

سنتر نانو ذرات گرافن و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن بر اشیریشیاکلی و استافیلوکوک

اورئوس

طاهره هاشمی^۱، نادر حبیبی^{۱*}، هادی گلی^۱ و احسان هاشمی^۲

^۱ ایران، سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، گروه علوم و صنایع غذایی

^۲ ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، گروه زیست‌فناوری دامی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۲۱

چکیده

در چند سال اخیر استفاده از نانو ذرات در حوزه‌هایی چون پزشکی، دارو، کشاورزی، صنعت و محیط زیست توسعه فراوانی یافته است. در پزشکی انواع مختلف این نانو ذرات برای مقاصد چون درمان سرطانها، زخمها، عفونتها و نیز انتقال دارو به کار می‌روند. در این میان، گرافن (Graphene) یک ماده جدید دو بعدی است که به دلیل خصوصیات ویژه چون سطح مقطع بالا، رسانایی الکتریکی و حرارتی بالا، کشش مکانیکی و سازگارپذیری و هزینه کم تولید در مقیاس بالا کاربردهای زیادی در الکترونیک و پزشکی پیدا کرده است. برای نمونه، امروزه از نانو ذرات گرافن در رهائش دارو، حسگرهای زیستی، تصویر برداری و ترکیبات ضد میکروبی استفاده می‌شود. گرافن از پودر گرافیت طبیعی با استفاده از روش هامر سنتز شد. سپس سمیت این نانوذره در غلظتهای ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر محیط کشت باکتری بر روی باکتریهای گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس و سویه گرم منفی اشیریشیاکلی بررسی شد. نتایج آنالیزهای دستگاهی AFM نشان داد که ضخامت ورق تک لایه ۰/۵ و پس از احیاء گرافن به ۱/۴ نانومتر تغییر کرده است. افزایش ضخامت در هر دو طرف ورق rGO به خوبی دیده می‌شود. نتایج اثر سمیت گرافن و گرافن احیاء شده بر باکتریها نشان داد که گرافن و گرافن احیاء شده در غلظتهای ۱۰ و ۱۰۰ برای باکتریها سمیت داشته و میزان رشد باکتریها را کاهش داده است.

واژه‌های کلیدی: سنتر نانوذره، گرافن اکسید، گرافن احیاء شده، ضد میکروبی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۸۷۳۰۳۹۹، پست الکترونیکی: Naderhabibi45@yahoo.com

مقدمه

سازگارپذیری و هزینه کم تولید در مقیاس بالا کاربردهای زیادی در الکترونیک و پزشکی پیدا کرده است (۷ و ۸). در چند سال اخیر استفاده از نانوذرات در صنعت غذایی افزایش چشم‌گیری داشته است. استفاده از نانوذراتی که قدرت محافظتی بالایی دارند و همچنین خواص ضد میکروبی دارند رواج یافته است (۶، ۲۵، ۲۶ و ۲۷). از نانوذرات جدیدی که تازگی به عرصه‌های علمی و صنعتی وارد شده می‌توان به گرافن اشاره کرد. گزارشات نشان می‌دهد به علت برهمکنش بیوفیزیکی بین نانوذرات

در چند سال اخیر استفاده از نانو ذرات در حوزه‌هایی چون پزشکی، دارو، کشاورزی، صنعت و محیط زیست توسعه فراوانی یافته است. در پزشکی انواع مختلف این نانو ذرات برای مقاصد چون درمان سرطانها، زخمها، عفونتها و نیز انتقال دارو به کار می‌روند (۱، ۳، ۵، ۶ و ۱۵). گرافن (Graphene) یک ماده جدید دو بعدی است که به دلیل خصوصیات ویژه چون سطح مقطع بالا، رسانایی الکتریکی و حرارتی بالا، کشش مکانیکی و

۵ ساعت مخلوط گردید. سپس ۰/۵ گرم NaNO_3 به درون محلول اضافه گردید و در یک حمام یخ به مدت ۱۰ دقیقه همزده شد، پس از این ۳ گرم KMnO_4 به آهستگی به محلول اضافه و به مدت ۲ ساعت استریل گردید. پس از این مرحله ۴۰ میلی لیتر آب دیونیزه به آن اضافه و ۳ میلی لیتر H_2O_2 با ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل شده و به محلول اضافه گردید. اسید و نمکهای باقی مانده در محلول با استفاده از فیلتر با غشای انودی حذف گردیدند.

احیای نانوذرات گرافن: به منظور احیای محلول گرافن اکسید به روش هیدرو ترمال، ابتدا pH محلول را به ۹ رسانده. سپس ۱۰۰ میلی لیتر از محلول گرافن اکسید را در داخل یک اتوکلاو هیدرو ترمال حاوی یک اطاقک تفلونی ۱۵۰ میلی لیتری قرار داده، احیای هیدرو ترمالی به مدت ۵ ساعت در ۱۲۰ درجه سانتی گراد صورت گرفت.

آنالیز آماری: پس از ثبت داده های به دست آمده از انجام آزمایشات آزمون تجزیه واریانس برای داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (ver. 19) استفاده گردید. مقایسه بین سطوح میانگینها با استفاده از آزمون مقایسه میانگین دانکن انجام شد. سطوح معنی دار بودن در سطح ۹۵ درصد ($P \leq 0.05$) انجام شد. تمام آزمایشات در ۳ تکرار انجام شدند.

نتایج

نتایج حاصل از سنتز گرافن: شکل ۱ نتایج حاصل از AFM را نشان می دهد و همپوشانی صفحات گرافن به وضوح قابل تشخیص است و سایز ذرات را نشان می دهد. شکل ۱ نشان می دهد که ضخامت ذرات گرافن حدوداً ۰/۸ نانومتر است.

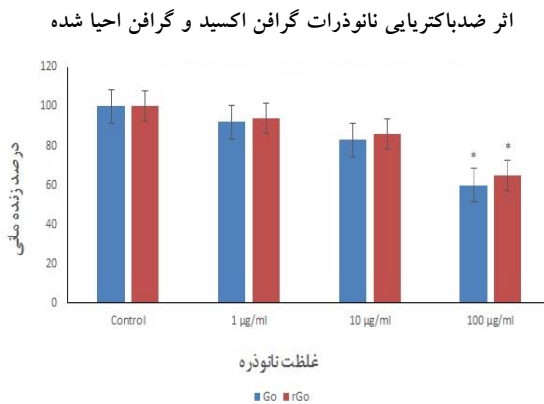
تأثیر نانوذره گرافن و گرافن اکسید بر زنده مانی اشریشیاکلی: پس از سنتز نانوذرات اثر ضد باکتری آنها در ۳ غلظت متفاوت ۱،۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی باکتری اشریشیاکلی به عنوان یک باکتری گرم منفی

و باکتریها، نانوذرات با آسیب به دیواره سلول و وارد شدن به سلول باکتریایی منجر به مرگ باکتری می شوند. با این وجود تا به حال مکانیسم دقیق سمیت نانوذرات ناشناخته مانده است (۲۲، ۲۳ و ۲۴). با توجه به تحقیقات و مطالعات مشخص شده که اندازه و پوشش سطحی نانوذرات بر خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات تأثیر دارند. با این حال شناخت مکانیسم دقیق باکتری کشی نانوذرات برای استفاده از نانوذرات در درمان الزامی می باشد. یونانیان باستان از کلویید نقره به عنوان یک ماده ضد باکتری استفاده می کردند (۱۷ و ۲۴). برعکس داروهای آنتی بیوتیکی، به علت اینکه نقره چندین نقطه هدف در سلول باکتری دارد باکتریها نمی توانند به آسانی مقاومت پیدا کنند. بنابراین این نانوذرات در پوشش تجهیزات پزشکی و برخی کالاهای بهداشتی دیگر استفاده می شود (۹). همچنین گزارش شده است مکانیسم خاصیت ضد باکتریایی نانوذره به علت شکستن DNA و همچنین غیر فعال کردن پروتئینهای عملکردی باکتری می باشد (۱۲). برعکس طلا به خاطر خاصیت عنصریش در اغلب سیستمهای بیولوژیکی چه در باکتریها، حیوانات و یا انسان، سمیت پائینی دارد (۱۹). تا به حال مطالعات زیادی بر روی اثر نانوذرات بر باکتریها انجام شده است اما اثر نانو ذره گرافن بر روی باکتریها کمتر مطالعه شده و همچنین مطالعات کافی بررسی مکانیسم اثر دقیق نانوذرات بر روی باکتریها انجام نشده است. لذا در این راستا با توجه به خصوصیات منحصر به فرد گرافن برای شناخت برهمکنشهای نانوذره گرافن با باکتریهای گرم مثبت و منفی و خاصیت باکتری-کشی این نانوذره بررسی گردید.

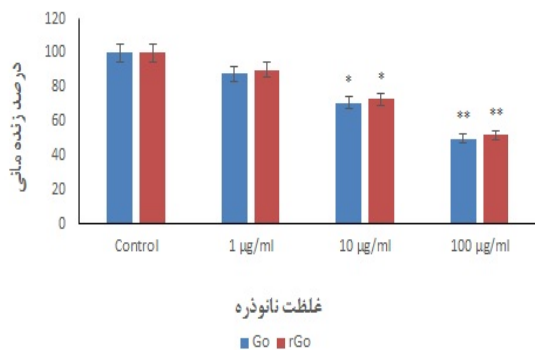
مواد و روشها

سنتز نانوذرات گرافن: به منظور سنتز گرافن از پودر گرافیت با استفاده از روش تغییر یافته Hummer استفاده شد (۱۴). به طور خلاصه ۰/۵ گرم از پودر گرافیت را با ۲۰ میلی لیتر از H_2SO_4 در ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت

اثر ضد باکتریایی فیلمهای تهیه شده از گرافن و گرافن تهیه شده: در این آزمایش اثر ضد باکتریایی گرافن فیلم بر روی باکتری اشیریشیاکلی و استافیلو کوک اورئوس بررسی شد تا مشخص شود که گرافن هم در فاز جامد و هم مایع اثر ضد باکتریایی دارد. همان طور که در شکل ۴ مشاهده می‌کنید فیلمهای تهیه شده از گرافن و گرافن احیاء شده اثرات ضد باکتری خود را نسبت به گروه کنترل نشان دادند.



شکل ۲- تأثیر ضد باکتری گرافن اکسید و گرافن احیاء شده در ۳ غلظت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر باکتری اشیریشیاکلی

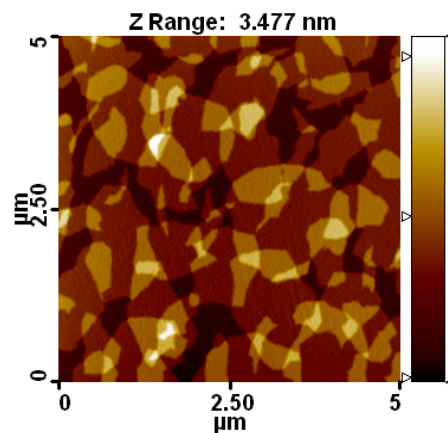


شکل ۳- تأثیر ضد باکتری گرافن اکسید و گرافن احیاء شده در ۳ غلظت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر باکتری استافیلو کوک اورئوس

بحث و نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اثر ضد باکتری گرافن وابسته به غلظت بوده که نتایج تحقیقات پیشین (۳) را تأیید می‌کند. تحقیقات پیشین نشان دادند که نانوذرات با داشتن خواص به خصوص می‌توانند اثرات ضدمیکروبی داشته

که یکی از باکتریهای اصلی فساد غذایی است بررسی شد. همان طور که در شکل ۲ نتایج نشان داد که گرافن اکسید و گرافن احیاء شده رشد باکتری را کاهش می‌دهند ولی این کاهش فقط در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر محیط کشت نسبت به گروه کنترل معنی دار بوده است.



شکل ۱- نمودار حاصل از نتایج آنالیز AFM

تأثیر نانوذره گرافن و گرافن اکسید بر زنده مانی استافیلو کوک اورئوس: اثر ضد باکتری نانوذرات گرافن و گرافن احیاء شده در ۳ غلظت متفاوت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی باکتری استافیلو کوک اورئوس نیز بررسی شد. استافیلو کوک اورئوس یک باکتری گرم مثبت است که این باکتری نیز از باکتریهای اصلی فساد غذایی است. همان طور که در شکل ۳ نتایج نشان داد که گرافن اکساید و گرافن احیاء شده رشد باکتری را در غلظتهای ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به طور معنی داری کاهش می‌دهند. این کاهش در گرافن و گرافن احیاء شده در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر (۷۱±۵ و ۷۳±۶ به ترتیب) در سطح ۹۵ درصد معنی دار بود ($P \leq 0.05$). اما در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گرافن (۵۰±۴) و گرافن احیاء شده (۵۲±۴) در سطح معنی دار ۹۹ درصد میزان رشد استافیلوکوک اورئوس را نسبت به گروه کنترل کاهش دادند ($P \leq 0.01$).

و قدرت بالا در ایجاد برهمکنش با دیگر ترکیبات پیشنهاد می‌شود با اصلاح سطح گرافن و تثبیت دیگر مواد باکتری کش مانند عصاره های گیاهی که در چند سال اخیر خاصیت باکتری کشی آنها مشخص شده مانند عصاره زعفران (۲) و دیگر ترکیبات طبیعی خاصیت باکتری کشی این نانوذره را افزایش و میزان باکتری کشی آن بررسی شود.

تشکر و قدردانی

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنجندج و دانشگاه صنعتی شریف به خاطر کمک در انجام آزمایش تشکر و قدردانی می‌گردد.

باشند (۱، ۳ و ۱۵). گرافن که یکی از نانوذرات جدید نانوتکنولوژی است با داشتن لبه های تیز با نفوذ در دیواره باکتری اثرات ضد باکتری خود را نشان می‌دهد. همچنین یکی از مکانیسمهای دیگر اثر ضد باکتری گرافن به علت ایجاد استرس اکسیداتیو در محیطهای زنده است (۳ و ۱۵). این ذره با ایجاد استرس اکسیداتیو باعث مرگ باکتریها می‌شود. اخوان و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که گرافن با داشتن لبه های تیز به داخل باکتری نفوذ کرده و اثر ضد میکروبی خود را نشان می‌دهد (۳). همچنین این محققان نشان دادند که گرافن اثر ژنوتوکسیسیته نیز بر روی باکتری دارد. با توجه به اثر سایز ذره بر سمیت سلولی (۱۰) پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده اثر سایز نانوذره گرافن بر روی خاصیت باکتری کشی این نانوذره بررسی شود. همچنین باتوجه به صفحه های بودن گرافن

منابع

- ۱- امجدی، ف.، گلستانی ایمانی، ب.، کریمی، ف. ۱۳۹۴. بررسی اثرات نانوذرات اکسید مس روی ژنوم باکتری اشریشیاکلی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD. مجله پژوهشی سلولی مولکولی. ۲۸ (۴): ۴۸۷-۴۷۵.
- ۲- افشار محمدیان، م.، کردی، ش.، مشهدی نژاد، ا. ۱۳۹۵. بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره کلالة و گلبرگ گونه های مختلف زعفران. مجله پژوهشی سلولی مولکولی. ۲۹ (۳): ۲۷۳-۲۶۵.
- 3- Akhavan, O.; Ghaderi, E., 2010. Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria. ACS Nano, 4, 5731-5736.
- 4- Akhavan, O.; Ghaderi, E., 2013. Differentiation of Human Neural Stem Cells into Neural Networks on Graphene Nanogrids. J. Mater. Chem. B, 1, 6291-6301.
- 5- Akhavan, O.; Ghaderi, E.; Aghayee, S.; Fereydooni, Y.; Talebi, A., 2012. The Use of a Glucose-Reduced Graphene Oxide Suspension for Photothermal Cancer Therapy. J. Mater. Chem. 22, 13773-13781.
- 6- Arfat, Y.A., Benjakul, S., Prodpran, T., Sumpavapol, P., Songtipya, P., 2014. Properties and Antimicrobial Activity of Fish Protein Isolate/Fish Skin Gelatin Film Containing Basil Leaf Essential Oil and Zinc Oxide Nanoparticles. Food Hydrocolloids 41, 265-273.
- 7- Azeredo, H.M.C.D., 2009. Nanocomposites for Food Packaging Applications. Food Research International 42, 1240-1253.
- 8- Brayner, R., Ferrari, N., Djediat, S. 2006. Toxicological Impact Studies Based on Escherichia coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. Nano Letter 6, 4-14.
- 9- Bosetti, M., Mass, A., Tobin, E., Cannas, M. 2002. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. Biomaterials 23:887-892.
- 10- Deckers, A., Martin, M., Eherlin, N., Gouget, B. 2009. Size-, Composition- and Shape-Dependent Toxicological Impact of Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes toward Bacteria 43, 21, 2009. Environmental Science & Technology.
- 11- Feng, QL., Wu, J., Chen, G., Cui, F., Kim, T., Kim, J. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J Biomed Mater Res, 52:662-668.
- 12- G. Miler., R, Sengen., 2008. Nanotechnology Used for Food Packaging and Food Contact

- Materials. *Nanotechnology in Food and Agriculture* 12, 14-16.
- 13- Hummers, W. S and Offeman R. E., 1958. Preparation of graphite oxide, *J. Am. Chem. Soc.* 80, 1339.
- 14- Hajipour, M.J., Katharina, M., Jimens, D., Parak, W., Mahmoudi, M. 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in biotechnology* 30, 501-513.
- 15- Hasheni, E., Akhavan, O., Shamsara, M. 2014. Cyto and genotoxicities of graphene oxide and reduced graphene oxide sheets on spermatozoa. *RSC Advances* 4, 27213-27223.
- 16- Hipler, U., Elsner, P. 2006. Biofunctional textiles and the skin. 2006. In *Curr Probl Dermatol*. Basel, Karger; 33, 144-151.
- 17- Hsiao, M., Chen, S., Shieh, D., Yeh, C. 2006. One-pot synthesis of hollow Au₃Cu₁ spherical-like and biomineral botallackite Cu₂ (OH)₃Cl flowerlike architectures exhibiting antimicrobial activity. *J Phys Chem B* 2006, 110:205–210.
- 18- Jin, Y., Zhao, X. 2008. Cytotoxicity of photoactive nanoparticles. In *Safety of Nanoparticles: From Manufacturing to Medical Applications*. Edited by Webster T. Science & Business Media LLC, 233, 19-31.
- 19- Kanmani, P., Rhim, J.-W., 2014. Physicochemical Properties of Gelatin/Silver Nanoparticle Antimicrobial Composite Films. *Food Chemistry* 148, 162-169.
- 20- Kanmani, P., Rhim, J.-W., 2014. Properties and Characterization of Bionanocomposite Films Prepared with Various Biopolymers and ZnO Nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 106, 190-199.
- 21- M. Rai, A. Yadav, A. Gade., 2009. Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials, *Biotechnology Advances* 27 (1) 76–83.
- 22- Majeed, K., Jawaid, M., Hassan, A., Bakar, A.A., Khalil, H.P.S.A, Salema, A.A., Inuwa, I. 2013. Potential Materials for Food Packaging from Nanoclay/Natural Fibres Filled Hybrid Composites. *Materials and Design* 46, 391-410.
- 23- Priester, J., Stoimenov, P., Mielke, R., Webb, S. 2009. Effects of soluble cadmium salts versus CdSe quantum dots on the growth of planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Sci Technol* 43:2589–2594.
- 24- Rhim, J. W., Park, H.-M., Ha, C. S., 2013. Bio-Nanocomposites for Food Packaging Applications. *Progress in Polymer Science* 38, 1629-1652.
- 25- Simon-Deckers, A., Loo, S., Mayne-L'hermite, M., Herlin-Boime, N., Menguy, N., Reynaud, C., Gouget, B., Carrière, M. 2009. Size-, composition- and shapedependent toxicological impact of metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes toward bacteria. *Environ Sci Technol*, 43:8423–8429.
- 26- Sondi I, Salopek-Sondi B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*, 275:177–182.
- 27- Zhou, Y., Kong, Y., Kundu, S., Cirillo, J.D., Liang, H. 2012. Antibacterial Activities of Gold and Silver Nanoparticles against *Escherichia Coli* and *Bacillus Calmette-Guérin*. *Journal of Nanobiotechnology*, 10:19.

Synthesis of graphene nanoparticles and its antibacterial effects on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Hashemi T.¹, Habibi N.¹, Goli H.¹ and Hashemi E.²

¹ Dept. of Food Science & Technology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, I.R. of Iran.

² Dept. of Animal Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Recently, the application of nanoparticles has been extended in areas such as medicine, drug, agriculture, industry and environment. In medicine, different types of these nanoparticles have been applied in therapy of cancers, wounds, infections, and also drug delivery. Among these, graphene is a new 2-dimensional material with special properties like high surface area, high electrical and thermal conductivity, mechanical, biocompatibility and low cost in large scale production. For example, today, graphene nanoparticles are used for drug delivery, photothermal cancer therapy, biosensors, biocompatible scaffolds, bioimaging, and anti-microbial components. Graphene oxide was synthesized from natural graphite powder according to Hammer's modified method. Then, bacterial toxicity of synthesized graphene was evaluated in 1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of *E. coli* and *staphylococcus aureus*. The AFM analysis showed that thickness of graphene sheets was 0.5 nm and after reduction reached to 1.4 nm. Our result showed that, antibacterial properties of graphene and reduced graphene were highly concentration depended and in 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ significantly decreased bacterial growth rate.

Key words: Nanoparticle synthesis, Graphene oxide, Reduced Graphene, Antibacterial