

بررسی اثر ضدباکتریایی اتصال نانوذرات طلای تولید شده توسط *Fusarium Oxysporum* به آنتی بیوتیک استرپتومایسین

نسرین نعیمی شامل^۱، سمانه دولت آبادی^{۲*}، پرستو پور علی^۳

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، نیشابور، ایران.

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، نیشابور، ایران.

۳- مربی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۰۴

چکیده

زمینه و هدف

توسعه روش های سبز در تولید ترکیباتی در شکل و اندازه نانو جزئی مهم از پژوهش در زمینه های مختلف علم نانوتکنولوژی است. در مطالعه حاضر تولید خارج سلولی نانوذرات طلا بوسیله سویه قارچ *Fusarium oxysporum* انجام شد و نانوذرات بدست آمده به آنتی بیوتیک استرپتومایسین اتصال یافتند. نهایتاً خواص ضد باکتریایی نانوذرات طلا متصل شده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

Fusarium oxysporum در محیط کشت سابوراد دکستروز براث کشت داده شد. جهت تولید نانوذرات طلا، سوپرناتانت حاصل از کشت در معرض محلول کلرواوریک اسید با غلظت نهایی ۱ میلی مولار قرار گرفت. مخلوط واکنش جهت تأیید حضور نانوذرات، تحت روش های اسپکتروفتومتری، پراش اشعه ایکس و میکروسکوپ الکترونی گذاره قرار گرفت. اتصال آنتی بیوتیک به نانوذرات توسط روش های اسپکتروفتومتری، TEM و طیف سنجی مادون قرمز تأیید گردید. کمترین غلظت مهارکنندگی محلول ها بوسیله روش های رقیق سازی در براث و ایجاد چاهک در آگار بررسی شد.

یافته ها

طبق نتایج اسپکتروفتومتری نانوذرات دارای پیک جذبی در طول موج حدود ۵۳۰ nm بودند. نتایج XRD فلز طلا را در محیط تأیید کرد. تصاویر TEM نانوذرات را به شکل کروی یا شش وجهی و با اندازه ۲۵-۳۰ nm را نشان داد. نتایج اسپکتروفتومتری، TEM و FTIR روند اتصال را تأیید کرد. در سویه های باکتریایی محلول ها خواص ضد باکتریایی متفاوتی داشتند.

نتیجه گیری

تولید زیستی نانوذرات طلا توسط قارچ *Fusarium oxysporum* می تواند انجام شود و اتصال نانوذرات به آنتی بیوتیک بدون هیچ اتصال دهنده ای قابل انجام است.

کلیدواژه ها

بیوسنتز، نانوذرات فلزی، استرپتومایسین

* نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، گروه زیست شناسی.

پست الکترونیک: S_dolatabadi1436@yahoo.com

■ مقدمه

ذرات نانو عبارتند از ذراتی که ابعاد آنها کمتر از ۱۰۰ nm باشد. در واقع نانو تکنولوژی فهم و بکارگیری خواص جدیدی از مواد و سیستم‌هایی در این ابعاد است که اثرات فیزیکی جدیدی، عمدتاً متأثر از غلبه خواص کوانتومی بر خواص کلاسیک، از خود نشان می‌دهند. نانو فناوری یک دانش به شدت میان رشته‌ای است و به رشته‌هایی چون فیزیک کاربردی، مهندسی مواد، مهندسی مکانیک، مهندسی برق، مهندسی شیمی و رشته‌های مرتبط با زیست شناسی نیز مربوط می‌شود (۱).

جهت تولید نانوذرات فلزات مختلف سه روش شیمیایی، فیزیکی و زیستی وجود دارد که در این میان روش‌های فیزیکی و شیمیایی موجود دارای معایب خاص خود می‌باشند. تولید زیستی اشاره به روندی دارد که توسط روش‌های زیستی و روندهای آنزیمی رخ می‌دهد. این روش‌ها به دلیل اینکه مواد سمی در محیط تولید نمی‌نمایند، به نام تکنولوژی سبز نیز خوانده می‌شوند که در طی آن می‌توان نانوذرات فلزی بهتری نسبت به انواع دیگر تولید نمود. در حقیقت میکروارگانیسم‌ها می‌توانند بر روی غلظت‌های بالایی از یون‌های فلزی رشد نموده و زنده بمانند که به دلیل توانایی آنها در برخورد با شرایط استرس است. روش‌هایی که میکروب‌ها در این شرایط می‌توانند مورد استفاده قرار دهند، شامل سیستم‌های جریان یونی، تغییر در حلالیت، ایجاد کمپلکس‌های خارج سلولی یا رسوب فلزات و یا نداشتن سیستم‌های انتقال یون فلزی به درون سلول می‌باشد (۲).

به دلیل اینکه کار کردن با قارچ‌ها بسیار آسان‌تر می‌باشد، تا به حال بسیاری از مطالعات پیرامون تولید نانوذرات فلزی بر روی این میکروب‌ها متمرکز شده است. میسلیم‌های قارچی، در مقایسه با سلول‌های باکتریایی، می‌توانند در مقابل فشار جریان و بهم‌زنی راکتور و دیگر شرایط موجود در بیوراکتورها مقاومت نمایند. این موجودات، سخت رشد نبوده و کشت آنها به راحتی انجام‌پذیر است (۳). قارچ مورد استفاده در مطالعه حاضر *Fusarium oxysporum* بود که برای کشت آن از محیط سابوراد دکستروز آگار و پوتیتو دکستروز آگار استفاده می‌شود. این محیط‌ها انتخابی برای تکثیر قارچ‌ها می‌باشند. انتخابی بودن این محیط برای قارچ‌ها بر اساس وجود آنتی‌بیوتیک در آن و همچنین مواد غذایی ناچیز آنها است.

F. oxysporum قادر به تولید نانوذرات در مقیاس آزمایشگاهی می‌باشد (۴). به دلیل حضور سیستم‌های ترشحی قوی در این قارچ، تا کنون مطالعات متعددی اثبات نموده‌اند میکروارگانیسم مذکور قادر است نانوذرات فلزی را در ترکیبات و اشکال گوناگون تولید کند (۵).

گسترش علم نانو تکنولوژی در دهه‌های گذشته، فرصت‌هایی برای کشف تأثیرات ضد باکتریایی نانوذرات فلزی را ایجاد کرده است. نانوذرات فلزی علاوه بر اثر مهاری ذره به دلیل اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم زیادی که دارند باعث تماس بیشتر با فضای بیرون شده که تأثیرات ضد باکتریایی زیادی به دنبال دارند (۶). در بین نانوذرات با خواص ضد میکروبی، نانوذرات طلا از لحاظ اینکه فاقد سمیت‌اند، قابلیت تطابق با ایجاد تغییرات سطحی بر روی خود را داشته و دارای اثرات فتوترمال^۱ مناسب هستند و جهت استفاده در تولید داروهای ضد میکروبی در جایگاه مناسبی قرار دارند (۷). در سال‌های اخیر تعداد آنتی‌بیوتیک‌های جدید که مورد شناسایی و بهره‌برداری قرار گرفته‌اند، بسیار کم بوده و تقریباً هیچ کدام از آنها فعالیت مناسبی علیه باکتری‌های مقاوم به چند دارو نداشته است. بر این اساس در مطالعه حاضر به بررسی امکان اتصال آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به نانوذرات طلای تولید شده به روش زیستی پرداخته شده است. علت استفاده از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین وسیع‌الطیف بودن آن است که علیه تعداد بیشماری از باکتری‌های گرم منفی، بعضی از باکتری‌های گرم مثبت و عامل بیماری سل مؤثر می‌باشد. در نهایت اثر ضد باکتریایی آنها علیه یک سری میکروارگانیسم‌ها مورد بررسی قرار گرفت، تا از این طریق بتوان گامی در جهت درمان بیماری‌های حاصل از باکتری‌های مقاوم به دارو برداشت. تا کنون اتصال داروها به روش زیستی و بدون هیچ اتصال دهنده‌ای انجام نشده است، که در مطالعه انجام شده این هدف حاصل شد.

■ مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر در مرحله اول قارچ *Fusarium oxysporum* با UTMC ۵۰۲۶ از مرکز پژوهشی فناوری و فرآورده‌های میکروبی

^۱ Photothermal

دانشگاه تهران خریداری شد و در محیط سابوراد دکستروز برات^۱ مرک آلمان کشت داده شد. سپس سوپرناتانت کشت قارچ مذکور در مجاورت محلول کلرواوریک اسید با غلظت نهایی ۱ mmol در شیکر انکوباتور در دمای ۳۰°C به مدت ۲۴ ساعت به منظور تولید نانوذرات طلا قرار داده شد. با تغییر رنگ نمونه بعد از ۲۴ ساعت از آن در غلظت نهایی ۱ mmol نمک طلا، تولید نانوذرات طلا بوسیله اسپکتروفوتومتری نانودراپ ساخت بیوتک آلمان، پراش پرتو ایکس^۲ ساخت فیلپس آلمان و میکروسکوپ الکترونی عبوری^۳ ساخت فیلپس آلمان تأیید گردید. سپس بهینه سازی بر اساس ۴ فاکتور اصلی دما، زمان، سوبسترا و pH انجام شد. بعد از اتمام بهینه سازی، مجدداً نمونه ای بر اساس میانگین بهترین شرایط بدست آمده با pH=9، غلظت سوبسترا ۳/۵ mmol و در دمای ۳۰°C تهیه و نمونه در گرمخانه شیکردار با ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. سپس بوسیله اسپکتروفوتومتر نانودراپ جذب محلول محاسبه و توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری از بهترین نمونه عکسبرداری شد و پراش پرتو ایکس به منظور تأیید حضور فلز طلا انجام شد (۱).

نمونه مورد نظر شستشو گردید، سپس پودر خالص آنتی بیوتیک استرپتومایسین ساخت شرکت سیگما آلدریج آمریکا خریداری و بصورت قطره قطره به میزان ۱ mg/ml به ۱ CC محلول نانوذرات طلا شستشو داده شده افزوده شد.

محلول بوسیله دستگاه استیر ساخت استوارت چین به مدت ۱۸ ساعت هم زده شد. تأیید اتصال از طریق مشاهده تغییر رنگ، اسپکتروفوتومتر نانو دراپ، میکروسکوپ الکترونی گذاره و اسپکتروفوتومتری مادون قرمز^۴ انجام گرفت. در نهایت کمترین غلظت مهارکنندگی^۵ محلول ها بدین صورت تهیه شد: ابتدا سوسپانسیونی از باکتری ها با استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس از پلیت ۹۶ خانه استفاده و به تمامی چاهک ها ۱۰۰ µl محیط کشت نوترینت برات اضافه گردید. به منظور بررسی MIC از هر یک از آنتی بیوتیک های متصل به نانوذرات طلا، آنتی بیوتیک

خالص و نیز نانوذرات طلا به تنهایی بدون هیچ متغیری، استفاده شد. محلول آنتی بیوتیک با غلظت نهایی ۱ mg/ml مورد استفاده قرار گرفت. سپس از هر محلول، به میزان ۱۰۰ µl در ردیف اول و چاهک اول از سمت چپ اضافه شد، و پس از مخلوط نمودن، ۱۰۰ µl از این محلول به خانه شماره ۲ از همان ردیف بصورت افقی اضافه گردید. این روند تکرار و تهیه رقت تا چاهک شماره ۱۰ ادامه یافت. نهایتاً از چاهک شماره ۱۰ جهت تیتراسیون صحیح، ۱۰۰ µl دور ریخته شد. به تمام این چاهک ها ۱۰ µl از کشت مایع مغذی ۲۴ ساعته باکتری ها با کدورت مشخص استاندارد لوله ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. چاهک ۱۱ نیز به عنوان کنترل منفی انتخاب شد و تنها دارای ۱۰۰ µl محیط کشت نوترینت برات استریل بود. چاهک شماره ۱۲ به عنوان کنترل مثبت انتخاب شد، که حاوی ۱۰۰ µl محیط کشت به همراه باکتری بود تا توانایی رشد باکتری ها بررسی شود. سپس پلیت ها جهت رشد در گرمخانه با دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. علاوه بر این بلانک مورد استفاده برای انجام اسپکتروفوتومتر، ۱۰۰ µl محیط کشت به همراه ۱۰ µl از سوسپانسیون هر باکتری در چاهک مخصوص به آن باکتری بود که دقیقاً پیش از انجام اسپکتروفوتومتر تهیه گردید. سپس بوسیله اسپکتروفوتومتر جذب نوری تمامی چاهک ها در طول موج ۶۰۰ nm بررسی گردید و از عدد بدست آمده از نمونه بلانک کم شد (۸،۹).

بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات طلا به روش چاهک در آگار^۱ نیز بر روی ۴ سویه: *Staphylococcus aureus*، *Escherichiacoli*، *Bacillus cereus*، *Pseudomonas aeruginosa* انجام شد (۱۰). با استفاده از نرم افزار SPSS v.19 از لحاظ آماری، مقایسه میان خواص ضد میکروبی نانوذرات، نانوذرات متصل شده و آنتی بیوتیک استرپتومایسین برای هر باکتری انجام شد. سطح معنی داری در این آزمون ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

■ یافته ها

نتایج مطالعات حاضر نشان داد که در شرایط بهینه با pH=9، سوبسترا غلظت ۳/۵ mmol و در دمای ۳۰°C و زمان ۴۸ ساعت، نانوذرات طلا بعد از اضافه نمودن کلرواوریک اسید به سوسپانسیون

^۱ Sabouraud Dextrose Broth: SDB

^۲ X-ray Diffraction Analyser: XRD

^۳ Transmission Electron Microscope: TEM

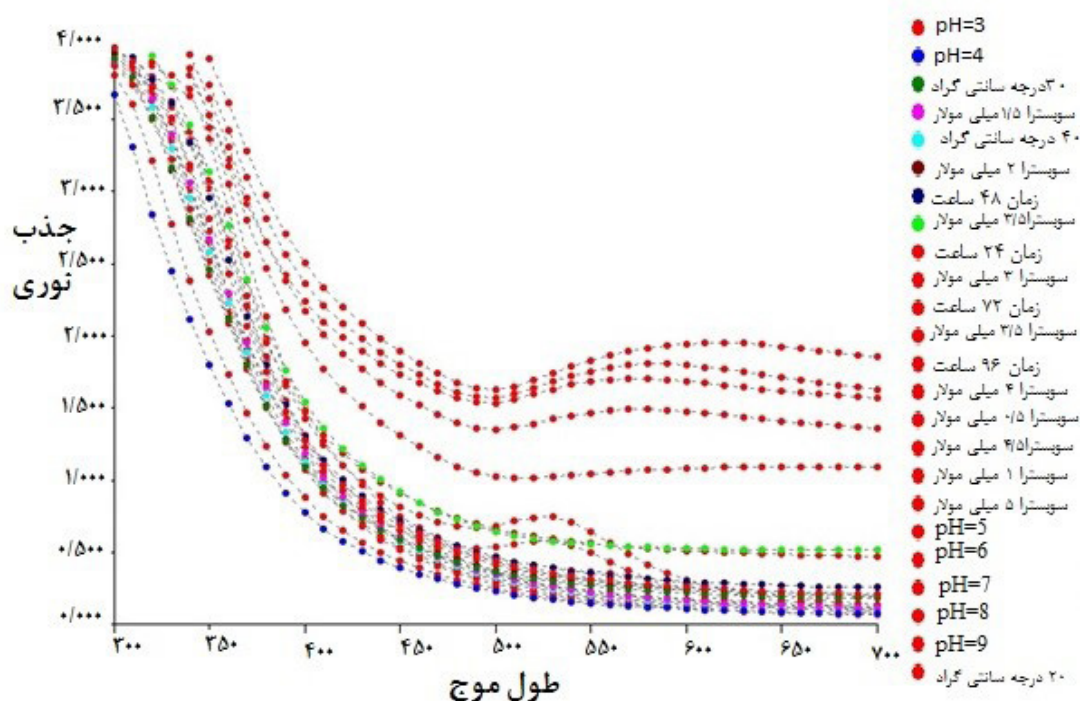
^۴ Fourier Transform Infrared Spectroscopy: FTIR

^۵ Minimal Inhibitory Concentration: MIC

^۱ Agar Well Diffusion Plate

نمودار شماره ۱ بهینه‌سازی ۴ فاکتور pH، سوبسترا، زمان و دما را نشان می‌دهد.

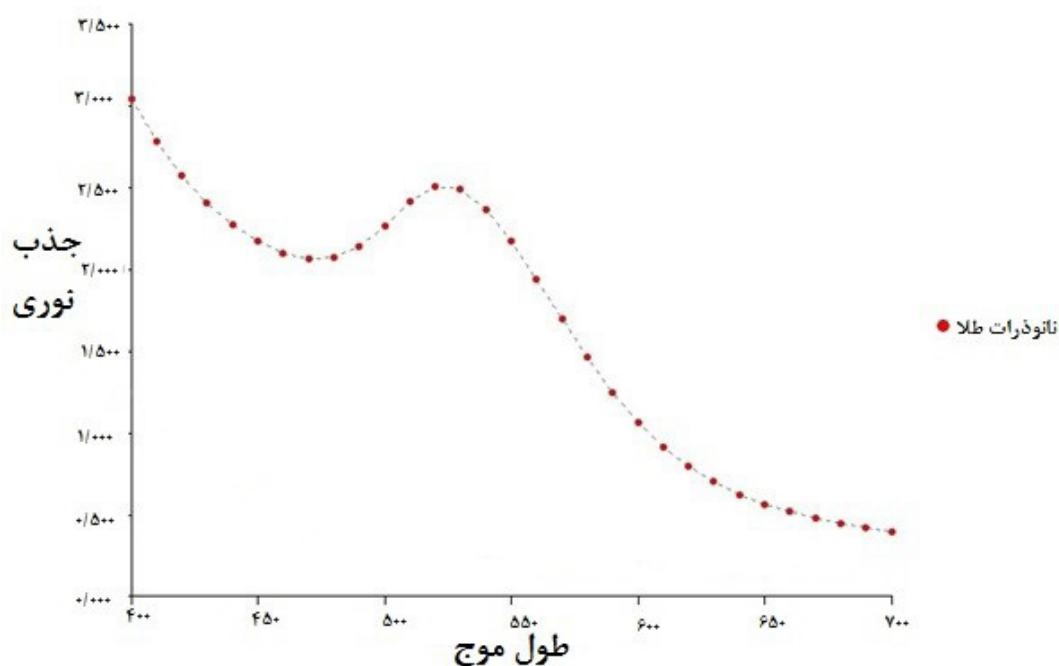
میکروبی *Fusarium oxysporum* و اکسیژن‌رسانی با گذاشتن گرمخانه شیکردار با ۱۵۰ دور در دقیقه تولید خواهند شد که



نمودار شماره ۱- نمودار بهینه‌سازی بر اساس ۴ فاکتور pH، غلظت سوبسترا، زمان، دما

پیک جذب مشاهده شده برای نانوذرات طلا طول موج ۵۰۰ nm بوده است. نمودار شماره ۲ اسپکتروفوتومتری تولید شده توسط قارچ مذکور را نشان می‌دهد.

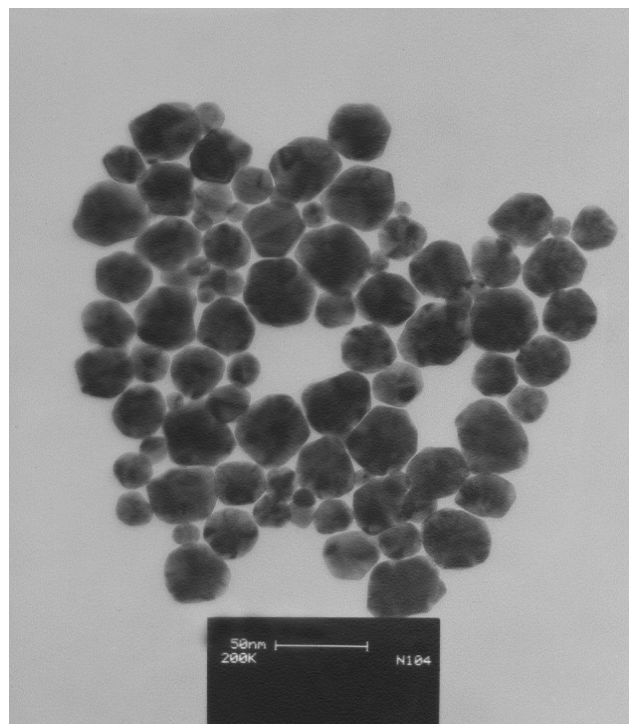
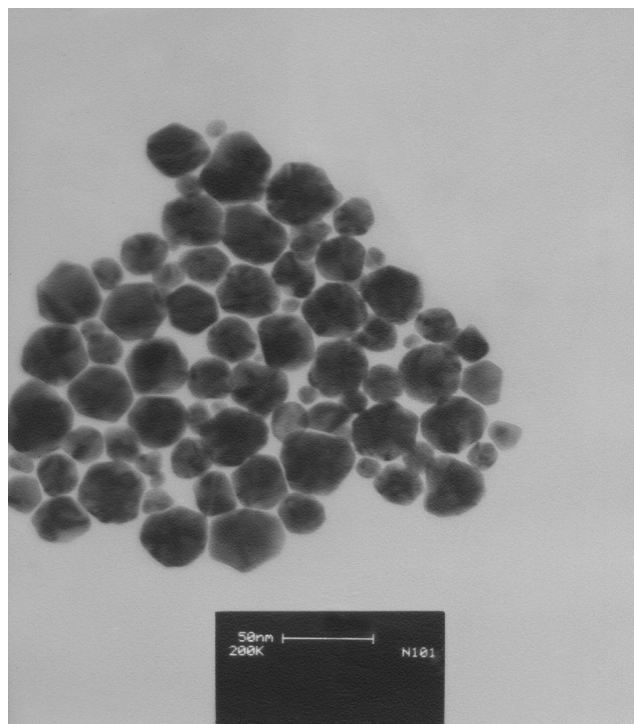
تولید نانوذرات با تغییر رنگ محیط از زرد به قرمز آلبالویی همراه بود. پس از مشاهده تغییر رنگ، نمونه‌ها توسط اسپکتروفوتومتر نانو دراپ در دامنه طول موج ۴۰۰-۶۰۰ nm بررسی شدند که حداکثر



نمودار شماره ۲- اسپکتروفوتومتری نانوذرات طلا حاصل از قارچ *Fusarium oxysporum*

تصویر میکروسکوپی از نانوذرات طلا تولید شده بوسیله قارچ

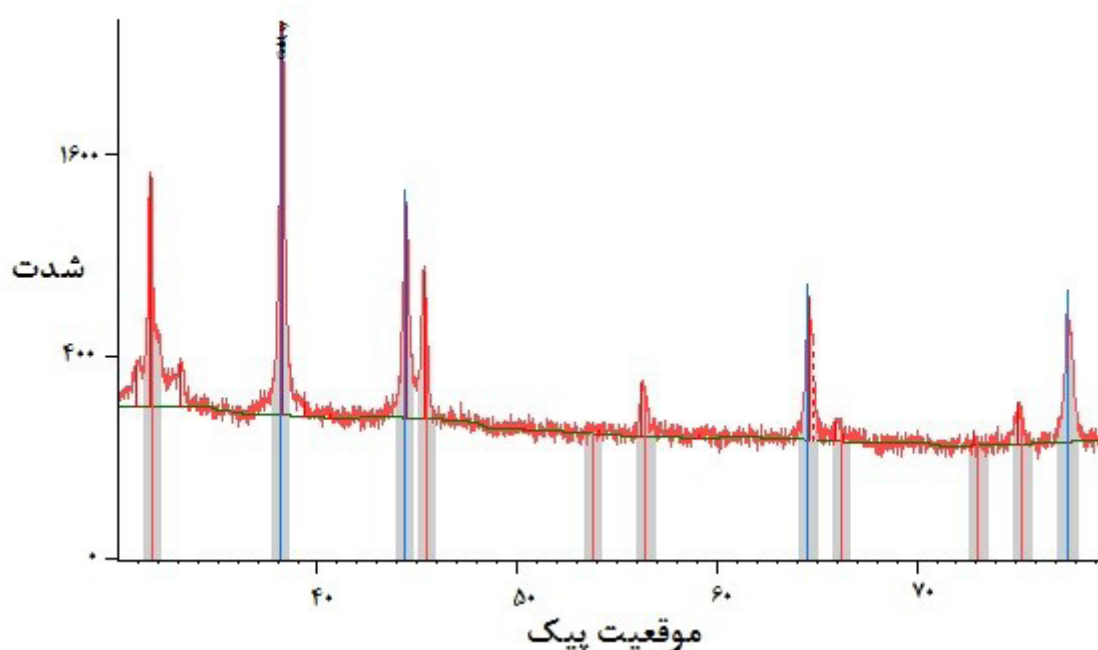
F. oxysporum در شکل شماره ۱ آمده است.



شکل شماره ۱- نتایج عکسبرداری توسط TEM از نانوذرات طلا. نانوذرات تولیدی ابعادی کمتر از ۲۰ nm داشته و دارای اشکال کروی تا چند وجهی بودند.

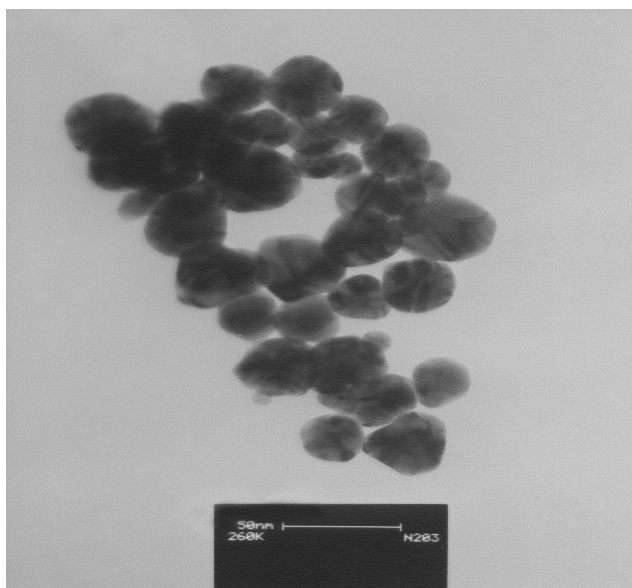
در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است، نانوذرات طلا دارای چهار پیک مشخص بوده‌اند، که نشان دهنده حضور شکل بلوری و چهار وجهی آنها است.

تصاویر نشان می‌دهد که نانوذرات به شکل کروی یا شش‌وجهی می‌باشد و اندازه نانوذرات بطور متوسط بین ۲۵-۳۰ nm است و همچنین همانگونه که از نتایج پراش پرتو ایکس بدست می‌آید و

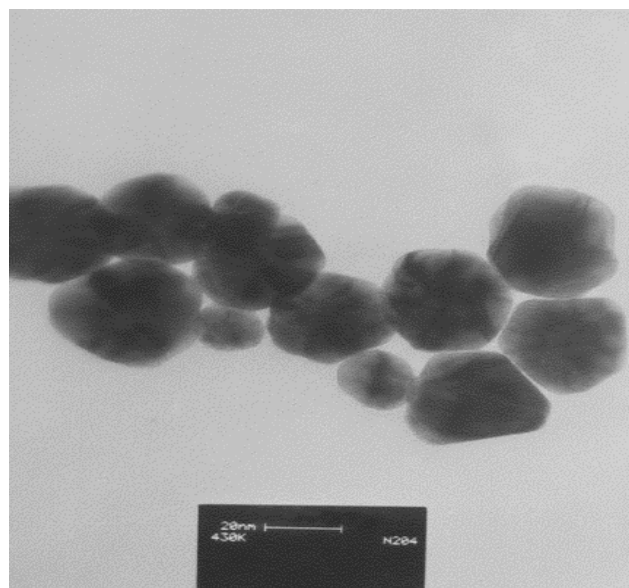


نمودار شماره ۳- نتایج پراش اشعه ایکس برای نانوذرات طلا

الکترونی عبوری تأیید شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی بدست آمده از نانوذرات اتصال یافته به آنتی بیوتیک استرپتومایسین پس از ۱۸ ساعت هم زدن در شکل شماره ۲ آمده است.



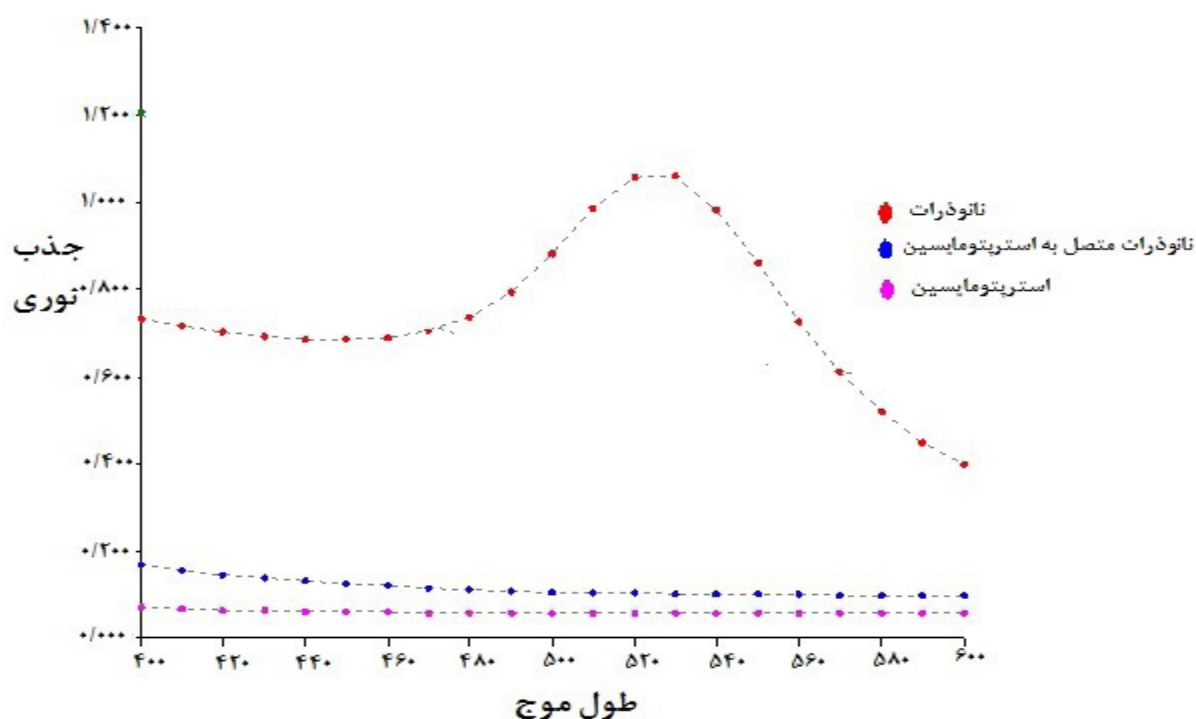
در مطالعه حاضر با تولید نانوذرات توسط قارچ *F. oxysporum* و اتصال نانوذرات به آنتی بیوتیک استرپتومایسین به راحتی و بدون نیاز به هیچگونه پوشش و یا اتصال دهنده‌ای انجام گرفت و بوسیله اسپکتروفتومتر، اسپکتروفتومتر مادون قرمز و میکروسکوپ



شکل شماره ۲- عکسبرداری از نانوذرات طلا پس از اتصال به آنتی بیوتیک استرپتومایسین بوسیله TEM. اندازه نانوذرات بطور متوسط بین ۵۰-۱۵۰ nm است.

۵۰-۱۵۰ nm است. تصاویر حاکی از اتصال موفقیت آمیز نانوذرات طلا به آنتی بیوتیک استرپتومایسین می باشد.

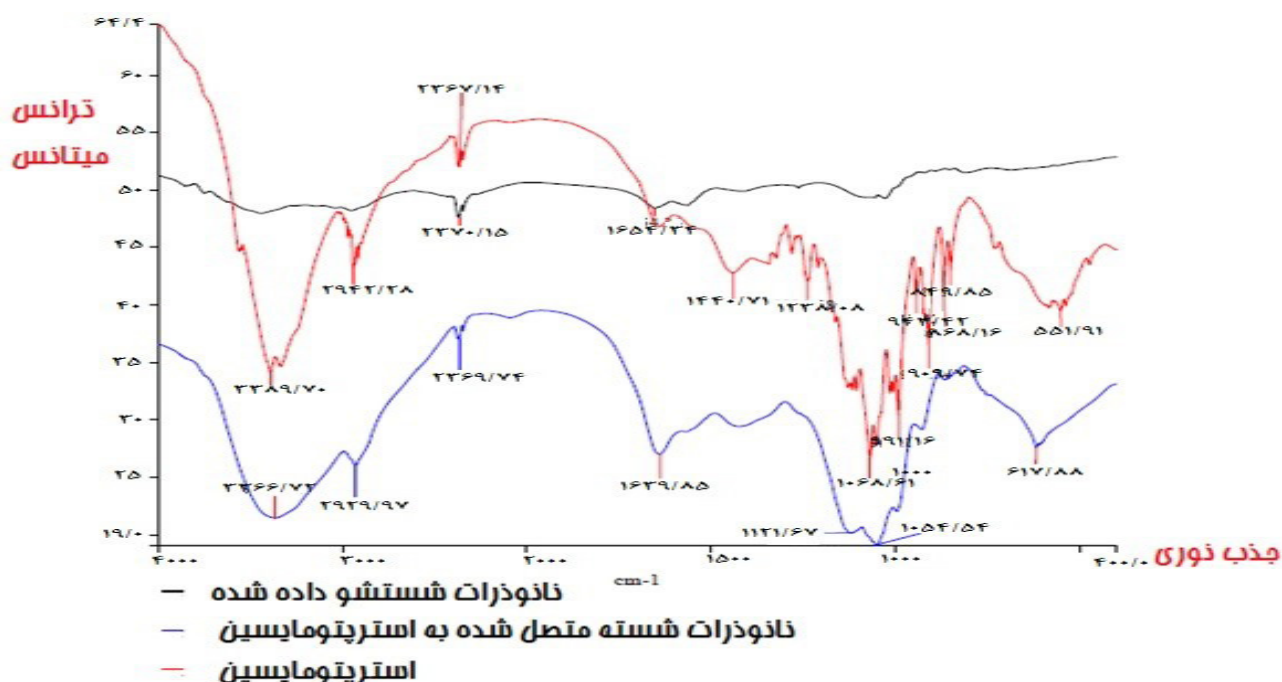
تصاویر نشان می دهند که اندازه نانوذرات پس از اتصال آنتی بیوتیک به آنها بزرگتر دیده می شوند و اندازه نانوذرات بطور متوسط بین



نمودار شماره ۴- نمودار مقایسه نانوذرات، نانوذرات متصل شده به آنتی بیوتیک استرپتومایسین، آنتی بیوتیک استرپتومایسین

آنها به میزان جذب محلول آنتی بیوتیک نزدیک می باشد که بیانگر اتصال نانوذرات به آنتی بیوتیک و خروج آنها از حالت نانو به میکرومتر می باشد.

نتایج اسپکتروفتومتری در نمودار شماره ۴ نشان می دهد نانوذرات طلا شستشو داده شده پس از گذشت ۱۸ ساعت از افزودن آنتی بیوتیک استرپتومایسین، میزان جذب اندک داشته و جذب



نمودار شماره ۵- مقایسه بین ۳ نمونه نانوذرات طلا شستشو داده شده، آنتی بیوتیک استرپتومایسین و نانوذرات شستشو داده شده و متصل به استرپتومایسین

آنتی بیوتیک به تنهایی در هر باکتری عملکرد متفاوتی داشت و در مورد ۴ باکتری استفاده شده گرم مثبت و گرم منفی، افزایش اثری در نانوذرات متصل شده به آنتی بیوتیک نسبت به استرپتومایسین به تنهایی دیده نشد. جدول شماره ۱ میانگین قطر هاله عدم رشد را در باکتری ها نشان می دهد.

همچنین نتایج اسپکتروفتومتری مادون قرمز در نمودار شماره ۵ نشان داد که گروه آمین در اثر اتصال به نانوذرات به طول موج بلندتر (عدد موج کوتاه تر) شیفت پیدا نموده و پیک آمینی پهن تر شده است، که نشان دهنده درگیر بودن گروه آمینی با گروه دیگر می باشد. در نهایت اثر ضد باکتریایی نانوذرات متصل شده به

جدول شماره ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد در مورد محلول نانوذرات طلا، آنتی بیوتیک استرپتومایسین، نانوذرات طلا متصل شده به آنتی بیوتیک استرپتومایسین بر روی هر ۴ سویه از باکتری ها

نام باکتری	نوع محلول مورد آزمایش	انحراف معیار $\pm$ میانگین
<i>E.Coli</i>	نانوذرات	—
<i>E.Coli</i>	نانوذرات متصل به آنتی بیوتیک استرپتومایسین	24 ± 1
<i>E.Coli</i>	آنتی بیوتیک استرپتومایسین	$24/66 \pm 1/14$
<i>Paeruginosa</i>	نانوذرات	—
<i>Paeruginosa</i>	نانوذرات متصل به آنتی بیوتیک استرپتومایسین	—
<i>Paeruginosa</i>	آنتی بیوتیک استرپتومایسین	—
<i>S.aureus</i>	نانو ذرات	—
<i>S.aureus</i>	نانوذرات متصل به آنتی بیوتیک استرپتومایسین	—
<i>S.aureus</i>	آنتی بیوتیک استرپتومایسین	$24/66 \pm 1/14$
<i>B.cereus</i>	نانو ذرات	—
<i>B.cereus</i>	نانوذرات متصل به آنتی بیوتیک استرپتومایسین	16 ± 1
<i>B.cereus</i>	آنتی بیوتیک استرپتومایسین	$18/66 \pm 1/14$

نتایج MIC نیز که مشابه با نتایج روش چاهک در پلیت بود در جداول ۲ و ۳ آمده است.

جدول شماره ۲- نتایج MIC نمونه‌های موجود در پلیت ۱

نوع ماده	باکتری	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	کنترل مثبت	کنترل منفی
نانوذرات شستشو داده شده	<i>E. coli</i>	۰/۳۰۰	۰/۳۰۵	۰/۳۰۷	۰/۳۰۸	۰/۳۱۰	۰/۳۱۱	۰/۳۱۳	۰/۳۱۴	۰/۳۱۵	۰/۳۱۶	۰/۳۱۷	۰/۰۳
نانوذرات شستشو داده شده و متصل به استرپتومایسین	<i>E. coli</i>	۰/۰۰۲	۰/۰۴۶	۰/۰۳۵	۰/۰۴۷	۰/۰۶۳ MIC	۰/۰۸۴	۰/۰۹۱	۰/۰۹۹	۰/۱۰۱	۰/۲۱۵	۰/۳۱۷	۰/۰۶۰
استرپتومایسین	<i>E. coli</i>	۰/۰۰۳	۰/۰۳۲	۰/۰۳۵	۰/۰۳۶	۰/۰۳۷	۰/۰۳۹	۰/۰۴۲ MIC	۰/۰۵۳	۰/۱۲۲	۰/۲۶۳	۰/۳۱۷	۰/۰۴۵
نانوذرات شستشو داده شده	<i>B. cereus</i>	۰/۹۰۰	۰/۹۰۸	۰/۹۱۲	۰/۹۱۴	۰/۹۱۵	۰/۹۲۰	۰/۹۲۵	۰/۹۳۰	۰/۹۴۲	۰/۹۵۶	۰/۹۶۷	۰/۰۲
نانوذرات شستشو داده شده و متصل به استرپتومایسین	<i>B. cereus</i>	۰/۰۰۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۵	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲ MIC	۰/۱۲۲۰	۰/۵۴۲	۰/۷۱۰	۰/۸۰۱	۰/۸۲۲	۰/۹۶۷	۰/۰۱
استرپتومایسین	<i>B. cereus</i>	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۰/۰۰۶	۰/۰۱۱ MIC	۰/۸۱	۰/۹۳۲	۰/۹۱۵	۰/۹۹۲	۰/۹۴۹	۰/۹۶۷	۰/۰۱
نانوذرات شستشو داده شده	<i>S. aureus</i>	۰/۵۰۰	۰/۵۰۲	۰/۵۱۰	۰/۵۱۳	۰/۵۱۷	۰/۵۲۲	۰/۵۳۰	۰/۵۳۷	۰/۵۴۲	۰/۵۴۹	۰/۵۵۲	۰/۰۴
نانوذرات شستشو داده شده و متصل به استرپتومایسین	<i>S. aureus</i>	۰/۵۰۵	۰/۵۰۷	۰/۵۱۵	۰/۵۲۰	۰/۵۲۲	۰/۵۳۰	۰/۵۳۷	۰/۵۴۰	۰/۵۴۵	۰/۵۴۹	۰/۵۵۲	۰/۰۵۱

جدول شماره ۳- نتایج MIC نمونه‌های موجود در پلیت ۲

نوع ماده	باکتری	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	کنترل مثبت	کنترل منفی
استرپتومایسین	<i>S. aureus</i>	۰/۰۴۵ MIC	۰/۳۱۸	۰/۳۳۹	۰/۳۴۲	۰/۳۴۷	۰/۳۵۰	۰/۴۰۰	۰/۴۵۶	۰/۴۹۹	۰/۵۲۰	۰/۵۵۲	۰/۰۵
نانوذرات شستشو داده شده	<i>Paeruginosa</i>	۱/۱۰۰	۱/۱۴۲	۱/۱۵۷	۱/۱۶۳	۱/۱۶۸	۱/۲۰۰	۱/۲۳۰	۱/۲۵۰	۱/۳۱۰	۱/۳۵۰	۱/۴۴۹	۰/۰۵
نانوذرات شستشو داده شده و متصل به استرپتومایسین	<i>Paeruginosa</i>	۱/۱۴۶	۱/۱۵۷	۱/۱۹۰	۱/۲۳۹	۱/۲۰۵	۱/۱۱۹	۱/۲۴۷	۱/۲۱۳	۱/۳۰۱	۱/۴۴۵	۱/۴۴۹	۰/۰۲۴
استرپتومایسین	<i>Paeruginosa</i>	۱/۹۹۸	۱/۲۰۳	۱/۲۰۸	۱/۲۱۲	۱/۲۲۰	۱/۲۴۳	۱/۲۵۰	۱/۲۷۱	۱/۳۷۲	۱/۴۲۶	۱/۴۴۹	۰/۰۰۶

جدول ۴، ۵ و ۶ آنالیز آماری نتایج را در ۳ باکتری *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* نشان می‌دهند.

جدول ۴، ۵ و ۶ آنالیز آماری نتایج را در ۳ باکتری *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* نشان می‌دهند.

جدول شماره ۴- مقایسه اثر هر ۳ محلول بر روی باکتری *Escherichia coli*

محلول‌ها	دفعات تکرار	۱	۲	۳	سطح معنی‌داری ۰/۰۵
نانوذرات	۳	۰/۰۰۰۰			
نانوذرات متصل شده	۳		۱/۰۰۰۰		
آنتی‌بیوتیک	۳		۱/۰۰۰۰		

جدول شماره ۵- مقایسه اثر هر ۳ محلول بر باکتری *Staphylococcus aureus*

محلول‌ها	دفعات تکرار	۱	۲	۳	سطح معنی‌داری ۰/۰۵
نانوذرات	۳	۰/۰۰۰۰			
نانوذرات متصل	۳	۰/۰۰۰۰			
آنتی‌بیوتیک	۳		۰/۰۴۰۰		

جدول شماره ۶- مقایسه اثر هر ۳ محلول بر روی باکتری *Bacillus cereus*

محلول‌ها	دفعات تکرار	۱	۲	۳	۴	۵	سطح معنی‌داری ۰/۰۵
نانوذرات	۳	۰/۰۰۰۰					
نانوذرات متصل	۳		۰/۰۴۳۱				
آنتی‌بیوتیک	۳			۰/۰۵۰۰			

■ بحث

با استفاده از قارچ *F. oxysporum* می‌توان نانوذرات طلا را به راحتی با زمان کم و به مقدار زیاد تولید نمود. در میان قارچ‌های مختلف، *F. oxysporum* تنها قارچی است که بیشترین توانایی تولید نانوذرات متفاوت را دارا می‌باشد. این نانوذرات بصورت خارج سلولی تولید و شامل انواع ذرات طلا، نقره، آلیاژ طلا و نقره، سیلیس، تیتانیوم، زیرکونیوم، مگنتیت، اکسید بیسموت $(\text{Bi}_2\text{O}_3)\text{III}$ ، استرانسیوم و باریوم می‌باشند (۱۱).

جهت تأیید تولید نانوذرات توسط میکروارگانیسم مورد آزمون، چندین روش مورد استفاده قرار گرفت که یکی از آنها استفاده از روش ساده اسپکتروفوتومتری بود. از طریق روش اسپکتروفوتومتری به دلیل رزونانس پلاسمون سطحی ذرات، می‌توان تولید نانوذرات نقره و طلا را در محیط کشت میکروارگانیسم‌ها پیگیری نمود (۱۲). پس از ایجاد تغییر رنگ در محیط واکنش، بررسی اسپکتروفوتومتری نانو درآپ انجام شد که نانوذرات تولیدی دارای بیشینه جذب در

دامنه ۵۵۰-۵۰۰ nm بودند.

آزمون دیگری که جهت تأیید تولید نانوذرات مورد استفاده قرار گرفت، پراش اشعه ایکس بود. این آزمون یک روش غیر تخریبی با چند کاربرد است که اطلاعات جامعی درباره ترکیب شیمیایی و ساختار کریستالی مواد طبیعی و صنعتی ارائه می‌دهد. در ادامه جهت بررسی شکل و اندازه نانوذرات تولیدی از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. در تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی عبوری، نانوذرات به فرم شش گوشه و کروی مشاهده شدند و در تمام تصاویر، نانوذرات با اشکال دیگر مشاهده نشد (۱۳).

از عوامل بسیار اساسی در تعیین اندازه نانوذرات تولیدی می‌توان به نوع میکروارگانیسم، عوامل محیطی مانند غلظت و محتویات محیط کشت، pH، واکنش دهنده‌های موجود در محیط، دما، زمان گرمخانه‌گذاری، حضور یا عدم حضور منبع نور و بهم‌زنی محیط اشاره نمود (۱۴، ۱۵).

دراپ و همچنین میکروسکوپ الکترونی این تغییر را تأیید کردند. همچنین در تحقیقات مشابه که توسط Bhattacharya و همکارانش صورت گرفت برای تأیید اتصال نانوذرات طلا تولیدی به روش شیمیایی به آنتی بیوتیک از روش های روشنائی هیدردینامیکی^۱ و همچنین تغییر رنگ (رزونانس پلاسمون سطحی) و مطالعات میکروسکوپ الکترونی استفاده کردند. رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات طلا در ۵۲۶ بدست آمد و رنگ قرمز شرابی به ارغوانی تغییر رنگ داد که این تغییر به دلیل پلاسمون سطحی می باشد. در بررسی های TEM زمانی که نانوذرات طلا به آنتی بیوتیک ها متصل شدند ذرات بزرگتری مشاهده گردید و در میکروسکوپ الکترونی اسکن الکترون^۲ سازه های مجزا برای هر ۳ آنتی بیوتیک متصل شده با نانوذرات بدست آمد، که استرپتومایسین متصل شده به نانوذرات، ساختار میله-مستطیل را نشان داد (۱۶). علاوه بر این باید خاطر نشان کرد که جهت انجام فرایند اتصال آنتی بیوتیک ها به نانوذرات زیستی از هیچ نوع حاملی جهت اتصال استفاده نشد. می توان خاطر نشان کرد که نانوذرات زیستی تولید شده توسط قارچ *F.oxysporum* به علت داشتن آنزیم های قارچی و پروتئین های متفاوت ترشحاتی در سطح خود باعث عملکرد اتصال شده اند که در نتایج اسپکتروفتومتری مادون قرمز وجود این پروتئین ها اثبات شده است. نتایج تفسیر اسپکتروفتومتری مادون قرمز نانو ذرات متصل به آنتی بیوتیک استرپتومایسین به شرح زیر است:

مقایسه میان نانوذرات با نانوذرات متصل به آنتی بیوتیک استرپتومایسین

همانگونه که در نمودار شماره ۳ مشاهده می شود، نانوذرات شستشو داده شده حداقل دارای ۸ موقعیت باند کششی می باشد که در مورد برخی از این موقعیت ها در ذیل بحث خواهد شد. اولین موقعیت باند در 1654 cm^{-1} می باشد. این پیک در مورد نانوذرات شستشو داده شده و متصل به آنتی بیوتیک در موقعیت 1639 cm^{-1} قرار دارد و ناشی از آمید نوع اول بوده و نشان دهنده آمید پروتئین پوشش دهنده موجود در سطح نانوذرات می باشد که توسط قارچ تولید شده است. در مقاله Rastogi وجود این باند به دلیل وجود

در مطالعه حاضر با توجه به اهمیت شرایط ذکر شده در تولید نانوذرات از قارچ *F.oxysporum* بهینه سازی صورت گرفت. طی بهینه سازی مایع رویی حاصل از رشد قارچ ها در معرض غلظت های متفاوتی از یون های هیدروژن قرار گرفت. نتایج نشان داده که تولید نانوذرات در pH های نزدیک به خنثی تا قلیایی بهتر از pH های اسیدی رخ داده است بطوریکه نانوذرات در $\text{pH}=9$ تولید بالایی را نشان دادند. در مورد تغییرات غلظت سوبسترا نیز نتایج نشان داد که با افزایش غلظت، میزان تولید نانوذرات نیز بالاتر بود. سپس با افزایش غلظت سوبسترا از حد مشخصی میزان تولید بصورت ثابت باقی ماند و در بعضی موارد کمتر شد. نتایج حاکی از آن بود که در غلظت نهایی $3/5\text{ mmol}$ نمک طلا، تولید نانوذرات مناسب بوده است که احتمالاً به دلیل رقابت بر سر جایگاه های فعال آنزیم و سوبسترا اضافی می باشد (۳). همچنین در بهینه سازی بر اساس زمان و دما، بهترین تولید نانوذرات به ترتیب در زمان ۴۸ ساعت و دمای 30°C انجام شد. البته نتایج نشان داد که پس از یک ساعت قرار دادن نمونه در شیکر انکوباتور، محلول به رنگ قرمز آلبالویی تغییر رنگ داد، ولی بهترین حالت تولید نانوذرات در طی ۴۸ ساعت مشاهده گردید. نانوذرات تولیدی تحت شرایط بهینه شستشو و جهت اتصال به آنتی بیوتیک مورد استفاده قرار گرفت. مشابه مطالعه حاضر، پژوهش Rastogi و همکارانش در سال ۲۰۱۲ بود که نانوذرات طلا تولید شده به روش شیمیایی و پوشش داده شده با پروتئین سرم آلبومین گاوی را به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی متصل نمود.

سپس در همین سال Bhattacharya و همکارانش نیز به بررسی اتصال نانوذرات طلا شیمیایی بدون استفاده از هیچگونه پوششی به آنتی بیوتیک های استرپتومایسین، کانامایسین، و آمپی سیلین پرداختند (۱۰، ۱۶). در پژوهش حاضر همسو با روش کار Rastogi، پس از چکاندن آنتی بیوتیک بصورت قطره قطره بر روی نانوذرات تغییر رنگ آبی در محلول مشاهده شد و پس از ۱۸ ساعت بهم زنی محلول، نمونه ها سفید شدند که این خود نشان دهنده اتصال موفقیت آمیز آنتی بیوتیک ها به نانوذرات است (۱۰). احتمالاً دلیل این تغییر رنگ از صورتی به آبی و سپس بی رنگ تشکیل ذرات درشت از نانوذرات و ایجاد میکروذراتی است که دیگر خاصیت رزونانس پلاسمون سطحی ندارند، که نتایج اسپکتروفتومتری نانو

^۱ Dynamic Light Scattering: DLS^۲ Scanning Electron Microscopy: SEM

نیز مقاومت کرده‌اند. همچنان که از نتایج آماری هاله‌های عدم رشد برمی‌آید نتایج نشان می‌دهد نانوذرات متصل شده به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین، با آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به تنهایی در باکتری *Escherichia coli* با هم اختلاف معنی‌داری نداشته‌اند و اتصال باعث افزایش اثر این دارو روی باکتری مذکور شده است و میزان $P < 0.05$ می‌باشد. در باکتری *Staphylococcus aureus* آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به تنهایی دارای عملکرد بالاتری نسبت به نانوذرات متصل شده بوده است و میزان $P < 0.05$ گزارش شد. همچنین در باکتری *Bacillus cereus* آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین از نانوذرات متصل شده بهتر عمل کرده و دارای اختلاف معنی‌داری بود. باکتری *Pseudomonas aeruginosa* نسبت به تمامی محلول‌ها از خود مقاومت نشان داد. نتایج حاصل از این گروه نشان می‌دهد که افزایش خواص ضد باکتریایی در حالت متصل در هر باکتری متفاوت عمل کرده است.

■ نتیجه‌گیری

امروزه با توجه به ایجاد مقاومت‌های دارویی علیه سویه‌های میکروبی، دستیابی به روش‌های مناسب که بتواند علیه سویه‌های مقاوم مقابله نماید احساس می‌گردد. در مطالعه حاضر نانوذرات طلا با موفقیت و بدون اتصال دهنده به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین متصل شدند. در بررسی اثر ضد میکروبی آنها، نانوذرات متصل شده به آنتی‌بیوتیک در سویه‌های مختلف متفاوت عمل نموده است. با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش و در بررسی‌های بیشتری که در آینده به عمل خواهد آمد امید است بتوان بدون استفاده از اتصال دهنده‌ها و لینکرهای متفاوت، نانوذرات را به داروهای مختلف از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها متصل نمود و داروهایی با خواص ضد میکروبی علیه سویه‌های مقاوم به دارو تولید کرد. بررسی اتصال نانوذرات با اشکال مختلف به دارو و بکارگیری از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از دیگر اهداف پیش رو می‌باشد.

■ تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز نوآوری پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشکده داروسازی فردوسی مشهد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

آلبومین که نوعی پوشش دهنده پروتئینی است مشاهده شده است که مزیت پژوهش کنونی نیز این است که بدون هیچ نوع اتصال دهنده و پوشش دهنده اضافی، آنتی‌بیوتیک از طریق پروتئین‌های پوشش قارچی به نانوذرات اتصال یافته است. طبق مقاله Rastogi، نانوذرات شستشو داده شده در پیک 1654 cm^{-1} دارای درصد ترانس میتانس T48 است که هنگام اتصال نانوذرات شستشو داده شده به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به T27 افزایش پیدا کرده است که این مطلب نیز نشان دهنده انجام واکنش می‌باشد (۱۰).

مقایسه میان نانوذرات متصل به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین با آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین

همانطور که در نمودار شماره ۳ مشخص است گروه آمین موجود در استرپتومایسین در موقعیت باند کششی 3389 cm^{-1} می‌باشد، در اثر اتصال به نانوذرات پیک این گروه به طول موج بلندتر که همان عدد موج کوتاه‌تر است شیف‌ت پیدا نموده است که این عدد در نانوذرات متصل شده با آنتی‌بیوتیک به موقعیت باند کششی 3366 cm^{-1} شیف‌ت پیدا کرده است و پیک آمین نیز در این حالت پهن‌تر می‌باشد که نشان دهنده این است که در اثر اتصال، پیوند آمینی با یک گروه دیگر درگیر شده است (۱۰).

تحقیقات Rastogi و همکارانش نشان دادند که بعد از تهیه محلول متصل آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی با نانوذرات طلا رنگ محلول به آبی گرایش پیدا نموده است و گزارش شد که جهت اطمینان از عمل اتصال آنتی‌بیوتیک‌ها به نانوذرات استفاده از روش اسپکتروفتومتری مادون قرمز الزامی است. در این روش یکی از شواهدی که اتصال نانوذرات به استرپتومایسین را نشان می‌دهد، پیک مربوط به NH_2 است که گسترش پیدا نموده و به طول موج بالاتر منتقل شده است. براساس داده‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که گروه‌های آمین از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به پروتئین‌های موجود در سطح نانو ذرات طلا متصل شده‌اند. علاوه بر این بر اساس داده‌های اسپکتروفتومتری مادون قرمز، پوشش‌دهی نانوذرات طلا توسط پروتئین آلبومین سرم گاوی نیز تأیید شد (۱۰).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تأثیرات ضد باکتریایی به روش ایجاد چاهک در پلیت با نتایج MIC مطابقت داشته و نمونه‌هایی که دارای MIC نبوده و مقاومت داشته‌اند، در این روش



■ References

1. Gericke M, Pinches A. Microbial production of gold nanoparticles. *Gold Bulletin*, 2006;39(1):22-8.
2. Mollazadeh Moghaddam K. An introduction to microbial metal nanoparticle preparation method. *Journal of Young Investigators*, 2010;19(19):1-7. [Persian]
3. Zhang X, Yan S, Tyagi R, Surampalli RY. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*, 2011;82(4):489-94.
4. Sajjadi G, Shojaiee A, Fazeli MR, Amini J, Jamalifar H. Study of ability *Fusarium Oxysporum* in extracellular biosynthesis of silver nanoparticle in vitro. *Journal of Microbial World*, 2009;2(1):44-7. [Persian]
5. Hosseini MR, Schaffie M. Kinetic study of the biological copper removal from a copper sulfate solution in the form of copper sulfide nanoparticles. *Journal of separation science and engineering*, 2013;4(2):75-82. [Persian]
6. Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, et al. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol*. 2005;2:10.
7. Cui Y, Zhao Y, Tian Y, Zhang W, Lu X, Jiang X. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials*, 2012;33(7):2327-33.
8. Castro-Longoria E, Vilchis-Nestor AR, Avalos-Borja M. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;83(1):42-8.
9. Klancnik A, Piskernik S, Jersek B, Mozina SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods*. 2010;81(2):121-6.
10. Rastogi L, Kora AJ, Arunachalam J. Highly stable, protein capped gold nanoparticles as effective drug delivery vehicles for amino-glycosidic antibiotics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2012;32(6):1571-7.
11. Rautaray D, Sanyal A, Adyanthaya SD, Ahmad A, Sasstry M. Biological synthesis of strontium carbonate crystals using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Langmuir*. 2004;20(16):6827-33.
12. Kittel C. *Introduction to Solid State Physics*. Wiley; 2004.
13. Kathiresan K, Manivannan S, Nabeel M, Dhivya B. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009;71(1):133-7.
14. Sastry M, Ahmad A, Khan MI, Kumar R. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Curr Sci*. 2003;85(2):162-70.
15. Holmes JD, Smith PR, Evans-Gowing R, Richardson DJ, Russell DA, Sodeau JR. Energy-dispersive X-ray analysis of the extracellular cadmiumsulfide crystallites of *Klebsiella aerogenes*. *Arch Microbiol*. 1995;163(2):143-7.
16. Bhattacharya D, Saha B, Mukherjee A, Santra CR, Karmakar P. Gold nanoparticles conjugated antibiotics: stability and functional evaluation. *J Nanosci Nanotechnol*. 2012;2(2):14-21.

Assessment the Antibacterial Properties of the Gold Nanoparticles Produced by *Fusarium Oxysporum*, Conjugated Streptomycin

Nasrin Naimi Shamel¹, Samaneh Dolatabadi^{2*}, Parastoo Pourali³

1- MSc of Microbiology, Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.

3- Instructor, Department of Medical Sciences, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Sharhrood, Iran.

Received Date: 2016/04/23

Accepted Date: 2016/06/19

Abstract

Introduction and Aims

The development of eco-friendly methods for the synthesis of nanomaterial shape and size is an important field of nanotechnology. In the present study extracellular biosynthesis of gold nanoparticle was done by *Fusarium oxysporum* fungus strain and the obtained nanoparticles were conjugated with streptomycin. Finally, the anti-bacterial property of the conjugated gold nanoparticles, was studied.

Materials and Methods

Fusarium oxysporum cultured in Sabouraud Dextrose Broth (SDB) medium. Culture supernatant was subjected to chloroauric acid solution at the final concentration of 1 mmolar. Mixture was used to confirm the presence of nanoparticles with spectrophotometry methods, X-ray diffraction analysis (XRD) and Transition Electron Microscope (TEM). Conjugation of the antibiotics with gold nanoparticles was confirmed through spectrophotometry methods, TEM and infrared spectroscopy (FTIR). Minimal Inhibitory Concentration (MICs) of the mixtures evaluated by broth dilution methods and agar well diffusion plate.

Results

Gold nanoparticles had spectral absorption peak around 530 nm wavelength. XRD results confirmed presence of the elemental gold in the mixture and TEM images have shown the nanoparticles were spherical or hexagonal and their sizes were around 25-30 nanometer. Spectrophotometry, TEM and FTIR results confirmed the conjugation process. Based on the structure of the used antibiotics and the tested bacterial strains, gold nanoparticles that were conjugated with the antibiotics had different antibacterial properties.

Conclusion

Biological production of gold nanoparticles by *Fusarium oxysporum* can be done and conjugation of gold nanoparticles with streptomycin confirmed without any additional linkers.

Keywords

biosynthesis, metal nanoparticles, streptomycine

* Corresponding Author: Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Department of Biology.

Email: S_dolatabadi1436@yahoo.com