

بررسی خواص آنتی باکتریال سطوح دارای پوشش نانو ذرات نقره زیست سنتز شده با قارچ فوزاریوم اگریسپوروم و باکتری/اشرشیا کلی

محمد حسن غلامی شعبانی^۱، افشین ایمانی^۱، محمد چمنی^۲، مهدی رزاقی ابیانه^۳، غلامحسین ریاضی^۴، محسن چپانی^۵،

سمانه خادمی^۵، عظیم اکبرزاده^{۶*}

^۱ کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

^۲ استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

^۳ دانشیار، بخش قارچ شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^۴ دانشیار، بخش بیوفیزیک، بیوشیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۵ کارشناس ارشد، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^۶ استاد، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: نانو ذرات نقره به دلیل داشتن خواص آنتی باکتریال کاربردهای زیادی از جمله در صنایع نساجی، سرامیک های بهداشتی، تصفیه آب، رنگ، کشاورزی، دامپروزی و در کامپوزیت های پلیمری به منظور کاربردهای صنعتی و خانگی به عنوان مثال در بدنه داخلی یخچال، انواع فیلترهای آب و هوا، ظروف پلاستیکی و غیره دارند. هدف از این تحقیق استفاده از قارچ فوزاریوم اگریسپوروم و باکتری/اشرشیا کلی برای تولید نانو ذرات نقره می باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق به منظور بررسی خواص آنتی باکتریال کلوئیدهای نقره تولید شده به وسیله دو میکروارگانیسم از روش دیسک نفوذی استفاده گردید. برای بررسی اندازه و مورفولوژی نانو ذرات نقره حاصل، از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده شد.

یافته ها: وجود نانو ذرات نقره در کلوئید حاصل با استفاده از طیف سنجی نور فرابنفش - مرئی به اثبات رسید. میانگین سایز نانو ذرات بدست آمده از قارچ فوزاریوم اگریسپوروم کوچک تر از میانگین آن در باکتری/اشرشیا کلی بود.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که خواص آنتی باکتریال سطوح پوشیده با کلوئید نانو ذرات نقره سنتز شده به کمک قارچ فوزاریوم اگریسپوروم به دلیل کوچکتر بودن اندازه نانو ذرات نسبت به کلوئید حاصل از باکتری اشرشیا کلی مطلوب تر می باشد.

کلمات کلیدی: نانو ذرات نقره، آنتی باکتریال، اشرشیا کلی، فوزاریوم اگریسپوروم

مقدمه

پدیده بر خصوصیات ذره در حالت انزوا و بر تعاملات آن با دیگر مواد اثر می گذارد. به محض آن که ذرات به اندازه کافی کوچک شوند، شروع به بروز رفتار مکانیک کوانتومی می کنند. خواص نقاط کوانتومی مثالی از این دست است. این نقاط گاهی اتم های مصنوعی نامیده می شوند، چرا که الکترون های آزاد آن ها مشابه الکترون های محبوس در اتم ها، حالات گسسته و مجازی از انرژی را اشغال می کنند. به طور کلی با توجه به خواص منحصر به فرد نانو ذرات، به کارگیری روش های تولیدی مناسب به منظور دستیابی به نانو ذرات با خواص مطلوب، هزینه کمتر و محافظ محیط زیست از چالش های مهم در زمینه فناوری نانو می باشد. در سال های اخیر استفاده از میکروارگانیسم ها

با گذر از میکرو ذرات به نانو ذرات، با تغییر برخی از خواص فیزیکی روبرو می شویم، که دو مورد مهم آن ها عبارتند از: افزایش نسبت مساحت سطح به حجم و ورود اندازه ذره به قلمرو اثرات کوانتومی. افزایش نسبت مساحت سطح به حجم که به تدریج با کاهش اندازه ذره رخ می دهد، باعث غلبه یافتن رفتار اتم های واقع در سطح ذره به رفتار اتم های درونی می شود. این

آدرس نویسنده مسئول: بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی، انیسیتو پاستور

ایران، تهران، ایران

E-mail: Azimakbarzadeh@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۲/۰۴

سلولی صورت می گیرد. خواص عمده نانو ذرات نقره عبارتند از: غیرسمی، غیر محرک برای بدن، غیر حساسیت زاء، پایداری زیاد، آبدوست بودن، سازگاری با محیط زیست، مقاوم در برابر حرارت، عدم ایجاد و افزایش مقاومت و سازگاری در میکروارگانیسم و قابلیت آن ها در اضافه شدن به الیاف، پلیمر، سرامیک، سنگ، رنگ و غیره بدون تغییر دادن خواص ماده است. خاصیت آنتی باکتریال نانو ذرات نقره باعث گسترش کاربردهای آن در حوزه های نساجی، صنایع رنگ، سرامیک، داروسازی، کشاورزی، دامپروری و لوازم آرایشی- بهداشتی شده است. هدف از این تحقیق، بررسی خاصیت آنتی باکتریال سطوح پوشیده شده با نانو ذرات نقره سنتز شده توسط میکروارگانیسم ها و مقایسه آن با نمونه تجاری می باشد.

در تولید نانو ذرات بسیار مورد توجه قرار گرفته است، تولید نانو ذرات توسط میکروارگانیسم ها می تواند به صورت داخل سلولی و خارج سلولی باشد (۱۶، ۱۷). قارچ هایی که در تولید نانوذرات نقره شناسایی و به کار گرفته شده اند در جدول ۱ آورده شده است. با وجود این که پیش از این خاصیت ضد باکتریایی نقره محرز شده است، چند نوع باکتری مقاوم و پایدار در برابر نقره از جمله /شریشیا کلی (۱۵). گزارش گردیده که حتی امکان انباشته شدن نقره در دیواره سلولی آن ها به میزان ۲۵ درصد وزنی مواد زیستی وجود دارد و با توجه به این موضوع استفاده از آن ها در بازیابی صنعتی نقره از مواد معدنی پیشنهاد شده است. در این تحقیق از قارچ فوزاریوم /گزیسپوروم و باکتری /شریشیا کلی در تولید نانو ذرات نقره استفاده شده است که در مورد هر دو میکروارگانیسم احیای یون های نقره به صورت خارج

جدول ۱- قارچ هایی که در تولید نانوذرات نقره مورد استفاده قرار گرفته اند

شماره	میکرو ارگانیسم	اندازه (نانومتر)	منابع
۱	<i>Fusarium oxysporum</i>	5-50	Ahmad et al. (2003)
۲	<i>Aspergillus fumigatus</i>	5-25	Bhainsa and D'Souza (2006)
۳	<i>Aspergillus niger</i>	20	Gade et al. (2008)
۴	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	100	Vigneshwaran et al. (2006)
۵	<i>Aspergillus flavus</i>	8.92 ± 1.61	Vigneshwaran et al. (2007)
۶	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10-100	Balaji et al. (2009)
۷	<i>Fusarium semitectum</i>	10-60	Basavaraja et al. (2008)
۸	<i>Trichoderma asperellum</i>	13-18	Mukherjee et al. (2008)
۹	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10-100	Balaji et al. (2009)
۱۰	<i>Trichoderma viride</i>	5-40	Fayaz et al. (2010)
۱۱	<i>Penicillium fellutanum</i>	1-100	Kathiresan et al. (2009)
۱۲	<i>Penicillium brevicompactum</i> WA 2315	23-105	Shaligram et al. (2009)
۱۳	<i>Verticillium sp</i>	25 ± 12	Mukherjee et al. (2001)
۱۴	<i>Fusarium solani</i>	5-35	Gade et al. (2009)
۱۵	<i>Fusarium acuminatum</i>	5-40	Ingle et al. (2008)
۱۶	<i>Aspergillus clavatus</i>	10-25	Verma et al. (2010)

مواد و روش ها

برای آماده سازی توده زیستی مورد نیاز برای سنتز نانو ذرات نقره، قارچ *Fusarium oxysporum* ۳۱c IRAN خریداری شده از مؤسسه گیاه پزشکی کشور به مدت ۵ روز بر روی پلیت حاوی محیط کشت سابرو دکستروز آگار کشت داده شد و سپس برشی از محیط کشت حاوی میسلیوم های قارچ به محیط کشت مایع (MGYP) شامل ۳ (g/l) عصاره مالت، ۳ (g/l) عصاره مخمر، ۵ (g/l) پپتون، ۱۰ (g/l) گلوکز که بر روی $\text{PH}=3/5$ تنظیم شد برای رشد سلول های قارچ اضافه شد (۱). ارلن های حاوی این محیط کشت در دمای $26 \pm 1^\circ\text{C}$ به مدت ۴ روز (۹۶ ساعت) بر روی شیکر قرار گرفت. پس از گذشت ۴ روز، توده زیستی از صافی استریل عبور داده شد و پس از ۳ بار شسته شدن با آب مقطر استریل، در ۱۰۰ cc آب مقطر استریل در دمای $26 \pm 1^\circ\text{C}$ بر روی شیکر با دور ۲۰۰ rpm قرار داده شد. پس از ۳ روز مایع حاوی سلول های قارچ جدا و نیترات نقره با غلظت ۱ mM به این مایع اضافه گردید. پس از گذشت ۱۲ ساعت یون های نقره به طور کامل احیا و با استفاده از طیف سنجی فرابنفش- مرئی (شیمادزو مدل ۱۶۰۱) وجود نانو ذرات نقره به اثبات رسید. به منظور بررسی اندازه و مورفولوژی نانوذرات حاصل، کلئوئید حاوی این نانو ذرات پس از آماده سازی و قرار گرفتن بر روی شبکه مسی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (فیلیپس مدل EM ۲۰۸) بررسی شد. برای تولید نانو ذرات نقره با استفاده از باکتری *E.coli*، ابتدا باکتری در محیط کشت (Luria-Bertani Broth) LB broth حاوی ۱۰ (g/l) پپتون، ۱۰ (g/l) عصاره مخمر و ۱۰ (g/l) کلرید سدیم به مدت ۲۴-۱۸ ساعت رشد می یابد. سپس کلئوئید حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور سانتیوفوژ و مایع قرار گرفته بر روی آن جدا شد. نیترات نقره با غلظت ۱mM به آن اضافه گردید و پس از گذشت ۲ ساعت در دمای محیط، طیف سنجی فرابنفش- مرئی حاصل شد. اندازه و مورفولوژی نانو ذرات نیز به کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری (فیلیپس مدل EM ۲۰۸) مورد بررسی قرار گرفت. سطح دو دیسک بلانک با کلئوئید نانو ذرات نقره حاصل از این دو میکروارگانیسم پوشانده

شدند. برای مقایسه خواص آنتی باکتریال سطوح حاصل ابتدا پلیت حاوی محیط کشت LB Agar با ترکیب ۱۰ (g/l) پپتون، ۱۵ (g/l) آگار ۵ (g/l) عصاره مخمر، ۱۰ (g/l) کلرید سدیم و ۱۵ (g/l) آگار آماده شد. باکتری *E.coli* در محیط کشت LB Broth به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت رشد داده شد و مقدار $100 \mu\text{l}$ از آن در پلیت حاوی LB Agar با استفاده از میله شیشه ای پخش گردید. پس از گذشت حدود ۱۰ دقیقه، دیسک های بلانک پوشش دار شده با نانوذرات نقره در داخل پلیت قرار گرفتند و پس از گذشت ۲۴ ساعت هاله های ایجاد شده در اطراف این سطوح که ناشی از عدم رشد باکتری در این مناطق است، اندازه گیری و مقایسه شدند.

یافته ها

با تکامل واکنش احیاء و تولید نانو ذرات نقره، مایع زرد رنگ زیر صافی سلول های حاصل از سانتیوفوژ محلول باکتری به رنگ قرمز تیره شکل ۱ و سلول های حاصل از سانتیوفوژ محلول قارچ به رنگ زرد پررنگ تبدیل می شوند (شکل ۲). تولید نانو ذرات نقره در نمونه با استفاده از طیف سنجی فرابنفش- مرئی به اثبات رسید که در طیف حاصل، پیک جذب در طول موج ۴۲۰ nm - ۴۰۰ nm مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانو ذرات نقره می باشد. شکل ۳ طیف های مربوط به کلئوئید نانو ذرات نقره حاصل از قارچ *Fusarium oxysporum* و باکتری *E.coli* را نشان می دهد. با توجه به این شکل طیف مربوط به کلئوئید نانو ذرات حاصل از قارچ شدت، تقارن و همواری بیشتری نسبت به طیف مربوط به باکتری دارد. افزایش میزان شدت جذب در یک طول موج خاص با توجه به این که غلظت نیترات نقره در هر دو نمونه یکسان است، بیانگر افزایش مقدار نانو ذرات تولید شده در کلئوئید است. همچنین تقارن و همواری بیشتر طیف حاصل نشان دهنده توزیع اندازه یکنواخت ذرات می باشد. بنابراین با توجه به شکل ۲ کلئوئید حاصل از قارچ حاوی مقدار بیشتری از نانو ذرات نقره و با توزیع اندازه یکنواخت تر می باشد که این موضوع با تصاویر TEM در شکل ۴ تطابق دارد. با توجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) در این شکل، گستره اندازه نانوذرات نقره حاصل از قارچ *Fusarium oxysporum* برابر ۵۰-۵ نانومتر

و در مورد باکتری *E. coli* برابر ۶۰-۱۰ نانومتر است.

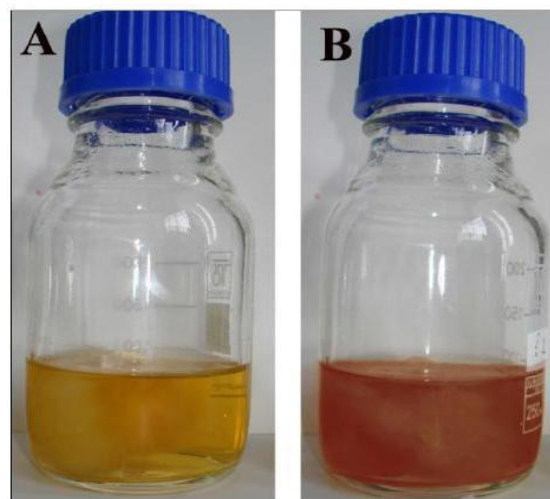
بحث

در زمینه مکانیزم احیا و تولید نانوذرات با استفاده از میکروارگانیسم ها بررسی های کمی صورت گرفته است طبق تحقیقاتی که A. Amad و همکارانش انجام داده اند، وجود یک سری پروتئین های ترشح شده از این میکروارگانیسم ها را عامل احیای یون های فلزی اعلام کرده اند که این مکانیزم جزو محتمل ترین مکانیزم ها محسوب می گردد (۲). پلیت مربوط به خاصیت آنتی باکتریال سطوح پوشیده شده با نانوذرات نقره

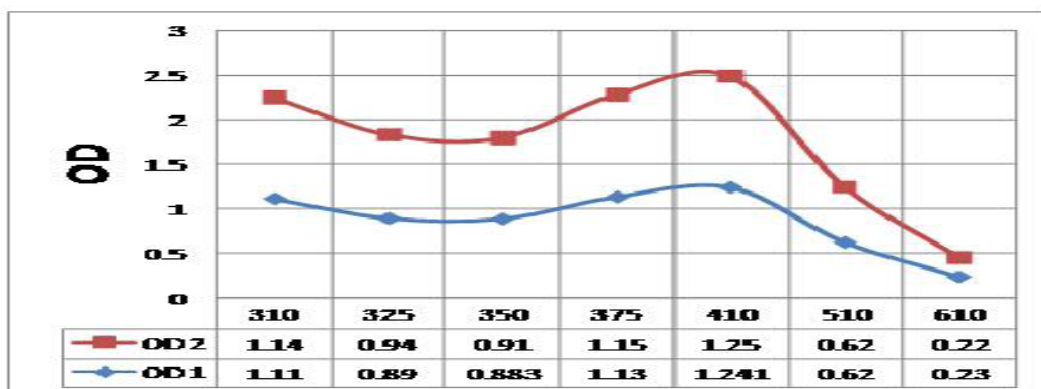
حاصل از قارچ و باکتری در شکل ۵ نشان داده شده است. همان طور که در این شکل مشهود است به دلیل عدم رشد باکتری در اطراف دیسک بلانک هاله ای ایجاد شده است که ملاک مقایسه خاصیت آنتی باکتریال اندازه این هاله می باشد. در مورد نمونه مربوط به قارچ *Fusarium oxysporum* ضلع مربع حاصل از دیسک بلانک و هاله اطراف آن به اندازه ۱ mm نسبت به باکتری بزرگتر است که نشان دهنده خاصیت آنتی باکتریال مطلوب تر کلونید حاصل از قارچ مورد نظر می باشد.



شکل ۲- محلول زیر صافی سلول های قارچ قبل (A) و بعد (B) از اضافه کردن نیترا نقره.



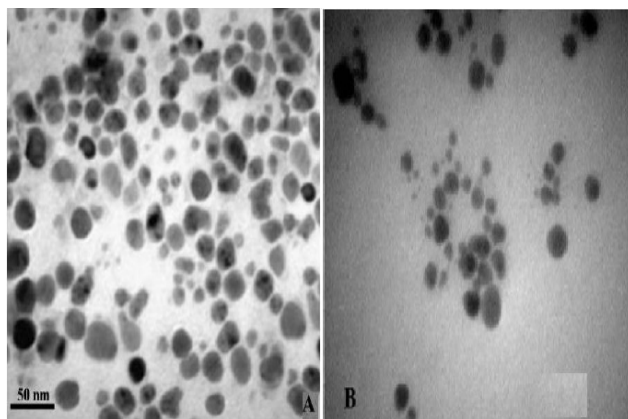
شکل ۱- محلول زیر صافی سلول های باکتری قبل (A) و بعد (B) از اضافه کردن نیترا نقره.



شکل ۳- طیف UV- Vis کلونید نانو ذرات نقره حاصل از قارچ فوزاریوم و (آبی) باکتری *E. coli*.



شکل ۵- پلیت حاوی دیسک پوشیده شده با کلئید نانوذرات نقره سنتز شده به کمک قارچ فوزاریوم اگزیسپوروم (راست) و باکتری *E. coli* (چپ).



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از نانوذرات تولید شده به کمک (A) قارچ فوزاریوم و (B) باکتری *E. coli*.

آنتی باکتریال سطوح پوشیده شده با کلئید نانوذرات نقره سنتز شده به کمک قارچ به دلیل کوچک تر بودن اندازه نانو ذرات نسبت به کلئید حاصل از باکتری مطلوب تر بود. توزیع اندازه ذرات نیز در این کلئید نسبت به نانو ذرات سنتز شده با استفاده از باکتری یکنواخت تر و طیف فرابنفش- مرئی آن هموارتر بود.

به طور کلی نشان داده شده است که خواص آنتی باکتریال نانو ذرات نقره به شکل و اندازه آن ها بستگی دارد. اندازه نانو ذره بیانگر میزان سطح تماس نانوذرات با باکتری است. به این مفهوم که با کاهش اندازه ذره نسبت مساحت سطح تماس به حجم افزایش می یابد و منجر به ازدیاد سطح تماس نانو ذرات با سلول های باکتری می گردد، در نتیجه خواص آنتی باکتریال نانو ذرات بهبود می یابد. به عنوان مثال کاهش اندازه نانو ذرات از $10 \mu\text{m}$ به 10 nm مساحت سطح تماس را به اندازه 10^9 برابر افزایش می دهد (۱۳). بنابر این انتظار می رود خواص آنتی باکتریال نانوذرات حاصل از قارچ *Fusarium oxysporum* که طبق تصویر TEM اندازه کوچکتری نسبت به اندازه نانو ذرات حاصل از باکتری *E. coli* دارند، مطلوب تر باشد که شکل ۵ نیز مؤید این موضوع است.

نتیجه گیری

نانو ذرات نقره به دلیل خاصیت آنتی باکتریال کاربردهای زیادی در صنایع مختلف از جمله داروسازی، صنایع رنگ، نساجی، کشاورزی، دامپروری، لوازم آرایشی و بهداشتی دارند. به کارگیری روش های نو با هزینه و آلودگی های زیست محیطی کمتر در تولید نانوذرات از اهمیت زیادی برخوردار است و از این رو در سال های اخیر توجه زیادی به سنتز زیستی نانو ذرات شده است. در این مقاله به منظور تولید نانو ذرات نقره از قارچ *Fusarium oxysporum* و باکتری *E. coli* استفاده شد. خواص

منابع

- (1)- Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R. Extracellular Biosynthesis of Silver nanoParticles using the fungus *Fusarium Oxysporum*. *Colloids Surf B*, 2003; 28:313–318.
- (2)- Ahmad A, Senapati S, Khan MI, Kumar R, Sastry M. Extracellular Biosynthesis of Monodispersed Gold nanoParticles by a Novel Extermophillic Actinomycete, *Thermonospora* sp. *Langmuir*, 2003; 19:3550- 3553.
- (3)- Balaji DS, Basavaraja S, Bedre Mahesh D, Prabhakar BK, Venkataraman A. Extracellular Biosynthesis of functionalized Silver Nanoparticles by Strains of *Cladosporium Cladosporioides*. *Colloids Surf B*, 2009; 68:88–92.
- (4)- Basavaraja S, Balaji SD, Lagashetty A, Rajasab AH, Venkataraman A. Extracellular Biosynthesis of Silver nanoparticles Using the Fungus *Fusarium Semitectum*. *Mater Res Bull*. 2008; 43(5):1164–1170.
- (5)- Bhainsa KC and D'Souza SF. Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using the Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids Surf B*, 2006; 47:160–164.
- (6)- Fayaz M, Tiwary CS, Kalaichelvan PT, Venkatesan R. Blue orange Light Emission from Biogenic Synthesized Silver Nanoparticles Using *Trichoderma viride*. *Colloids Surf B*, 2010; 75(1):175–178
- (7)- Gade AK, Bonde P, Ingle AP, Marcato PD, Dura'n N, Rai MK. Exploitation of *Aspergillus Niger* for Synthesis of Silver Nanoparticles. *J Biobased Mater Bioenergy*, 2008; 3:123–129.
- (8)- Gade A, Ingle A, Bawaskar M, Rai M. *Fusarium solani*: A Novel Biological Agent for The Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles. *J Nanopart Res*, 2009; 11:2079–2085.
- (9)- Ingle AP, Gade AK, Pierrat S, Sonnichsen C and Rai MK. Mycosynthesis of Silver Nanoparticles Using the Fungus *Fusarium Acuminatum* and Its Activity Against Some human Pathogenic Bacteria. *Curr Nanosci*, 2008; 4:141–144.
- (10)- Kathiresan K, Manivannan S, Nabeel MA, Dhivya B. Studies on Silver Nanoparticles Synthesized by A marine fungus, *Penicillium Fellutanum* Isolated from Coastal Mangrove Sediment. *Colloids Surf B*, 2009; 71(1):133–137.
- (11)- Mukherjee P, Roy M, Mandal BP, Dey GK, Mukherjee PK, Ghatak J. Green Synthesis of Highly Stabilized Nanocrystalline Silver Particles by a Non-Pathogenic and Agriculturally Important Fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology*, 2008; 19 (7).
- (12)- Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI, Parishcha R, Ajaykumar PV, Alam M, Kumar R, Sastry M. Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and their Immobilization in the Ycelia Matrix: a Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. *Nano Lett*, 2001; 1:515–519.
- (13)- Pal S, Tak YK, Song JM. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2007; 73(6):1712-1720.
- (14)- Shaligram NS, Bule M, Bhambure R, Singhal RS, Singh SK, Szakacs G, and Pandey A. Biosynthesis of silver nanoparticles Using Aqueous Extract from the Compactin Producing Fungal Strain. *Process Biochem*, 2009; 44(8):939–943.
- (15)- Shahverdi AR, Shahverdi HR, Minaeian S, Jamalifar H and Nohi A. Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatants of Enterobacteria: A novel biological approach, *Process Biochem*, 2007; 42: 919-923.

- (16)- Simkiss K, Wilbur KM. Biomineralization, Academic Press, 1989; 127: 373-373
- (17)-Mann S. Biomimetic Materials Chemistry, VCH Weinheim, 1rd edn, 1996; 315-336.
- (18)-Verma VC, Kharwar RN, Gange AC. Biosynthesis of Antimicrobial Silver Nanoparticles by the Endophytic Fungus *Aspergillus Clavatus*. *Nanomedicine*, 2010; 5(1):33–40.
- (19)-Vigneshwaran N, Ashtaputre NM, Varadarajan PV, Nachane RP, Paralikar KM, Balasubramanya RH. Biological Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Fungus *Aspergillus flavus*. *Mater Lett*, 2007; 66:1413–1418.
- (20)-Vigneshwaran N, Kathe AA, Varadarajan PV, Nachane PR, Balasubramanya RH. Biomimetics of Silver nanoParticles by White rot Fungus, *Phaenerochaete Chrysosporium*. *Colloids Surf B*, 2006; 53:55–59.