مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره ششم ـ شماره دوم ـ تابستان ۹۱
صفحات ٦٥ الی ٦٨

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی اثر نانوذرات نقره بر رشد باکتری *اشرشیاکلی*

نوشین نقش[1]، مریم صفری[2]، پریسا حاج‌مهرابی[3]

[1]دکتری فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران.
[2]کارشناس بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران.
[3]کارشناس 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 نانوتکنولوژی، استفاده از فناوری نانوسیلور (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، نانوسیلورها با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ppm 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. به‌منظور مقایسه میانگین هاله‌های عدم رشد در گروه‌های کنترل و تیمار از آزمون تی‌تست استفاده شد و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در روز اول بعد از تیمار و در غلظت ۴۰۰ppm، میانگین قطر هاله‌ها در باکتری ۲/۳۰±۰/۴۳mm بود که از نظر آماری در مقایسه با گروه‌های شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($p=۰/۰۱$). در روز دوم بعد از تیمار و در غلظت ۴۰۰ppm، میانگین قطر هاله‌ها ۲/۴۸±۰/۳۹mm بود که از نظر آماری در مقایسه با گروه‌های شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۱$)، ولی تفاوت معنی‌داری با روز اول نداشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه نانوتکنولوژی در شاخه‌های مختلف علوم کاربردهای گوناگونی دارد، تعمیم نتایج این مطالعه می‌تواند در درمان بسیاری از بیماری‌های منتقل‌شده 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؛ نانوبیوتکنولوژی؛ مهارکنندگی؛ *اشرشیاکلی*.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران؛
آدرس پست الکترونیکی:n_naghsh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۳۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲

مقدمه

محققان نانوتکنولوژی ابعاد وسیعی از کاربردهای نانوذرات را شناسایی کرده‌اند که ممکن است نقش بسیار زیادی در پزشکی، پیشگیری و درمان بیماری‌ها داشته باشد. همچنین اثرات ضدمیکروبی نانوسیلور در مطالعات گوناگون بررسی شده است (۲،۱). یکی از شاخه‌های کاربردی در زمینه نانوتکنولوژی، استفاده از فناوری نانوسیلور می‌باشد. در این تکنولوژی یون‌های نقره به‌صورت کلوئیدی در محلول به حالت سوسپانسیون قرار داده می‌شوند. نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولیدمثل میکروارگانیسم اثر می‌گذارد. در مطالعات مختلف، خواص ضدمیکروبی این نانوذرات و استفاده مفید از آن در زمینه بیوتکنولوژی و مهار اختصاصی میکروب‌ها بررسی شده است

(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 میکروب‌زدایی بوده و تهیه آن آسان و قیمت آن نیز ارزان است (۵،۳). از طرفی، باکتری‌های گرم منفی واجد یک دیوار سلولی به ضخامت ۷-۸nm 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 کلوئیدی به‌صورت ذرات ریز میکروسکوپی منتشر شده و به‌راحتی می‌تواند به داخل سلول‌های باکتری نفوذ کند.

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

روش بررسی

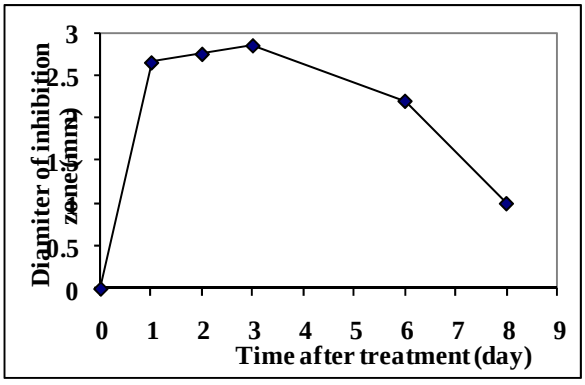
باکتری مورد نظر از انستیتو پاستور تهران خریداری شد، و محلول کلوئیدی نانوذرات نقره از شرکت نانونصب پارس با میانگین قطر ۴nm تهیه گردید. در ابتدا غلظت‌های مورد نظر از کلوئید نانوسیلور به‌وسیله آب مقطر و به روش سری رقت تهیه شد. سپس در شرایط کاملاً استریل، ۵۰µl از نانوسیلورها در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ppm 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 هاله‌ها در روزهای اول، دوم و ششم بررسی و اندازه‌گیری گردید. به‌منظور افزایش دقت در زمانهای مختلف، این آزمونها برای هر غلظت با ۲۰ تکرار صورت گرفت.

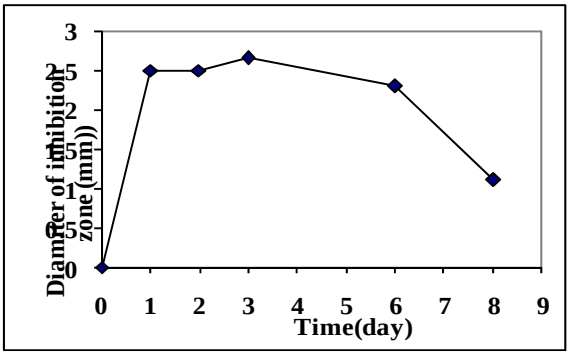
بعد از گذشت زمانهای ۱، ۲، و۶ روز تغییرات مورفولوژیک و میانگین قطر هاله‌های عدم رشد درگروه‌های تیمار با گروه شاهد مقایسه شد. برای سنجش آماری داده‌ها از برنامه نرم‌افزاری SPSS و برای نمودارها از برنامه نرم‌افزاری Excel استفاده گردید. به‌منظور مقایسه میانگین‌ها آزمون تی‌تست به کار برده شد و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

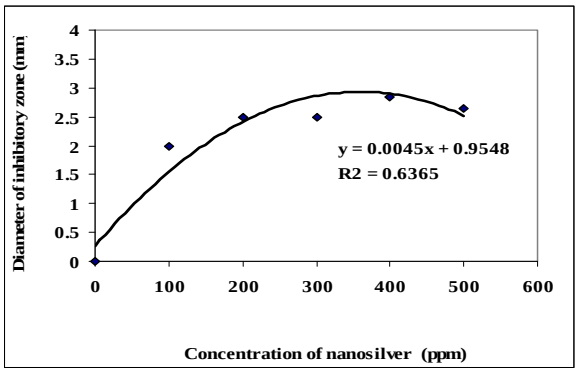
در روز اول بعد از تیمار و در غلظت ۴۰۰ppm، میانگین قطر هاله‌ها در باکتری ۲/۳۰±۰/۴۳mm بود که از نظر آماری در مقایسه با گروه‌های شاهد معنی‌دار گزارش شد ($p<۰/۰۱$). در روز دوم بعد از تیمار و در غلظت۴۰۰ppm، میانگین قطر هاله‌ها ۲/۴۸±۰/۳۹mm به دست آمد که این میزان نیز از نظر آماری در مقایسه با گروه‌های شاهد معنی‌دار بود ($p<۰/۰۲$)، ولی تفاوت قطر هاله‌ها در روز دوم با روز اول معنی‌دار نبود. در روز ششم بعد از تیمار و در غلظت ۴۰۰ppm، میانگین قطر هاله‌ها ۹/۴±۰/۴۷mm برآورد شد که از نظر آماری در مقایسه با گروه‌های شاهد معنی‌دار بود ($p<۰/۰۱$، نمودار شماره ۱ و ۲). تأثیرات مهاری نانوسیلورها بر روی باکتری، ۳ روز بعد از تیمار در غلظت ۱۰۰-۴۰۰ppm به‌صورت وابسته به دوز افزایش یافت، ولی در غلظت ۴۰۰ppm تفاوت معنی‌داری با غلظت ۵۰۰ppm مشاهده نشد (نمودار شماره ۳).



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



نمودار شماره ۲: اندازه‌گیری قطر هاله‌ها در غلظت ۵۰۰ppm از نانوذرات نقره در زمانهای مختلف بعد از تیمار در باکتری *E. coli*



نمودارشماره ۳: اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد در غلظت‌های مختلف از نانوذرات نقره
۳ روز بعد از تیمار در باکتری *E. coli*

بحث

با توجه به این نکته که *E. coli* در دسته باکتری‌های گرم منفی بوده و برای پذیرش نانوسیلورها با ممانعت بیشتری در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت مواجه می‌باشد، لذا دیرتر از باکتری‌های گرم مثبت به نانوذرات پاسخ می‌دهد. در این مطالعه دلیل اثرات نانوذرات نقره بر روی این باکتری گرم منفی با وجود مقاومت دیواره‌ای را می‌توان به کوچک بودن قطر یون‌های نقره و در نتیجه نفوذپذیری بیشتر این نانوذرات نسبت داد. Moudgi و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که تأثیرات نانوذرات بر روی سلول‌های 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 برغشای سلول‌ها می‌گذارند (۷،۱). نتایج حاصل از تحقیقات انجام‌شده نشان می‌دهد مکانیسم مهارکنندگی نانوذرات نقره به عملکرد یون‌های نقره در محلول کلوئیدی برمی‌گردد. همچنین دگرگون‌ساختن میکروارگانیسم به‌وسیله تبدیل پیوندهای SH به SA-g صورت می‌گیرد. در این مکانیسم ذرات نانونقره فلزی به مرور زمان یون‌های نقره از خود ساطع می‌کنند. این یون‌ها طی واکنش جانشینی، باندهای SH را در جداره میکروارگانیسم به باندهای SA-g تبدیل کرده، که نتیجه آن از بین رفتن میکروارگانیسم است (۸،۵). همچنین در مورد جنبه نوآوری این مطالعه لازم به توضیح است که شکل نانوذره (کروی، ستاره‌ای، میله‌ای) و اندازه آن در چگونگی اثرات فیزیولوژیک آن بر سلول‌های زنده اثر می‌گذارد. 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 غلظت‌های مزبور، بر روی رشد این باکتری بررسی شد.

از جمله خصوصیات مهم ذرات نانوسیلور می‌توان 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 (۷،۶). با توجه به خواص ضد باکتریایی نانوسیلور و عدم اطلاع دقیق از دوز و زمان تأثیر اختصاصی آنها بر *E. coli*، انجام آزمون‌های دقیق جهت پیگیری این تأثیرات ضروری به‌نظر می‌رسد. تحقیقات اخیر دانشمندان نشان می‌دهد زمانی‌که ذرات نانوسیلور با باکتری‌ها و قارچ‌ها مواجه شوند، سیستم تنفسی آنها را از کار می‌اندازند (۸)، که این عمل باعث می‌شود متابولیسم سلولی آنها مختل شده و از رشد سلول جلوگیری شود (۹). نانوذرات نقره با القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (Apoptosis) نیز می‌تواند باعث تخریب تخصصی باکتری‌ها گردد (۷). از طرفی، تولید و نگهداری نانوذرات نقره احتمالاً خیلی ارزان‌تر و ساده‌تر از داروهای رایج است. همچنین نانوذرات نقره می‌تواند جایگزین مناسبی برای درمان‌های روتین توسط آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (۱۰). لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی، اشکال مختلف میله‌ای و ستاره‌ای با انواع قطرها از این نانوذره برای بررسی اثرات ضد میکروبی در این باکتری و باکتری‌های دیگر مدنظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به این که نانوتکنولوژی در شاخه‌های مختلف علوم، کاربردهای گوناگونی دارد. بنابراین تعمیم نتایج این مطالعه می‌تواند در درمان بسیاری از بیماری‌های منتقل‌شده توسط باکتری در زمینه پزشکی مفید واقع شود. همچنین با توجه به عوارض آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنها باشد.

References:

1. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager S JJ, Hofmann M. In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells. Toxocological Sciences 2005;88(2):412-419.

2. Arikan 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. Arikan 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. Toxocological 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. Toxocol 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.