برای تیتانیوم دی‌اکسید برای باکتری‌های *S.aureus* PTCC 1431، و برای باکتری *L.monocytogenes* 4b به ترتیب 1% و 0/5% گزارش شد (جدول‌های 1 و 2)



شکل 1 UV-vis نانو ذره نقره

Archive of SID
www.SID.ir



شکل 2 هیستوگرام توزیع اندازه نانو ذره نقره Z-Average(d-nm)=102.3

جدول 1 MBC وMIC نانوذره نقره با غلظت 4 میلی‌مولار بر روی دو گونه باکتری بیماری‌زا در دمای 30 درجه سانتی‌گراد

باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذا	MIC	MBC
***S.aureus* PTCC 1431**	1 میلی‌مولار	1 میلی‌مولار
***L.monocytogenes* 4b**	1 میلی مولار	1 میلی‌مولار

جدول 2 MBC وMIC نانوماده TiO2 (با غلظت 1%) بر روی دو گونه باکتری بیماری‌زا دمای 30 درجه سانتی‌گراد

باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذا	MIC	MBC
***S.aureus* PTCC 1431**	%1	%1
***L.monocytogenes* 4b**	%0/5	%0/5

4- بحث

در این پژوهش، از نشاسته برای ساخت نانوذره نقره استفاده شد که نشاسته به علت داشتن انتهای آزاد آلدهیدی به عنوان احیا کننده و به علت ساختاری که دارد می‌تواند به عنوان پایدار کننده عمل کند. نانوذره نقره ساخته شده دارای توزیعی از نانوذرات با میانگین اندازه 102/4نانومتر را نشان می‌دهد که غلظت 1 میلی مولار به عنوان غلظت MIC وMBC برای باکتری‌های بیماری‌زای نامبرده به دست آمد. Vigneshwaran و همکاران در سال 2006 با استفاده از نشاسته نانوذرات نقره در اندازه 40 نانومتر ساختند. تفاوت در اندازه نانو ذرات نقره را می‌توان به تفاوت در نوع نشاسته و نیترات نقره بکار برده شده و شرایط محیطی (اتوکلاو نمودن) اشاره نمود. مقاله‌های بسیاری اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره را بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به اثبات رسانده‌اند [9].

اثرات ضد میکروبی نانو ماده TiO2 بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا توسط برزگر و همکاران در سال 1389 انجام شد. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که در حضور غلظت 1/5% نانو ماده TiO2 مرگ سلولی باکتری‌های *اشریشیاکلی* و

Archive of SID
www.SID.ir

استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب بعد از 16 و 24 ساعت فرا می‌رسد. نانو ماده مورد استفاده این پژوهش‌گران 60 نانومتر بوده اما نانوماده کاربردی مورد استفاده در این پژوهش 20 نانومتر بوده از این رو، غلظت 1% نانوماده TiO2 در مدت زمان 24ساعت سبب حذف کامل دو گونه ی باکتری بیماری‌زا با منشأ غذا شده است. نانو ماده TiO2 سبب پراکسید شدن ترکیبات فسفولیپیدی حلقوی غشا می‌شود و نفوذپذیری غشا را دچار اختلال می‌کند [10].

اندازه نانوذرات در اثر ضدمیکروبی آن‌ها بسیار تأثیرگذار است و هرچه این اندازه کوچک‌تر باشد، اثر ضدمیکروبی بیشتری از خود نشان می‌دهد به علاوه نوع باکتری نیز در حساسیت به نانوذرات مؤثر است [12].

نانوذره نقره ساخته شده و نانو ماده TiO2 با غلظت 1% اثرباکتری‌کشی بالایی بر علیه دو گونه باکتری بیماری‌زا با منشأ غذا از خود نشان می‌دهند.

اثر ضدمیکروبی نانوذرات را به طورکلی در دو بخش قابل بررسی است:

1- تأثیر روی دیواره سلولی و بخش خارجی سلول باکتری

2- ورود به سلول و تأثیر روی بخش‌های درونی مختلف سلول باکتری.

در قسمت اول نانوذرات به علت بار الکترونی مثبت جذب بار منفی سطح خارجی سلول باکتری می‌شوند. این اتصال هم سبب بر هم زدن تعادل الکترولیتی باکتری و هم می‌تواند روی چرخه تنفسی سلول‌های باکتری تأثیر-گذار باشد. این نانوذرات می‌توانند روی پمپ‌های شارش (efflux) تأثیر گذاشته، به دنبال آن حلالیت و سمیت مواد، پتانسیل اکسیداسیون احیای یون‌های فلزی، ترکیب و ته‌نشین‌سازی فلزات در سلول باکتری دچار اختلال می‌شود. در مطالعه که توسط Mirzajani و همکاران در سال 2011 صورت گرفت نشان دادند که با اضافه نمودن نانوذره نقره در اندازه 20 نانومتر به محیط باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، میزان اسیدمورامیک آزاد شده در محیط بالا می‌رود. نانوذره نقره توانایی برهم زدن ساختار اول و دوم دیواره سلولی و تأثیرگذاری روی باندهای هیدروژنی و ساختار آلفا هلیکس را دارد. در این مطالعه مشخص شد که نانوذره نقره با بخش گلیکانی و شاخه‌های پپتیدی پپتیدوگلیکان برهم‌کنش نشان داده و سبب رهایی اسید مورامیک از پپتیدوگلیکان دیواره سلولی و در نتیجه ایجاد حفره می‌کند [13].

نانوذرات به علت توانایی اتصال به گروه‌های سولفیدریل، کربوکسیل و فسفات روی آنزیم‌های وپروتئین‌های چرخه تنفسی تأثیر دارد و سبب تغییر کانفورماسیون آن‌ها شده و به دنبال آن‌ها این چرخه ناکارامد می‌شود. [14].

در قسمت دوم اثرگذاری نانوذرات روی پروتئین‌ها و آنزیم‌هایی که نقش اساسی در رشد سلول دارند،DNA باکتری‌ها به علت وجود گروه فسفات به نانوذرات متصل گشته و در نتیجه آن را از حالت انعطاف به حالت سخت تبدیل و چرخش و حرکت DNA دچار اشکال شده و در نتیجه عملکردهایی مانند همانندسازی و رونویسی تحت تأثیر واقع می‌گردد. نانوذرات هم‌چنین در داخل سلول سبب ایجاد رادیکال‌های آزاد و اکسیژن فعال می‌کنند که این مواد اثر ضدمیکروبی دارند [15].

Malakotian و همکاران در سال 2010 نشان دادند باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا منوسایتوژنز* حساسیت بیشتری نسبت به نانوذره نقره و تیتانیوم دی اکسید نسبت به *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس* نشان می‌دهند [16]. می‌توان گفت باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذای مورد نظر، به علت اینکه هوازی اختیاری هستند و نسبت به باکتری‌های میکروآئروفیل بی هوازی، به اکسیژن بیشتری نیازمندند، و از طرف دیگر این باکتری‌ها تند رشدتر هستند، پس حساسیت بیشتری نسبت به نانوذرات دارند. باکتری‌های

Archive of SID
www.SID.ir

تند رشد نسبت به باکتری‌های کندرشد حساسیت بیشتری را نشان می‌دهند. چرا که باکتری‌های کند رشد زمان بیشتری در جهت بیان ژن‌های مقاوم به استرس را دارند. عواملی چون فاکتورهای مربوط به میکروارگانیسم (جنس، گونه و سن سلول)، فاکتورهای مربوط به نانوذرات (نسبت سطح به حجم، اندازه، بار و نوع نانو ذره) و حتی فاکتورهای محیطی همچون دما، زمان و pH محیط روی اثر ضدمیکروبی نانوذرات مؤثر هستند.

5- نتیجه‌گیری

با توجه به اثر ضدمیکروبی که نانوذرات نقره و تیتانیوم بر علیه باکتری‌ها با منشا غذا از خود نشان می‌دهند، می‌توان برای کنترل آلودگی‌های میکروبی مواد غذایی در بسته‌بندی‌های ضدمیکروبی موادغذایی استفاده کرد.

6- منابع

[1] Mritunjai S., Shinjni S., Prasad S., Gambhir S.I. (2008). Nanothehnology in Medicine and Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles. Journal of Nanomaterials and Biostrucres, 3, 115-122.

[2] Mahendra R., Alka Y. and Aniket .G. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Journl Biotechnology Advances, 27, 76-83

[3] Chun N., CMHea L. (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. Biological Inorganic Chemistry. 12: 527-34.

[4] Klasen H.J. (2000). Ahistorical review of the use of silver in the treatment of burn. Early use Burns. 26: 131-8.

[5] STAN C. Codex General Standard for Food Additives (GSFA). (2008). Online Database available at: http://www. codexalimentarius.net/gsfaonline/index.html. 197-2007.

[6] Zapico P., Medina M., Gaya P. and Nuñes M. (1998). Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. Food Microbiology. 40: 35-42.

[7] Linnan MJ ML, Lou XD. (1998). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. Medical. 1: 319-823.

[8] Linnan MJ1, Mascola L., Lou XD., Goulet V., May S., Salminen C., Hird D.W., Yonekura ML., Hayes P, Weaver R. (2005). Study of behavior of staphylococcus aureus during the manufacture and and ripening of Iranian White cheese. Thesis of food hygiene (PhD) Azad University of Tehran. 237: 60-70.

[9] Vigneshwaran RPN, Balasubramanya R., Varadarajan R. (2006). A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. Carbohydrate Research .341: 2012–8.

[10] برزگری ف.، جاوید آ.، رضایی زارچی س. (1389)، بررسی اثر ضدباکتریایی نانو ماده TiO2 بر روی اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اروئوس، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهیدصدوقی یزد، شماره 1، 39-42.

[11] Mayur Valodkar AB, Jayshree Pohnerkar, Mukta Mohan, Sonal Thakore. (2010). Morphology and antibacterial activity of carbohydrate-stabilized silver nanoparticles. Carbohydrate Research 345: 1767–73.

[12] Mayur V, Jayshree P., Mukta M., Sonal T. (2010). Morphology and antibacterial activity of carbohydrate-stabilized silver nanoparticles. Carbohydrate Research 345: 1767–73.

[13] Clara S., Donatella D., Sossio C. (2011). Food packaging based on polymer nanomaterials. Journal of Progress in Polymer Science. 2: 1-17.

[14] Mirzajani F., Aliahmadi A., Esmaeili M. s.J .(2011). Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. Research in Microbiology. 162:542-9.

[15] Panyala N.M, Penamendez E.Havel.M.J. (2008). Silver or nanoparticles:A hazardous threat to environment and human health? Journal Applied Biomedical.6:117-122.

[16] Bottero J., Auffan M., Mouneyrac C., Botta C., Labille J., Masion A. .(2011). Manufactured metal and metal-oxide nanoparticles: Properties and perturbing mechanisms of their biological activity in ecosystems. 343:168−176.

[17] ملکوتیان محمد (1389). تعیین و مقایسه نانوذرات درحذف باکتری‌های گرم مثبت و منفی از فاضلاب شهری. دانشکده بهداشت یزد، 1:9-11.

Archive of SID
www.SID.ir