

بررسی تأثیر خواص ضد میکروبی نانو ذرات نقره، تیتانیوم دی اکسید بر دو گونه باکتری بیماری زا با منشا غذایی

پرستو رضایی¹، روحا کسری کرمانشاهی^{2*}

1- دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء، تهران

2- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء، 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 ضد میکروبی آن بر علیه *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Listeria monocytogenes* از طریق تعیین MIC و MBC پرداخته شد. سپس این اثر در مورد نانوماده TiO_2 خریداری شده با اندازه 21 نانومتر نیز انجام گرفت. نانوذرات نقره ساخته شده با اندازه 103 نانومتر با غلظت 1 میلی‌مولار، نانوذرات TiO_2 با اندازه 21 نانومتر با غلظت 1% دارای اثر ضد میکروبی بر باکتری‌های *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Listeria monocytogenes* 4b می‌باشند. نانوذرات نقره و تیتانیوم دی اکسید دارای اثر ضد میکروبی 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 TiO_2 می‌توان گفت که از این مواد در کنترل آلودگی‌های میکروبی مواد غذایی در بسته‌بندی‌های ضد میکروبی مواد غذایی استفاده شود.

کلیدواژگان: نانوذرات نقره، TiO_2 ، اثرات ضد میکروبی، *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Listeria monocytogenes* 4b.

1- مقدمه

بدست آوردن خصوصیات منحصر به فرد آنها می‌پردازد

که این خصوصیات می‌توانند برای کاربردهای مطلوب،

نانوتکنولوژی به ساختن مواد در سطح اتمی، برای

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 آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، محققان و داروسازان را به سمت استفاده از نانوتکنولوژی سوق داده است [2].

نانوذرات خواص ضد میکروبی 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 ضد میکروبی یکی از نانوذراتی است که در گستره وسیعی از علوم کاربرد فراوان یافته است. TiO_2 را به صورت افزودنی در بسته‌بندی‌های مواد غذایی استفاده می‌کنند. بیشترین دامنه مجاز آن از طرف سازمان FDA 1% می‌باشد [5].

لیستریا منوسایتوزنز و استافیلوکوکوس اورئوس از باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی بسیار رایج با بیماری‌های قابل توجه هستند. لیستریا منوسایتوزنز یک باکتری بیماری‌زا غذایی است و در یک محدوده وسیع دمایی از 4/4 تا 45 درجه سانتی‌گراد و همچنین pH 4/4 تا 9/4 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 منوسایتوزنز 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 از عفونت‌های 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 در اغلب 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 ضد میکروبی نانوذرات، هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره و دی اکسید تیتانیوم بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذا در جهت استفاده در بسته‌بندی‌های ضد میکروبی 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 4b monocytogenes* از انستیتو 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)

استفاده شد. به این ترتیب که 0/017 گرم نیترات نقره در 1 میلی لیتر 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 سانتی گراد 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 TiO_2 : نانوماده TiO_2 با اندازه 21 نانومتر را به نسبت 1% (w/v) در آب مقطر استریل حل شد [10].

2-2- بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات بر روی باکتری های بیماری زا بامنشا غذایی

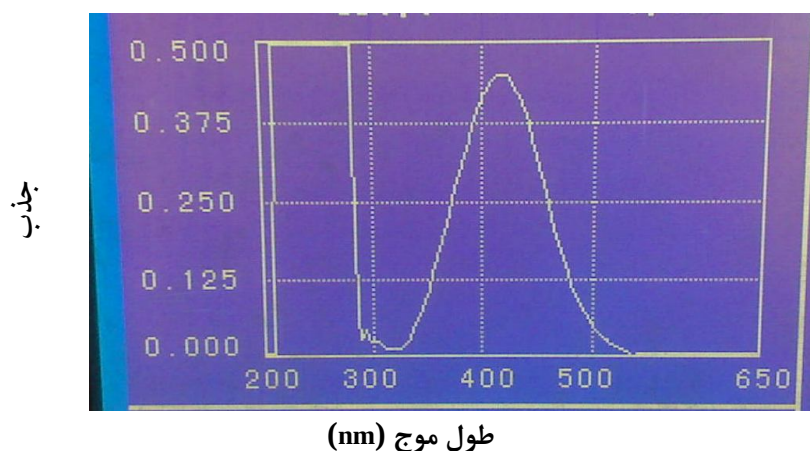
برای این مورد به بررسی کمترین غلظت بازدارنده نانوذرات (MIC) و کمترین غلظت کشنده (MBC) آن بر علیه باکتری های *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Listeria monocytogenes* 4b پرداخته شد. از نانوذرات ساخته شده جهت تعیین MIC سری رقت 10 تایی در میکروتیتر پلیت تهیه و با کدورت سنجی چشمی به طور

مقایسه ای با کنترل مثبت بر روی 0/01 نیم مک فارلند باکتری های نام برده بعد از 24 ساعت گرماگذاری در دمای 30 درجه سانتی گراد پرداخته شد همینطور یک لوپ کامل از هر چاهک را در جهت بررسی MBC در محیط MHA کشت داده شد [10، 11]. به ترتیب کنترل مثبت حاوی محیط MHB و باکتری های مورد نظر و کنترل منفی حاوی محلول نانوذره و محیط MHB بود.

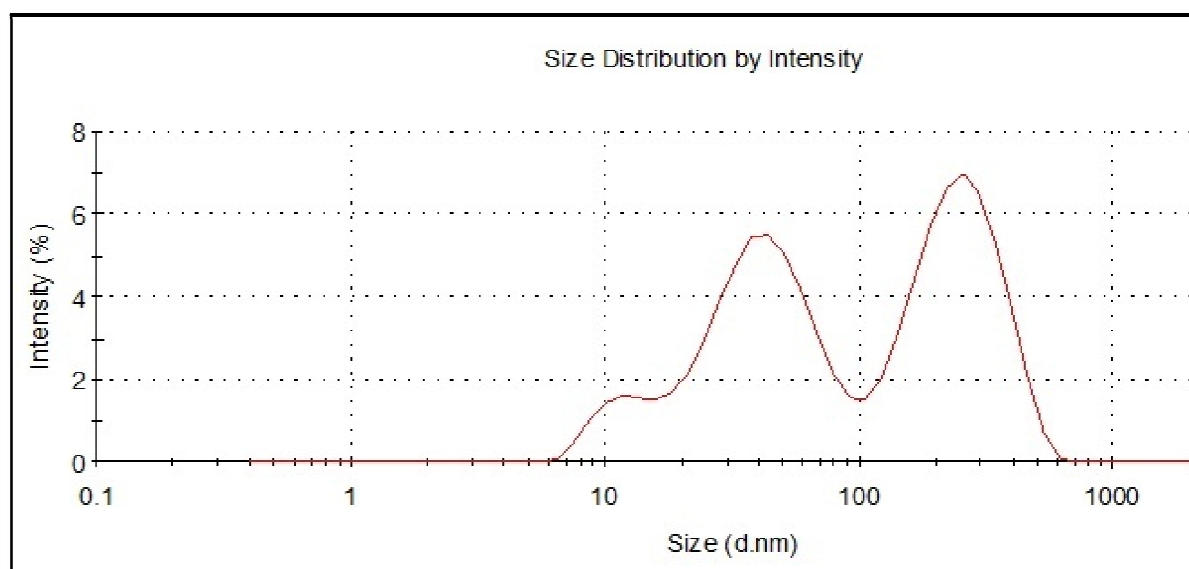
3- نتایج

نقره در حالت عادی سفید رنگ و بعد از تشکیل نانوذره، به رنگ زرد درمی آید. 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 زتا سایزر 102 نانومتر را نشان می دهد (شکل 2).

MIC, MBC نانوذرات نقره برای هر دو باکتری مورد نظر 1 میلی مولار و برای تیتانیوم دی اکسید برای باکتری های *S. aureus* PTCC 1431 و برای باکتری *L. monocytogenes* 4b به ترتیب 1% و 0/5% گزارش شد (جدول های 1 و 2)



شکل 1 UV-vis نانوذره نقره



شکل 2 هیستوگرام توزیع اندازه نانو ذره نقره $Z\text{-Average}(d\text{-nm})=102.3$

جدول 1 MBC و MIC نانوذره نقره با غلظت 4 میلی مولار بر روی دو گونه باکتری بیماری‌زا در دمای 30 درجه سانتی‌گراد

باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذا	MIC	MBC
<i>S.aureus</i> PTCC 1431	1 میلی مولار	1 میلی مولار
<i>L.monocytogenes</i> 4b	1 میلی مولار	1 میلی مولار

جدول 2 MBC و MIC نانوماده TiO_2 (با غلظت 1%) بر روی دو گونه باکتری بیماری‌زا در دمای 30 درجه سانتی‌گراد

باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذا	MIC	MBC
<i>S.aureus</i> PTCC 1431	%1	%1
<i>L.monocytogenes</i> 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 $102/4$ نانومتر را نشان می‌دهد که غلظت 1 میلی مولار به عنوان غلظت MIC و MBC 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 ضد میکروبی نانوذرات نقره را بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به اثبات رسانده‌اند [9].

اثرات ضد میکروبی نانو ماده TiO_2 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 TiO_2 مرگ سلولی باکتری‌های اشریشیاکلی و

استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب بعد از 16 و 24 ساعت فرا می‌رسد. نانو ماده مورد استفاده این پژوهش گران 60 نانومتر بوده اما نانوماده کاربردی مورد استفاده در این پژوهش 20 نانومتر بوده از این رو، غلظت 1% نانوماده TiO_2 در مدت زمان 24 ساعت سبب حذف کامل دو گونه ی باکتری بیماری‌زا با منشأ غذا شده است. نانو ماده TiO_2 سبب پراکسید شدن ترکیبات فسفولیپیدی حلقوی غشا می‌شود و نفوذپذیری غشا را دچار اختلال می‌کند [10].

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

نانوذره نقره ساخته شده و نانو ماده TiO_2 با غلظت 1% اثر باکتری‌کشی بالایی بر علیه دو گونه باکتری بیماری‌زا با منشأ غذا از خود نشان می‌دهند.

اثر ضد میکروبی نانوذرات را به طور کلی 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 و پروتئین‌های چرخه تنفسی تأثیر دارد و سبب تغییر کانفورماسیون آن‌ها شده و به دنبال آن‌ها این چرخه ناکارآمد 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 ضد میکروبی دارند [15].

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

- [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 TiO_2 بر روی اشیریشیاکلی و استافیلوکوکوس ارونوس، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی 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] ملکوئیان محمد (1389). تعیین و مقایسه نانوذرات

در حذف باکتری های گرم مثبت و منفی از فاضلاب شهری. دانشکده بهداشت یزد، 11-9:1.

تند رشد نسبت به باکتری های کند رشد حساسیت بیشتری را نشان می دهند. چرا که باکتری های کند رشد زمان بیشتری در جهت بیان ژن های 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 ضد میکروبی نانوذرات مؤثر هستند.

5- نتیجه گیری

با توجه به اثر ضد میکروبی که نانوذرات نقره و تیتانیوم بر علیه باکتری ها با منشا غذا از خود نشان می دهند، می توان برای کنترل آلودگی های میکروبی مواد غذایی در بسته بندی های ضد میکروبی مواد غذایی استفاده کرد.

6- منابع

- [1] Mritunjai S., Shinjni S., Prasad S., Gambhir S.I. (2008). Nanotechnology 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). A historical 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 Nuñez M. (1998). Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *Food Microbiology*. 40: 35-42.