سنتز نانو ذرات گرافن و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن بر اشریشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس

طاهره هاشمی[۱و۲]، 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 دریافت: ۹۶/۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۵

چکیده

در چند سال اخیر استفاده از نانو ذرات در حوزه هایی چون پزشکی، دارو، کشاورزی، صنعت و محیط زیست توسعه فراوانی یافته است. در پزشکی انواع مختلف این نانو ذرات برای مقاصدی چون درمان سرطانها، زخمها، عفونتها و نیز انتقال دارو به کار می روند. 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 رهایش دارو، حسگرهای زیستی، تصویر برداری و ترکیبات ضد میکروبی استفاده می شود. 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 اشریشیاکلی بررسی شد. نتایج آنالیزهای دستگاهیAFM 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.

واژه های کلیدی: سنتز نانوذره، گرافن اکسید ، گرافن احیاء شده، ضد میکروبی

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

مقدمه

در چند سال اخیر استفاده از نانو ذرات در حوزه هایی چون پزشکی، دارو، کشاورزی، صنعت و محیط زیست توسعه فراوانی یافته است. در پزشکی انواع مختلف این نانو ذرات برای مقاصدی چون درمان سرطانها، زخمها، عفونتها و نیز انتقال دارو به کار می روند(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 سازگارپذیری و هزینه کم تولید در مقیاس بالا کاربردهای زیادی در الکترونیک و پزشکی پیدا کرده است (۷ و۸).

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). ازنانوذرات جدیدی که تازگی به عرصه های علمی و صنعتی وارد شده می توان به گرافن اشاره کرد. گزارشات نشان می دهد به علت برهمکنش بیوفیزیکی بین نانوذرات

و باکتریها، نانوذرات با آسیب به دیواره سلول و وارد شدن به سلول باکتریایی منجر به مرگ باکتری می شوند. با این وجود تابه 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 باکتری‌کشی نانوذرات برای استفاده از نانوذرات در درمان الزامی می باشد. یونانیان باستان از کلوئید نقره به عنوان یک ماده ضد باکتری استفاده می‌کردند(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 می‌شود(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 برروی 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 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 $H2O_2$ 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 هیدروترمال حاوی یک اطاقک تفلونی ۱۵۰ میلی لیتری قرار داده، احیای هیدروترمالی به مدت ۵ ساعت در ۱۲۰ درجه سانتی گراد صورت گرفت.

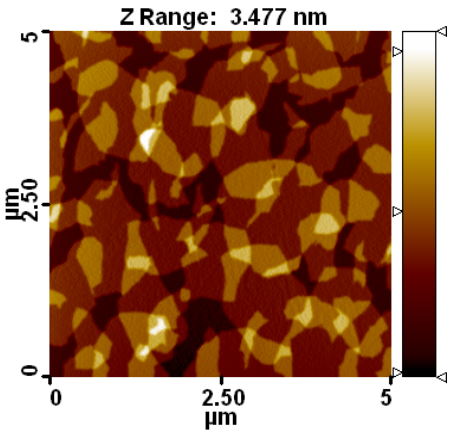
آنالیز آماری: پس از ثبت داده های به دست امده از انجام آزمایشات آزمون تجزیه واریانس برای داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (ver. 19) استفاده گردید. مقایسه بین سطوح میانگینها با استفاده از آزمون مقایسه میانگین دانکن انجام شد. سطوح معنی دار بودن در سطح ۹۵ درصد($P\leq0.05$)انجام شد. تمام آزمایشات 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

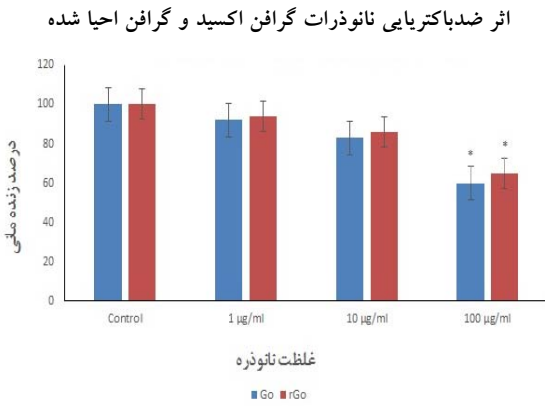
که یکی از باکتریهای اصلی فساد غذایی است بررسی شد. همان طور که در شکل ۲ نتایج نشان داد که گرافن اکسید و گرافن احیاء شده رشد باکتری را کاهش می دهند ولی این کاهش فقط در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر محیط کشت نسبت به گروه کنترل معنی دار بوده است.



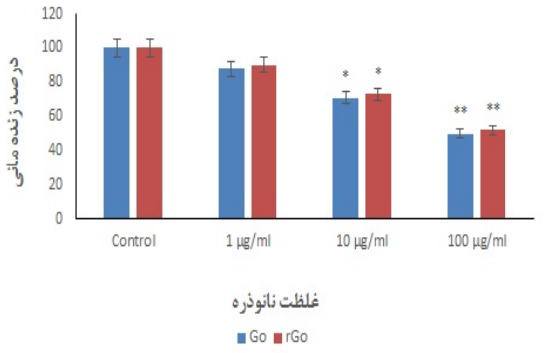
شکل ۱- نمودار حاصل از نتایج آنالیز AFM

تأثیر نانوذره گرافن و گرافن اکسید بر زنده مانی استافیلو کوک اورئوس: اثر ضد باکتری نانوذرات گرافن و گرافن احیاء شده در ۳ غلظت متفاوت۱، 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 میکرو گرم بر میلی لیتر به طور معنی داری کاهش می دهند. این کاهش در گرافن و گرافن احیاء شده در غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میلی لیتر(۵±۷۱ و ۶±۷۳ به ترتیب) در سطح ۹۵ درصد معنی دار بود($P\leq0.05$). اما در غلظت ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر گرافن(۴±۵۰) و گرافن احیاء شده (۴±۵۲) در سطح معنی دار ۹۹ درصد میزان رشد استافیلوکوک اورئوس را نسبت به گروه کنترل کاهش دادند($P\leq0.01$).

اثر ضد باکتریایی فیلمهای تهیه شده از گرافن و گرافن تهیه شده: در این آزمایش اثر ضد باکتریایی گرافن فیلم بر روی باکتری اشریشیاکلی 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 می کنید 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 احیا شده در ۳ غلظت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر باکتری اشریشیاکلی



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 می دهد که اثر ضد باکتری گرافن وابسته به غلظت بوده که نتایج تحقیقات پیشین(۳) را تأیید می کند. تحقیقات پیشین نشان دادند که نانوذرات با داشتن خواص به خصوص می توانند اثرات ضدمیکروبی داشته

باشند (۱، ۳ و ۱۵). گرافن که یکی از نانوذرات جدید نانوتکنولوژی است با داشتن لبه حای تیز با نفوذ در دیواره باکتری اثرات ضد باکتری خود را نشان می دهد. 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 می دهد(۳). همچنین این محققان نشان دادند که گرافن اثر ژنوتوکسیسیتی نیز بر روی باکتری دارد. با توجه به اثر سایز ذره بر سمیت سلولی(۱۰) پیشنهاد می شود در تحقیقات آینده اثر سایز نانوذره گرافن بر روی خاصیت باکتری کشی این نانوذره بررسی شود. همچنین باتوجه به صفحه های بودن گرافن و قدرت بالا در ایجاد برهمکنش با دیگرترکیبات پیشنهاد می شود 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 سنندج و دانشگاه صنعتی شریف به خاطر کمک در انجام آزمایش تشکر و قدردانی می گردد.

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 کلاله 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 aurous. 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, MJ., 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., Carrie re, 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., Kundu1,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 µg/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 µg/ml significantly decreased bacterial growth rate.

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