



اثرات ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی نانوذرات اکسید بیسموت تولید شده توسط باسیلوس سوبتیلیس بر روی سویه های سودوموناس آئروجینوسا جدا شده از عفونت زخم

لیلا فیروزی دالوند^۱، فرزانه حسینی^{۲*}، شهرام مرادی دهقی^۳، الهام سیاسی تربتی^۲

^۱ دانشجوی دکتری، گروه میکروب شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، ^۲ استادیار، گروه میکروب شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، ^۳ دانشیار، گروه شیمی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: بیوسنتز نانوذرات با روش های زیستی توسط میکروارگانیسم ها به دلیل سازگاری بالا با محیط زیست و کاهش مصرف انرژی و هزینه ها از جایگاه ویژه ای برخوردار است. هدف از این پژوهش تعیین اثر نانوذرات اکسید بیسموت سنتز شده به روش سبز بر روی باکتری ایجاد کننده عفونت های بیمارستانی می باشد.

مواد و روش ها: در این پژوهش از نمونه های زخم بیماران مبتلا به عفونت سوختگی بستری در بیمارستان سوانح سوختگی مطهری ۱۶۰ نمونه جمع آوری گردید. سویه های مقاوم سودوموناس آئروجینوسا از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی شناسایی شدند. سنتز نانوذرات اکسید بیسموت به کمک سویه باسیلوس سوبتیلیس وحشی انجام گرفت. تشکیل نانوذرات اکسید بیسموت سنتز شده از طریق تکنیک های طیف سنجی مادون قرمز، پراش اشعه ایکس و میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد تأیید قرار گرفت. در نهایت، اثر ضدباکتریایی نانوذرات بر روی سویه های جدا شده به روش استاندارد دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نانوذرات سنتز شده با میانگین اندازه ۴۴ نانومتر توسط باسیلوس سوبتیلیس به دست آمدند. تمامی ۷۷ سویه ۴۴٪ (۷۱ سویه) سودوموناس آئروجینوسا جدا شده بیوفیلیم تشکیل دادند. نانوذرات اکسید بیسموت با غلظت ۲۰۰۰ ppm، بر روی ۵٪ سویه های سودوموناس آئروجینوسا اثر بازدارندگی داشت.

نتیجه گیری: با افزایش غلظت نانوذرات اکسید بیسموت اثر مهارکنندگی آن افزایش یافت. نتایج نشان داد که بین گروه های مورد مواجهه با نانوذرات و سیپروفلوکساسین تفاوت معنی داری وجود دارد.

واژگان کلیدی: نانو ذرات اکسید بیسموت، باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس آئروجینوسا، بیوفیلیم.

پذیرش برای چاپ: آبان ماه ۹۷

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۷

مقدمه

به همین دلیل نانوتکنولوژی و نانوبیوتکنولوژی یکی از زمینه های پژوهشی که امروزه بدان بسیار توجه می شود. سنتز ذرات با ابعاد نانومتری با ویژگی های ضد میکروبی که با عنوان نانوانتی بیوتیک شناخته می شوند، در تولید محصولات جدید بسیار مورد توجه هستند (۱).

در سال های اخیر به دلیل شیوع عفونت های ناشی از باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک، تحقیقات بسیاری برای ساخت و تولید ترکیبات ضد میکروبی جدید انجام شده است.

(* آدرس برای مکاتبه: ملایر تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۱۲۳۴۷۲۴۴۱
پست الکترونیک: fa_hosseini@iautnb.ac.ir



معدده و روده، همچنین ترکیبات متنوع از بیسموت برای درمان سفلیس و تومورها و درمان رادیوایزوتوپ استفاده می‌شوند. اخیراً نانوذرات بیسموت به عنوان مولکول‌های ضد میکروبی وسیع الطیف به کار برده می‌شوند (۹).

باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم است و نسبت به فرم پلانکتونیک خود مولکول‌هایی تولید می‌کنند که با سیستم ایمنی میزبان واکنش می‌دهند. به نظر می‌رسد که بیوفیلم ده هزار مرتبه نسبت به فرم پلانکتونیک خود نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌تر هستند. دلایل افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیوفیلم باکتریایی به طور کامل شناخته نشده است. عوامل متعددی موجب حفاظت از بیوفیلم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۱۰).

تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تولید زیستی نانوذرات اکسید بیسموت با استفاده از باکتری باسیلوس سوبتیلیس انجام نشده است. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید بیسموت سنتز شده با استفاده از باسیلوس سوبتیلیس جداسازی شده از خاک پارک جنگلی بر روی سویه‌های سودوموناس آنروجینوسا بالینی بود.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی باسیلوس سوبتیلیس از خاک: ۴۵ نمونه خاک از مناطق مختلف پارک جنگلی طالقانی شهر تهران از عمق ۱۰-۷ سانتی‌متری در شرایط استریل در ماه آذر سال ۱۳۹۵ جمع‌آوری و درون فالكون‌های استریل ۵۰ میلی‌لیتری به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها به وسیله الک استریلی به قطر ۲ میلی‌متر الک شدند. یک گرم خاک الک شده با استفاده از ترازوی دقیق وزن شد و در کنار شعله به لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. نمونه‌های سوسپانسیون خاک در بن ماری (حمام آب گرم) در درجه حرارت ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد تا بدین ترتیب تنها باکتری‌های اسپوردار خاک (شامل باسیلوس و کلاستریدیوم) باقی بمانند.

برای خلص‌سازی نمونه‌ها از روش پورپلیت (کخ) استفاده شد.

در حال حاضر روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای تولید نانوذرات شناخته شده‌اند. روش‌های فیزیکی و شیمیایی بسیار گران قیمت هستند و از مواد شیمیایی سمی و خطرناک استفاده می‌شود (۲). در حالی که در روش زیستی که نزدیک به روش شیمیایی است از باکتری، قارچ و عصاره گیاهان برای سنتز نانوذرات استفاده می‌شود. اخیراً سنتز زیستی نانوذرات در زمینه‌های تحقیقات پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در روش زیستی واکنش‌های اکسیداسیون یا کاهش از طریق آنزیم‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها یا مواد شیمیایی گیاهی انجام می‌شود (۳). در تولید زیستی، ترکیبات بیولوژیکی مختلف از جمله میکروپها کاندیدای مؤثری برای سنتز نانوذرات به شمار می‌آیند. روش زیستی تولید نانوذرات، مقرون به صرفه، آسان و سازگار با محیط زیست است (۴).

میکروارگانیسم‌ها برای سوخت و ساز و انجام فرآیندهای حیاتی خود از منابع آلی و معدنی موجود در محیط تغذیه می‌کنند. همچنین هنگامی که در معرض یون‌های فلزی قرار می‌گیرند توانایی کاهش فلزات و یا تجمع آن‌ها در درون یا بر روی دیواره سلولی می‌باشند. این انباشتگی اغلب منجر به تولید ذراتی می‌شود که در اندازه‌های نانو بسته بندی می‌شوند (۵). مشخص شده به دلیل کاهش اندازه نانوذرات، سطح تماس این ذرات افزایش می‌یابد و درکم‌ترین غلظت با سطح سلولی باکتریایی واکنش نشان می‌دهند (۶).

فلز بیسموت به صورت شکننده، کریستالی و طبیعی‌ترین دیامغناطیس می‌باشد. معمولاً بیسموت به صورت سولفید بیسموت، اکسید بیسموت و کربنات بیسموت یافت می‌شوند. بیسموت به عنوان فلز دارای مقاومت الکتریکی بالاست و هدایت حرارتی آن از هر فلزی دیگری بجز جیوه پائین‌تر است (۷). اکسید بیسموت در تکنولوژی از اهمیت بالایی برخوردار است و در ساخت شیشه، سرامیک و همچنین به عنوان کاتالیزور در اکسیداسیون هیدروکربن‌ها استفاده می‌شود در نتیجه از آن در برنامه‌های کاربردی به ویژه در میکروالکترونیک، تکنولوژی حس‌گرها استفاده می‌شود (۸).

ترکیبات بیسموت در پزشکی معمولاً برای درمان اختلالات

مایع (مرک، آلمان)، در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت کشت شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ در دمای ۴ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ شدند. مایع شفاف رومانند به دست آمده به منظور تولید نانوذرات اکسید بیسموت به روش خارج سلولی مورد استفاده قرار گرفت. سپس رومانند به دست آمده در فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتر به‌طور مساوی تقسیم شدند و در هر کدام از فالكون‌ها از غلظت‌های تهیه شده نیترا ت بیسموت با نسبت ۱۰٪ حجمی/حجمی اضافه شد و مجدداً در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. در صورت مشاهده تغییر رنگ در محیط کشت، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ در دمای ۴ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب به دست آمده سه بار با محلول (۰/۹٪ وزنی/حجمی کلرید سدیم) شسته شد و دوباره با شرایط یادشده سانتریفیوژ گردید. این کار برای حصول اطمینان حذف کامل سایر موارد اضافی انجام گرفت و رسوب به دست آمده به مدت ۲ تا ۳ روز در دمای ۴۰ درجه سلیسیوس قرار گرفت تا کاملاً خشک شد (۱۳و۱۴).

ه) *آزمون‌های تاییدی نانوذرات اکسید بیسموت*: پس از مشاهده تغییر رنگ محیط و تایید اولیه، پودر نانوذرات توسط دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز (Nicolet 8700, Thermo Scientific) در طول موج $400-4000 \text{ cm}^{-1}$ برای تشخیص پیوندهای بیسموت-اکسیژن و میکروسکوپ الکترونی روبشی (EM-3200, KYKY) ساختار، شکل و اندازه آن‌ها بررسی شدند (۱۵).

و) *بررسی مشخصات بلوری نانوذرات اکسید بیسموت توسط پراش اشعه ایکس*: در این مرحله، پودر تولید شده از رومانند باکتری به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سلیسیوس در کوره به منظور کلسینه شدن قرار داده شد (۱۶). سپس به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به منظور رسم نمودار و بررسی نمونه‌ها از لحاظ تعیین فاز کریستالی تشکیل شده توسط دستگاه پراش پرتو ایکس (STADI P, STOE) ارسال گردید و پس از مشخص شدن ساختار اندازه آن‌ها با فرمول دبی-شرر (Debye-Scherrer)

و در نتیجه رقت‌های سریالی در نه لوله تهیه شد. به این ترتیب رقت هر لوله قبل و بعد از خود ۰/۱ اختلاف داشت سپس برای هر لوله، پلیتی مجزا در نظر گرفته شد و به هر پلیت ۱ میلی‌لیتر از لوله مربوط به همان پلیت به اضافه ۲۰-۱۵ میلی‌لیتر از محیط نوترینت آگار (مرک، آلمان) مذاب با دمای حدود ۴۵ درجه سلیسیوس اضافه گردید. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوای گرماگذاری شدند (۱۱). کلنی‌های مشکوک با سطحی خشن انتخاب شدند و طی کشت ۴ مرحله‌ای در محیط نوترینت آگار خالص‌سازی گردیدند. پس از انجام رنگ آمیزی گرم آزمون‌های بیوشیمیایی به منظور شناسایی گونه باکتری استفاده گردید و برای اطمینان، هر آزمون سه بار تکرار شد (۱۲).

ب) *جدا سازی باکتری‌ها با قابلیت تحمل نیترا ت بیسموت*: برای بررسی قابلیت سوبیه‌های جدا شده از نظر تحمل بیسموت از محیط کشت بیسموت سولفید آگار (مرک، آلمان) استفاده شد. همچنین ۱۰۰ سی سی از محیط کشت نوترینت آگار تهیه گردید و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سلیسیوس به مدت ۲۰ دقیقه گرماگذاری شد. سپس در هنگام رسیدن دما به ۴۵ درجه سلیسیوس، نیترا ت بیسموت (مرک، آلمان) به مقدار ۰/۲٪ وزنی/حجمی اضافه گردید. سپس سوش باکتری جدا سازی شده از خاک بر روی محیط یاد شده به شکل خطی کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند (۱۳).

ج) *تهیه محلول نیترا ت بیسموت*: نیترا ت بیسموت ۵ آبه با غلظت‌های ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۵، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ مولار تهیه گردید. که برای تهیه این مقادیر به ترتیب مقدار ۰/۱۴، ۰/۲۴، ۱/۴۵ و ۲/۴۲ گرم از نمک نیترا ت بیسموت در بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری به وسیله آب مقطر به حجم رسانده شد و به عنوان پیش ماده در اختیار باکتری باسیلوس سوبتیلیس قرار داده شد (۱۳).

د) *سنتز نانوذرات اکسید بیسموت به روش خارج سلولی*: در ابتدا برای مشخص کردن بهترین غلظت از محلول آبی نیترا ت بیسموت سنتز شده، باکتری باسیلوس سوبتیلیس با غلظت نیم مک فارلند در فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت

محاسبه گردید (۱۵).

سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه (۳۵ سیکل) انجام گردید. نمونه‌های ژنوم استخراج شده با استفاده از سیستم الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. سپس ژل با مجاورت با اشعه ماورای بنفش در دستگاه ترانس ایلومیناتور با اندازه ۵۰۴ جفت باز مشاهده شد و مورد عکسبرداری قرار گرفت (۱۸).

ط) بررسی میزان مقاومت سویه‌های جداسازی شده مقاوم به آنتی‌بیوتیک: جهت بررسی هاله عدم رشد و تعیین میزان حساسیت به آنتی‌بیوتیک در ابتدا تمامی سویه‌های بالینی مورد بررسی پس از خالص سازی و دسترسی به کلنی‌های تک از آن‌ها، به صورت متراکم بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) که بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده تهیه گردیده بود، کشت داده شدند. با استفاده از روش انتشار دیسک (Kirby Bauer) و جدول استاندارد CLSI حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های زیر (شرکت پادتن طب) انجام پذیرفت: جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم) برای بررسی سویه سودوموناس آئروجینوسا تعیین گردید (۱۹). پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام با اندازه گیری قطر هاله مشخص گردید.

ی) روش دیسک گذاری جهت بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید بیسموت: به منظور بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات بیسموت تولید شده توسط باسیلوس، بر روی محیط مولر هیتون آگار یک میلی‌لیتر از کشت تلقیح باکتری سودوموناس آئروجینوسا به‌طور جداگانه به محیط کشت مولر هیتون آگار افزوده شد و سپس با کمک سوپ استریل بر روی محیط کشت به‌صورت متراکم کشت داده شد (مشابه روش آنتی‌بیوگرام). دیسک‌های بلانک از شرکت داروسازی پادتن طب تهیه شدند. قطر دیسک‌های مصرفی ۶ میلی‌متر بود. ۳۰ عدد از دیسک‌های بلانک استریل، در حجم ۰/۱ ppm از رقت‌های

جمع آوری نمونه از بیماران بستری در بیمارستان: نمونه گیری از عفونت زخم بیماران سوختگی بستری در بیمارستان سوانح سوختگی شهید مطهری شهر تهران از آذر ماه ۱۳۹۵ تا مرداد ۱۳۹۶ انجام گرفت. تعداد ۱۶۰ نمونه به کمک سوپاب و لانتست استریل جمع آوری شدند و در محیط انتقالی کری - بلیر (Cary- Blair transport medium) به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس از محیط ستریماید آگار (مرک، آلمان) برای جداسازی باکتری سودوموناس آئروجینوسا استفاده گردید. به منظور تعیین هویت سویه‌های جمع آوری شده از آزمون‌های افتراقی بیوشیمیایی استاندارد و واکنش زنجیره‌ای پلی مرز استفاده گردید (۱۷).

ح) شناسایی مولکولی: برای استخراج DNA ژنومی از کیت استخراج DNA شرکت پیشگام (ایران) مخصوص باکتری‌های گرم منفی استفاده شد. ژن *oprL* به منظور شناسایی باکتری سودوموناس آئروجینوسا استفاده شد. به منظور تکثیر این ژن از پرایمرهای F: 5'-ATGGAAATGCTGAAATTCGGC-3' و R: 5'-CTTCTTCAGCTCGACGCGACG-3' استفاده شد. برای ساخت پرایمرها ابتدا توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد نظر در سایت NCBI، بلاست شدند. سپس پرایمر مورد نیاز برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط شرکت پیشگام بیوتکنولوژی ساخته شدند. مخلوط ترکیبات استفاده شده در واکنش به این صورت می‌باشد: ۱۸ میکرولیتر آب واکنش زنجیره‌ای پلی مرز، پرایمر رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول هر کدام ۱ میکرولیتر، بافر PCR ۲/۵ میکرولیتر، dNTP ۱ میکرولیتر، *Taq* پلیمرز ۰/۵ میکرولیتر، نمونه ژنوم ۱ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. از نشانگر ۱۰۰ جفت بازی برای تایید وزن مولکولی محصولات تکثیر شده استفاده شد. برنامه حرارتی واکنش پلی‌مرز بدین صورت بود: واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، واسرشت شدن ثانویه ۹۴ درجه سلیسیوس ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه

تخلیه شدند و بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ ایزوتونیک با سالیین pH ۷/۵ استریل به هر چاهک اضافه شد و تخلیه گردید. سپس جهت تثبیت به هر چاهک حدود ۲۰۰ میکرولیتر متانول خالص افزوده شد و مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. بعد از تخلیه در مرحله‌ی بعد رنگ کریستال ویوله ۱٪ وزنی/حجمی افزوده شد و مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. بعد از تخلیه رنگ و شستشو با آب، اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ حجمی افزوده گردید و با کمک دستگاه قرائت کننده الیزا BioTek مدل ELx808 جذب هر چاهک در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید (جذب نوری کنترل منفی ۰/۰۴ و کنترل مثبت ۱ خوانده شد). هر آزمون سه بار تکرار شد (۲۲).

(م) بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید بیسموت و سیپروفلوکساسین: محلول سیپروفلوکساسین به میزان ۵۰۰ ppm بعد از استریل نمودن به طریق فیلتراسیون، نانوذرات اکسید بیسموت محلول به میزان ۲۰۰۰ ppm تهیه گردید و تاثیر آن‌ها بر روی بیوفیلم سویه‌های سودوموناس آئروجینوسا جداسازی شده بررسی قرار گرفت. جذب نوری بیوفیلم در مقایسه با کنترل مثبت و منفی با استفاده از دستگاه قرائت کننده الیزا BioTek ارزیابی گردید (۲۲).

(ن) آنالیز آماری داده‌ها: داده‌ها با استفاده از نسخه بیست و دوم نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اختلاف بین مقادیر جذب نوری و میانگین‌ها با استفاده از آزمون مستقل t مقایسه شدند و سطح معنی داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

(الف) شناسایی باسیلوس: براساس آزمون‌های بیوشیمیایی و رنگ آمیزی گرم انجام شده تعداد ۴۳ جدایه باسیلوس سوبتیلیس شناسایی شد (جدول ۱).

(ب) غربالگری باکتری‌ها با قابلیت تحمل نیترات بیسموت: پس از کشت سویه باسیلوس سوبتیلیس و گرما گذاری در محیط کشت بیسموت سولفید آگار و نوترینت آگار که به آن مقدار ۰/۲٪ نیترات بیسموت اضافه شده بود، کلنی‌هایی به رنگ

مختلف محلول نانوذرات اکسید بیسموت ۱۰۰ ppm، ۳۰۰ ppm، ۶۰۰ ppm، ۹۰۰ ppm و ۱۲۰۰ ppm و ۲۰۰۰ ppm (بر اساس فرمول $2000 \text{ ppm} = X \text{ mg/l}$) به مدت یک ساعت قرار داده شدند تا زمانی که جذب کامل صورت گرفت. سپس به مدت یک ساعت دیسک‌ها در دمای ۴۰ درجه سلیسیوس قرار گرفتند تا این که کاملاً خشک شدند (۲۰). سپس دیسک‌های تهیه شده با استفاده از پنس استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار با رعایت فاصله مناسب از یکدیگر و از لبه پلیت قرار داده شدند. در نهایت پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. پس از گذشت زمان یاد شده قطر هاله عدم رشد اندازه گیری گردید.

(ک) آزمون تعیین حداقل غلظت بازدارندگی نانوذرات اکسید بیسموت: برای این منظور از رقت سریالی از غلظت ۷/۸ تا ۲۰۰۰ ppm در محیط کشت ملج مولر هیتون استفاده شد. ابتدا محلول پایه نانوذرات با غلظت ۲۰۰۰ ppm تهیه گردید و تا ۹ ولوله جدی رقتی - گردید. مقدار ۱ میلی-لیتر از سوپاناسین باکتری‌هلی - سودوموناس آئروجینوسا با غلظت ۰/۵ - فلز افزوده شد. که این مقدار از لوله اول تا آخر منتقل شد و از لوله آخر بیرون ریخته شد. یک لوله هم حاوی مولر هیتون مایع به عنوان لوله کنترل منفی در نظر گرفته شد سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند سپس کدورت‌ها رقت و ثبت شد. شش یلد یادآوری است که لوله شماره ده لوله کنترل منفی در نظر گرفته شد (۲۱).

(ل) تشکیل بیوفیلم: از تک کلنی‌های کشت خالص سویه سودوموناس آئروجینوسا در محیط LB با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند (با رقت $10^8 \times 1/5$) برای هر نمونه تنظیم و کشت داده شد. در مرحله بعد هر نمونه و سویه کنترل به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۶ چاهک موازی در پلیت میکروتیتر ۹۶ چاهکی پلی استیرین افزوده شد و به عنوان شاهد از محیط مایع LB به همراه ۱٪ گلوکز در یک ردیف ۶ تایی چاهک استفاده گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. پس از این مدت محتوی چاهک‌ها به آرامی

جدول ۱: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی باسیلوس سوبتیلیس.

آزمون	نتیجه
رنگ آمیزی گرم	مثبت
آزمون کاتالاز	مثبت
آزمون اوره‌آز	منفی
آزمون مصرف سیتрат	مثبت
آزمون ژلاتیناز	مثبت
آزمون TSI	Alk/acid
آزمون MR	منفی
آزمون VP	مثبت
آزمون کازین	مثبت
آزمون لسیتین	منفی
آزمون هیدرولیز نشاسته	مثبت
آزمون تخمیر قند گلوکز	مثبت
آزمون تخمیر قند آرابینوز	مثبت
آزمون تخمیر قند مانیتول	مثبت
آزمون SIM	
حرکت	مثبت
اندول	منفی
تولید H2S	منفی
آزمون INM	مثبت

حاوی غلظت ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۳، و ۰/۰۰۵ مولار از محلول نیترات بیسموت بعد از گذشت ۱۳ روز به رنگ قهوه‌ای روشن درآمدند (شکل ۱). پس از سانتریفیوژ محلول قهوه‌ای رنگ حاصله از غلظت ۰/۰۰۵ با دور ۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلیسیوس، رسوب قهوه‌ای رنگ با جلای فلزی مشاهده گردید. تمامی ۴۳ سویه باسیلوس سوبتیلیس توانایی تولید اکسید بیسموت را داشتند. می‌توان نتیجه گرفت که باکتری قابلیت سنتز نانوذرات اکسید بیسموت به روش خارج سلولی را داشت.

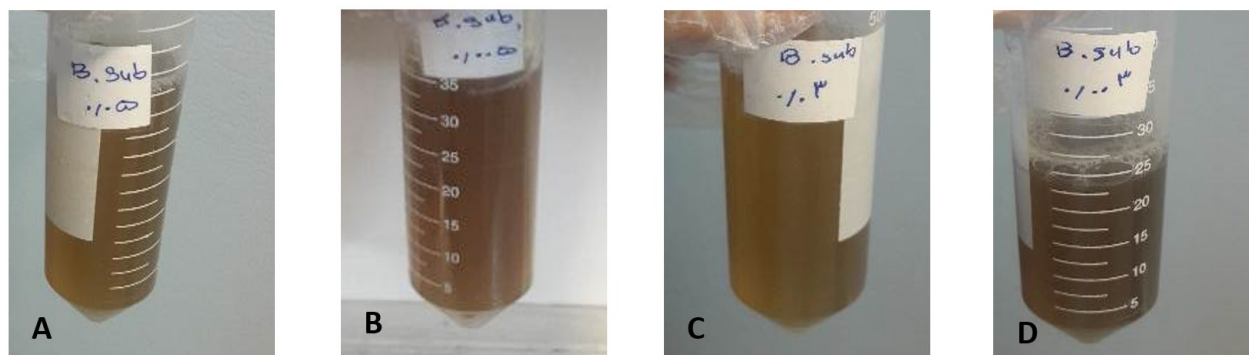
د) شناسایی سودوموناس آئروجینوسا: کلنی‌های حاصل از رشد سودوموناس آئروجینوسا بر روی محیط کشت ستریماید آگار به اشکال مختلف با حاشیه نامنظم و سطح مات یا براق مشاهده شدند. از پلیت حاوی سودوموناس آئروجینوسا بوی شبیه انگور استشمام شد. نتایج آزمون بیوشیمیایی در جدول ۲ نشان داده شده است.

ه) شناسایی مولکولی: حضور ژن *oprL* تائید کننده آزمون‌های بیوشیمیایی و وجود باکتری سودوموناس آئروجینوسا بود (شکل ۲). از مجموع ۱۶۰ نمونه جداسازی شده از بیماران دچار سوختگی در این مطالعه، تعداد ۷۱ سویه سودوموناس آئروجینوسا پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند.

و) طیف سنجی مادون قرمز: طول موج‌های ارتعاشی اکسید بیسموت در طول موج‌های 583 cm^{-1} ، 610 ، 737 و 3437 برای نانوذرات تولید شده توسط باسیلوس سوبتیلیس مشاهده شد.

قهوه‌ای با جلای فلزی ظاهر شدند که به دلیل قابلیت سنتز نانوذرات اکسید بیسموت بوده است.

ج) سنتز نانوذرات اکسید بیسموت توسط سویه‌های باسیلوس: فالكون حاوی غلظت ۰/۰۰۵ مولار از محلول نیترات بیسموت پس از گذشت ۹ روز تغییر رنگ داد و رنگ زرد محیط کشت قهوه‌ای تیره شده بود. ولی سایر فالكون‌ها یعنی فالكون‌های



شکل ۱: سنتز خارج سلولی نانوذرات اکسید بیسموت باسیلوس سوبتیلیس (A) غلظت ۰/۰۰۵ مولار نیترات بیسموت، (B) غلظت ۰/۰۰۵ مولار نیترات بیسموت، (C) غلظت ۰/۰۰۳ مولار نیترات بیسموت، (D) غلظت ۰/۰۰۳ مولار نیترات بیسموت.

جدول ۲: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی سودوموناس آئروجینوسا.

رنگ آمیزی گرم	اندول	تولید H2S	حرکت	آزمون سیترات	آزمون اوره آز	آزمون OF	آزمون MR-VP	آزمون TSI	آزمون اکسیداز	آزمون کاتالاز	آزمون بیوشیمیایی
منفی	منفی	منفی	مثبت	مثبت	منفی	اکسیداتیو	منفی	Alk/Alk	مثبت	مثبت	سودوموناس آئروجینوسا

(شکل ۵).

ط) بررسی قطر هاله عدم رشد دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی: قطر هاله عدم رشد سویه‌های مورد مطالعه در آزمون آنتی‌بیوگرام در شکل ۶ و جدول ۳ نشان داده شده است. حساسیت سویه‌های سودوموناس آئروجینوسا جداسازی شده از بیماران سوختگی بستری در بیمارستان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی در شکل ۷ نشان داده شده است. بیشترین قطر هاله عدم رشد در هر دو سویه مورد بررسی مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بود.

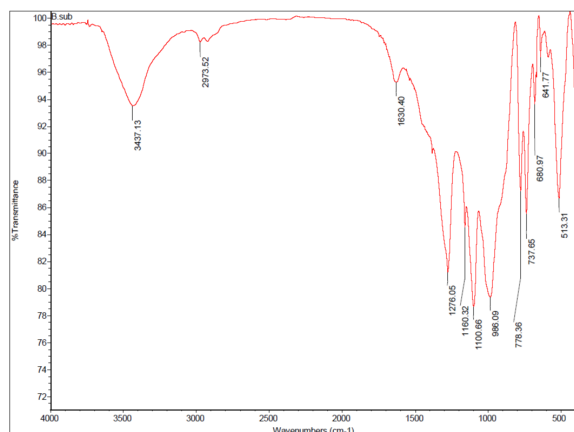
میزان سویه‌های حساس سودوموناس آئروجینوسا به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین ۸۰٪، ایمپنم ۷۵٪، آمپی‌سیلین ۵۶٪، تتراسایکلین ۵۲٪، آمیکاسین ۲۳٪، جنتامایسین ۱۱٪، کانامایسین ۱٪، سفوتاکسیم ۰٪ مشاهده گردید (شکل ۷).

ی) بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید بیسموت تولید شده توسط باسیلوس سوتیلیس: بر اساس نتایج حاصل از روش دیسک گذاری، بیشترین اثر بازدارندگی نانوذرات اکسید

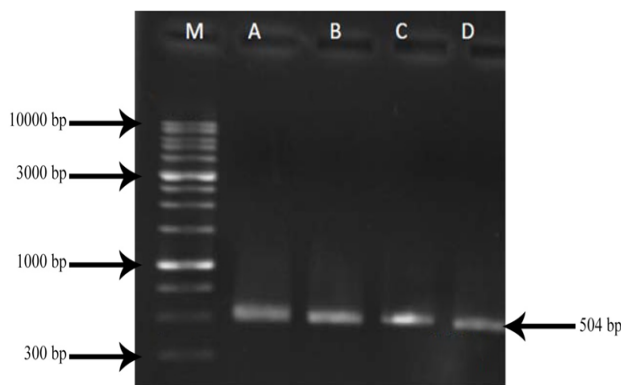
باند جذبی در ناحیه 3437 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی O-H و باندهای جذبی $400-700 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات Bi-O بود (شکل ۳).

ز) ارزیابی با میکروسکوپ الکترونی روبشی: با توجه به تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، نانو ذرات اکسید بیسموت تولید شده توسط باسیلوس سوتیلیس به صورت نامنظم با اندازه ۴۱-۲۳ نانومتر بودند. که به وضوح در تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی قابل مشاهده می‌باشد (شکل ۴). تمامی نانوذرات تولید شده اندازه‌ای کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر داشتند.

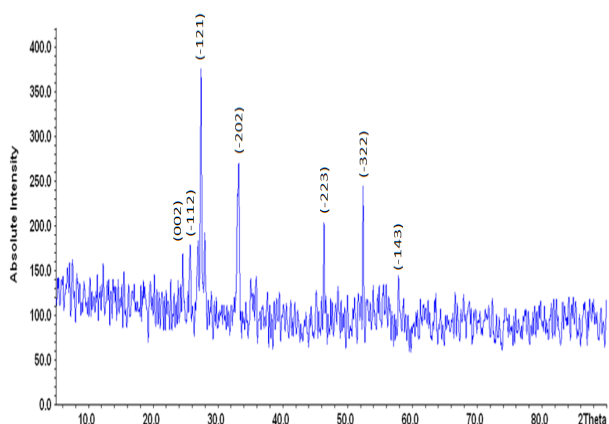
ح) پراش پرتو ایکس: طبق الگوی پراش پرتو ایکس ساختار نانو ذرات اکسید بیسموت در محدوده زاویه (2θ) ۱۰ تا ۸۰ بر طبق الگوی استاندارد (JCPDS = 00-027-0053) شناسایی شد؛ که اطلاعات طیفی آن عبارتند از (002)، (112)، (121)، (202)، (223)، (322) و (143) بر طبق فرمول دبی شرر $(D = \frac{a}{\lambda} \beta \cos \theta)$ میانگین اندازه نانوذرات سنتز شده توسط باکتری باسیلوس سوتیلیس ۴۴ نانومتر تخمین زده شد



شکل ۳: نمودار طیف سنجی مادون قرمز حاصل از نانوذرات اکسید بیسموت تولید شده توسط باکتری باسیلوس سوتیلیس.



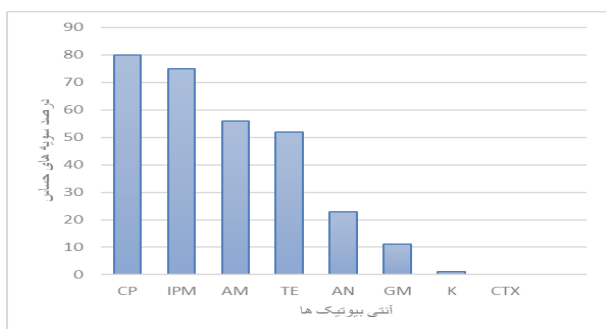
شکل ۲: الکتروفورز قطعه ۵۰۴ bp ژن *oprL* سویه‌های سودوموناس آئروجینوسا بر روی ژل آگارز ۱٪. A و B: محصول واکنش زنجیره پلیمرز ژن *oprL* و M: مارکر DNA Ladder 1Kbp.



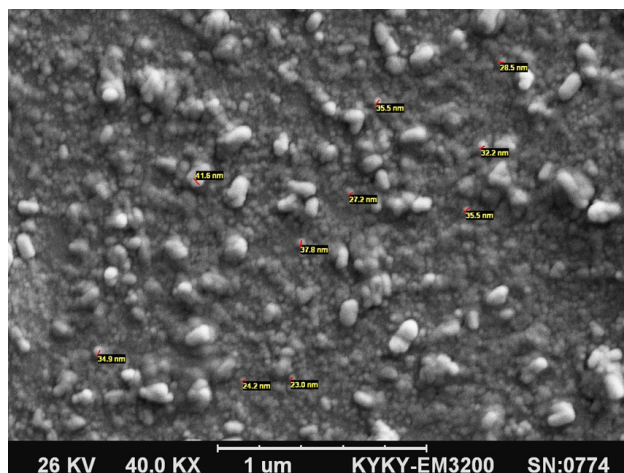
شکل ۵: الگوی پراش پرتو ایکس حاصل از نانوذرات اکسید بیسموت تولیدی باسیلوس سوتیلیس.

تولید بیوفیلم در غیاب نانوذرات توسط سویه سودوموناس آئروجینوسا نشان داد، جذب نوری با افزایش غلظت نانوذرات در چاهک‌ها در مقایسه با کنترل مثبت کم شد که نشان دهنده آن بود که میزان تشکیل بیوفیلم در حضور نانوذرات کاهش یافت (شکل ۸). سنجش بیوفیلم ۷۱ سویه سودوموناس آئروجینوسا بالینی در مقایسه با کنترل مثبت نشان داد که تمامی سویه‌ها (۱۰۰٪) قادر به تشکیل بیوفیلم قوی در پلیت میکروتیتر ۹۶ چاهکی پلی‌استیرن بودند.

(م) نتایج آنالیز آماری داده‌ها: طبق آزمون t مستقل، تفاوت معنی‌داری در جذب نوری سویه‌ها پس از استفاده از نانوذرات با غلظت ۲۰۰۰ ppm مشاهده نشد ($p > 0.05$). ولی تفاوت جذب نوری پس از استفاده از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$). همچنین بر اساس آزمون t



شکل ۷: حساسیت سویه‌های سودوموناس آئروجینوسا جداسازی شده از بیماران سوختگی بستری در بیمارستان. سیپروفلوکساسین (CP)، تراسایکلین (TE)، سفوتاکسیم (CTX)، جنتامایسین (GM)، ایمی‌پنم (IPM)، کانامایسین (K)، آمپی‌سیلین (AM)، آمیکاسین (AN).

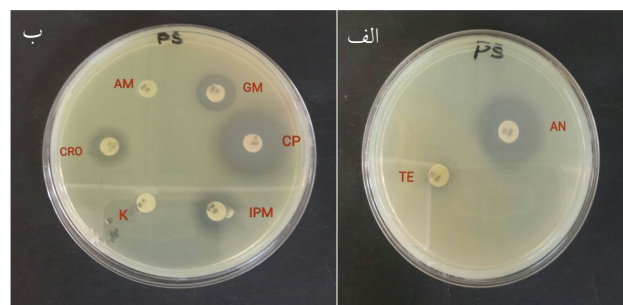


شکل ۴: نانوذرات اکسید بیسموت تولید شده با باسیلوس سوتیلیس با میکروسکوپ الکترونی روبشی با بزرگنمایی ۴۰.۰ KX.

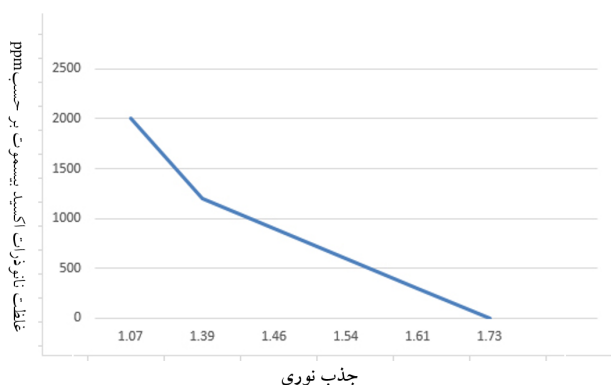
بیسموت مربوط به غلظت ۲۰۰۰ ppm برای سودوموناس آئروجینوسا با قطر هاله عدم رشد ۱۷ میلی‌متر مشاهده شد و غلظت ۱۰۰ ppm نانوذرات اکسید بیسموت به دلیل عدم مشاهده هاله عدم رشد، به عنوان کم‌ترین غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد.

(ک) حداقل غلظت مهارکننده رشد نانوذرات اکسید بیسموت: حداقل غلظت مهارکننده رشد برای سویه سودوموناس آئروجینوسا ۲۰۰۰ ppm بود. نتایج نشان داد که نانوذرات اکسید بیسموت تنها اثر مهارکنندگی بر روی رشد باکتری داشت. در تحقیق حاضر با افزایش غلظت نانوذرات اثر ضدباکتریایی آن افزایش یافت.

(ل) بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم: مقایسه تشکیل بیوفیلم در حضور غلظت ۲۰۰۰ ppm نانوذرات اکسید بیسموت و با میزان



شکل ۶: الف و ب قطر هاله عدم رشد مربوط به سودوموناس آئروجینوسا جدا شده از عفونت بیماران مبتلا به سوختگی مورد مطالعه در برابر سیپروفلوکساسین (CP)، تراسایکلین (TE)، سفوتاکسیم (CTX)، جنتامایسین (GM)، ایمی‌پنم (IPM)، کانامایسین (K)، آمپی‌سیلین (AM)، آمیکاسین (AN).



شکل ۸: ارتباط جذب نوری (OD) با میزان نانوذرات موجود در چاهک‌های پلیت حاوی بیوفیلم سودوموناس آئروجینوسا.

پاتوژن، تخریب بافت به کار گرفته می‌شوند. به منظور تولید نانوذرات فلزی مختلف سه روش شیمیایی، فیزیکی و زیستی وجود دارد. اما چون روش‌های شیمیایی و فیزیکی به دما، فشار و زمان بالا نیاز دارند و بسیار گران قیمت هستند و در ضمن میزان کمی از پیش ماده‌های نانوذرات بر روی سطح نانوذرات تولیدی باقی می‌ماند و سبب ایجاد سمیت برای انسان می‌شود در نتیجه بیوستت نانوذرات با روش‌های زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها به دلیل سازگاری بالا با محیط زیست و کاهش مصرف انرژی و هزینه‌ها از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. همچنین به علت سازگاری بیشتر با بدن انسان و عدم تولید مواد سمی ارجحیت دارند (۲۷).

در مطالعه حاضر باکتری باسیلوس سوبتیلیس از خاک پارک جنگلی طالقانی تهران، جداسازی و شناسایی شد. در غربال‌گری اولیه، با استفاده از نیترات بیسموت ۰/۳، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۵ مولار و با مشاهده تغییر رنگ پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس مشخص شد که تمامی سویه‌ها قادر به احیای نیترات بیسموت در غلظت ۰/۰۰۵ مولار در زمان کم‌تر بودند (شکل ۱). پس از مشاهده تغییر رنگ محیط از زرد به قهوه‌ای تیره و تأیید اولیه تولید نانوذرات اکسید بیسموت توسط سویه مورد مطالعه، ویژگی‌های شیمیایی و تایید نهایی سنتز نانوذرات توسط آنالیزهای طیف سنجی مادون قرمز، پراش پرتو ایکس، میکروسکوپ الکترونی روبشی صورت پذیرفت. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که باسیلوس سوبتیلیس قادر به سنتز نانوذرات

جدول ۳: نتیجه بررسی قطر هاله عدم رشد سودوموناس آئروجینوسا بر حسب میلی‌متر.

قطر هاله عدم رشد	آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی
۱۴	جتتامایسین (GM)
۲۶	سیپروفلوکساسین (CP)
صفر	کانامایسین (K)
۵	آمپی‌سیلین (AM)
صفر	سفتاکسیم (CTX)
۱۵	ایمی‌پنم (IPM)
۱۵	آمی‌کاسین (AN)
۸	تراسایکلین (TE)

مستقل، تفاوت معنی داری بین اثربخشی نانوذرات و سیپروفلوکساسین بر هاله عدم رشد سویه سودوموناس آئروجینوسا مورد آزمایش مشاهده شد ($p < 0/05$).

بحث

از سلول‌های میکروبی برای سنتز مواد در ابعاد نانو استفاده می‌شود. بیوستت نانوذرات از طریق میکروارگانیسم‌ها که اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته است در واقع تعامل بین میکروارگانیسم و فلزات می‌باشد و در استخراج یا جمع‌آوری فلزات در فرایندهای بیوتکنولوژی استفاده می‌شوند (۲۳).

بعضی از باکتری‌ها توانایی تولید فلزات در ابعاد نانو به صورت درون سلولی و خارج سلولی را دارند و برای سنتز نانوذرات فلزاتی مانند طلا، نقره، کادمیوم، سولفید، بیسموت و روی استفاده می‌شوند (۲۴). ارگانیسم‌هایی مانند باکتری، قارچ و گیاهان برای تولید نانوذرات فلزی استفاده می‌شوند. استفاده از میکروارگانیسم‌ها در سنتز نانوذرات به عنوان فرایندی سازگار با محیط زیست در نظر گرفته می‌شوند (۲۵).

مطالعات محققان نشان داده است که میکروارگانیسم‌ها قادرند ذرات فلزی با ابعاد نانومتر را سنتز نمایند (۲۶).

نانوذرات تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها در زمینه‌های مختلفی کاربرد دارند اما اغلب در رشته‌ی پزشکی و سیستم‌های انتقال دارو، درمان سرطان، ژن درمانی، آنالیز DNA، عوامل ضدباکتری، بیوسنسور، افزایش دهنده سرعت واکنش‌ها، حذف

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر بر اساس تعیین خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید بیسموت بر روی سویه‌های *سودوموناس آئروجینوسا* بالینی نشان داد که بین غلظت نانوذرات و درصد حذف باکتری ارتباط مستقیم وجود دارد. به طوری که افزایش غلظت نانوذرات اثر مهارکنندگی بر روی سویه‌های یاد شده در فرم پلانکتونیک و بیوفیلم افزایش می‌یابد. بر اساس تحقیقات گذشته اندازه و شکل نانوذرات بر روی اثر ضد باکتریایی آن‌ها نیز تاثیر می‌گذارد (۳۲).

ونرو- لی (Wenru- Li) و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۰، اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره سنتز شده به روش شیمیایی با اندازه ۱۰۰ نانومتر در غلظت‌های ۱۰-۵۰ $\mu\text{g/ml}$ را بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تایفی* و *اشریشیا کلی* مورد بررسی قرار دادند، که همسو با این مطالعه نتایج حاصل از کار آن‌ها نیز نشان داد که اثر ضد میکروبی نانوذرات وابسته به دوز می‌باشد و با افزایش غلظت نانوذرات اثر باکتری کشی آن‌ها افزایش می‌یابد (۳۳).

عبدالقادر (Abdulkadir) و همکاران در سال ۲۰۱۵ نانوذرات اکسید بیسموت را به روش شیمیایی در ابعاد ۸۹-۳۱/۹۹ نانومتر سنتز نمودند و اثر ضد میکروبی این نانوذرات را بر روی *سودوموناس آئروجینوسا*، *اسیتوباکتر* و *اشریشیا کلی* در غلظت‌های ۱۱-۲/۲۹ ppm بررسی کردند. نتایج حاصل از کار آن‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف این نانوذرات اثر مهارکنندگی بر روی باکتری‌های نام‌برده نداشت. این یافته با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی. این اختلاف ممکن است به علت تفاوت در شکل نانوذرات و یا به دلیل روش سنتزی متفاوت باشد. زیرا گزارش شده است که رابطه مستقیمی بین اندازه بزرگ نانوذرات و کاهش اثر ضد میکروبی آن‌ها وجود دارد (۳۲ و ۳۴).

نظری (Nazari) و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات بیسموت سنتز شده با استفاده از باکتری *سراسیا مارسسنس* جداسازی شده از دریای خزر با ابعاد ۱۰۰ نانومتر پرداختند و اثر مهاری آن را بر سویه *هلیکوباکتر پیلوری* بررسی نمودند. نتایج حاصل از مطالعه آن‌ها نشان داد که

اکسید بیسموت در ابعاد (۴۱-۲۳ نانومتر) و نامنظم می‌باشد. پس از تشکیل بیوفیلم سویه‌های *سودوموناس آئروجینوسا* جداسازی شده از بیماران سوختگی بستری در بیمارستان شهید مطهری تهران طی آذرماه ۱۳۹۵ تا مرداد ماه ۱۳۹۶ و پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی تشخیصی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز شناسایی شدند. در ادامه با بررسی نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام، سویه‌هایی که دارای بالاترین سطح مقاومت آنتی‌بیوتیکی بودند، جداسازی گردیدند. در نهایت اثر ضد میکروبی نانوذرات سنتزی بر روی فرم پلانکتونیک و بیوفیلم سویه *سودوموناس آئروجینوسا* بررسی شد.

تحقیقات ما نشان داد که نانوذرات اکسید بیسموت با افزایش غلظت بر روی فرم پلانکتونی موثر می‌باشد، اما در مقایسه با سیپروفلوکساسین، فعالیت ضد بیوفیلم نانوذرات در غلظت ppm ۲۰۰۰ اندک بود. هم‌سو با نتایج حاصل از مطالعه ما، در مطالعه ترجمان (Tarjoman) و همکاران در سال ۲۰۱۵ که به بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات بیسموت ساب سیترات با ابعاد ۲۰۰-۱۷۰ نانومتر در غلظت‌های ppm ۳۵۰-۳۵۰۰ بر کلبسیلا نمونه بالینی پرداختند، گزارش کردند این سویه باکتریایی نسبت به نانوذرات بیسموت ساب سیترات در غلظت ppm ۳۵۰۰ نیز مقاومت بالایی را نشان داد (۲۸).

سیف‌الدین (Saiffudin) و همکاران در سال ۲۰۰۸ و حاتم فواد (Hatam fuad) و همکاران در سال ۲۰۱۷ نانوذرات نقره را به ترتیب با اندازه ۶۰-۵ نانومتر و ۱۴۲-۴۳ نانومتر و شمس (Shams) در سال ۲۰۱۴ اکسید روی را به ترتیب با اندازه ۳۰-۲۰ نانومتر با استفاده از *باسیلوس سوبتیلیس* به صورت خارج سلولی سنتز نمودند آن‌ها نیز تغییرات رنگ به وجود آمده را یکی از نشانه‌های سنتز نانوذرات قلمداد نمودند و دلیل بر توانایی باکتری‌های فوق در سنتز نانوذرات به صورت خارج سلولی دانستند که از نظر اثبات توانایی سویه‌های مورد مطالعه در این پژوهش در بیوسنتز نانومواد به صورت خارج سلولی با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد و تفاوت در اندازه نانوذرات ممکن است به علت استفاده از پیش‌سازهای متفاوت باشد (۲۹-۳۱).

افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داد که بین گروه‌های مورد تاثیر با نانوذرات و سیپروفلوکساسین اختلاف معنی داری وجود دارد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل: عدم سرقت ادبی، انتشاردوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از خانم پریسا سراج پرسنل محترم آزمایشگاه تحقیقاتی محمودیه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به دلیل همکاری و مساعدت کمال تشکر را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

نانوذرات بیسموت در غلظت $100 \mu\text{g/ml}$ اثر بازدارندگی بر روی سویه هلیکوباکتر پیلوری داشتند (۱۳) که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی نداشت. این عدم هم‌خوانی در نتایج این دو مطالعه می‌تواند به علت تفاوت در اندازه نانوذرات یا سویه‌های مورد بررسی باشد.

نتیجه گیری

در این مطالعه، با استفاده از روش سبز نانوذرات اکسید بیسموت توسط باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* جداسازی شده از خاک منطقه جنگلی در اندازه ۲۳-۴۱ نانومتر و به شکل نامنظم سنتز شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که این سویه توانایی سنتز نانوذرات اکسید بیسموت را دارد. نتایج بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسید بیسموت نشان داد که نانوذرات با غلظت 2000 ppm ، بر روی بیوفیلم ۰.۵٪ سویه‌های *سودوموناس آئروجینوسا* اثر بازدارندگی داشت. با افزایش غلظت نانوذرات اکسید بیسموت اثر مهارکنندگی آن

References

1. El-Batal A, Amin M, Shehata MM, Hallol MM. Synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus stearothermophilus* using gamma radiation and their antimicrobial activity. World Appl Sci J. 2013; 22(1): 1-16.
2. Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi S, Zolfaghari B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. Res Pharm Sci. 2014; 9(6): 385.
3. Gudepalya RR, Mallappa KS, Uma RS, Ghasemzadeh A. Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. Molecules. 2016; 21(7): 836.
4. Das VL, Thomas R, Varghese RT, Soniya E, Mathew J, Radhakrishnan E. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. Biotechnol. 2014; 4(2): 121-126.
5. Prasad K, Kulkarin AMR. *Lactobacillus* assisted synthesis of titanium nanoparticles. List Nanoscale Res Lett. 2007; 2(5): 248-250.
6. Pourali P, Yahyaei B. Biological production of silver nanoparticles by soil isolated bacteria and preliminary study of their cytotoxicity and cutaneous wound healing efficiency in rat. J Trace Elem Med Biol. 2016; 34(3): 22-31.
7. Briand GG, Burford N. Bismuth compounds and preparations with biological or medicinal relevance. Chem Rev. 1999; 99(9): 2658-2601.

8. Leontie L, Caraman M, Alexe M, Harnagea C. Structural and optical characteristics of bismuth oxide thin films. Surf Sci. 2002; 507-510: 480-485.
9. Hernandez-Delgadillo R, Velasco-Arias D, Martinez-Sanmiguel JJ, Diaz D, Zumeta-Dube I, Arevalo-Nino K, Cabral-Romero C. Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. Int J Nanome. 2013; 8(3): 1645-1652.
10. Rabin N, Zheng Y, Opoku TC, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing anti-biofilm agents. Future Med Chem. 2015; 7(4): 493-512.
11. Basaglia M, Ali MY, Rahman MM, Rahman A, Rahman MM, Sultana T, Casella S. Isolation of *Bacillus* spp. from soil and an evaluation of their sensitivity towards different extracts and essential oils of cumin. J Agr Sci Tech. 2014; 16(1): 623-633.
12. Whitman WB, Goodfellow M, Kamperfer P. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. New York, NY. Parts of A and B, Springer-Verlag 2012.
13. Nazari P, Dowlatabadi-Bazaz R, Mofid MR, Pourmand MR, Daryani NE, Faramarzi MA, Sepehrizadeh Z, Shahverdi AR. The antimicrobial effects and metabolomic footprinting of carboxyl-capped bismuth nanoparticles against *Helicobacter pylori*. Appl Biochem Biotechnol. 2013; 172(2): 570-579.
14. Vidhya LD, Roshmi T, Rintu TV, Soniya EV, Jyothis M, Radhakrishnan EK. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. J Biotechnol. 2014; 4(2): 121-126.
15. Ninfa, Alexander J, Ballou, David P, Benore, Marilee. Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology 2nd edition. Wiley; 2009.
16. Jing M, Jia C, Liangsheng Q, Juanqin X. Effect of different calcination temperatures on the structural and photocatalytic performance of Bi-TiO₂/SBA-15. Int J Photo. 2013; 10.
17. Ranjbar R, Owlia P, Saderi H, Owlia P, Saderi H, Mansouri S, Jonaidi-Jafari N, Izadi M, Farshad S, Arjomandzadegan M. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients hospitalized in a major burn center in Tehran, Iran. Act Med Iran. 2011; 49(10): 675-679.
18. Chapaval L, Moon DH, Gomes JE, Duarte FR, Tsai SM. An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. Arq Bras Med Vet Zootec. 2008; 60(2): 299-306.
19. Wikler MA. Performance standards for antimicrobial sensitivity testing: Seventeenth Informational Supplement. Wayne PA: Clini Lab Stand Inst. 2007; 27(1): 1-177.
20. Doudi M, Naghsh N, Setorki M. Comparison of the effects of silver nanoparticles on pathogenic bacteria resistant to beta-lactam antibiotics (esbls) as a prokaryote model and Wistar rats as a eukaryote model. J Med Sci Monit Basic Res. 2013; 19(1): 103-110.
21. Bland MV, Ismail S, Heinemann JA, Keenan JJ. The action of Bismuth against *Helicobacter pylori* Mimics but is not caused by intracellular iron deprivation. J Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(6): 1983-1988.
22. Fujiwara T, Hoshino T, Ooshima SH. Differential and quantitative analyses of mRNA

- expression of glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. J Dent Res. 2002; 81 (2): 109-113.
23. Gericke M, Pinches A. Microbial production of gold nanoparticles. Gold bull. 2006; 39(1): 22-28.
 24. Shankar SS, Rai A, Ahmad A. Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag and bimetallic Au core- Ag shell nanoparticles using neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. J coll inter sci. 2004; 275(2): 496-502.
 25. Salata OV. Application of nanoparticles in biology and medicine. J Nanobiotechnol. 2004; 2 (1): 3-9.
 26. Narayanan K.B, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. Adv Coll Inter Sci. 2010; 156(2): 1-13.
 27. Nanda A, Saravanan M. Biosynthesis of Silver nanopertieles from *staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity agaist MRSA and MRSE. Nanomed. 2009; 5(4): 452-456.
 28. Tarjoman Z, Ganji SM, Mehrabian S. Synergistic effect of the bismuth nanoparticles along with antibiotics on PKS positive *Klebsiella pneumonia* isolates from colorectal cancer patients; comparison with quinolon antibiotics. J Med Medi Sci. 2015; 3(9): 387-393.
 29. Saifuddin N, Wong CW, Nur Yasumira AA. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. J Chem. 2008; 6(1): 61-70.
 30. Fuad H, Li H, Hongjie L, Yanmei D, Baoting Y, El-Shakh A, Abbas G, Jianchu M. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* to control filarial vector *Culex pipiens pallens* and its antimicrobial activity. Art Cell Nano Bio. 2017; 45(7): 1369-1378.
 31. Shams U, Abad A, Mohd A, Ashraf M, Hena K. Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Bacillus Subtilis* and their catalytic performance in the one-pot synthesis of steroidal thiophenes. Green synthesis of ZnO nanoparticles. Eur Chem Bull. 2014; 3(9): 939-945.
 32. Deljou A, Goudarzi S. Green extracellular synthesis of the silver nanoparticles using *Thermophilic Bacillus* Sp. AZ1 and its antimicrobial activity against several human pathogenetic bacteria. Iran J Biotech. 2016; 14(2): 25-32.
 33. Wen-Ru, Li, Xiao-Bao Xie, Qing-Shan Shi, Hai-Yan Zeng, You-Sheng OU-Yang Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles *Escherichia coli*. Appl Micro Bio. 2010; 85(4): 1115-1122.
 34. Abdulkadir MNJ, Safanah AF, Jehan ASS. Mohammed FAM, Mustafa TM. Study the antibacterial effect of bismuth oxide and tellurium nanoparticles. Int J Chem Biomole Sci. 2015; 1(3): 81-84.



Antibacterial and antibiofilm activity of bismuth oxide nanoparticles produced by *Bacillus subtilis* against clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections

Leila Firouzi Dalvand¹, Farzaneh Hosseini², Shahram Moradi Dehaghi³, Elham Siasi Torbati²

¹ Ph.D. student, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

² Assistant Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³ Associate Professor, Department of Chemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: The biological method of nanoparticles synthesis by microorganisms has a special place due to its high environmental compatibility and reduced energy consumption and costs. The aim of this study was to determine the effect of bismuth oxide nanoparticles produced by green methods on bacteria causing hospital infections.

Materials & Methods: In this study, 160 samples were collected from burn wound infections in patients hospitalized in Motahari Burn Rescue Hospital. Resistant strains were identified phenotypically and genotypically. Synthesis of bismuth oxide nanoparticles by *Bacillus subtilis* wild type strain. The synthesis of bismuth oxide nanoparticles was confirmed by infrared spectroscopy, X-ray diffraction, and scanning electron microscopy. Finally, the antibacterial activity of nanoparticles against isolated strains was investigated with the standard disk diffusion test.

Results: Biosynthesis of nanoparticles showed an average size of 44 nm using *Bacillus subtilis*. All 44% (71 strains) of *Pseudomonas aeruginosa* formed a biofilm. Bismuth oxide nanoparticles at a concentration of 2000 ppm were inhibited 5% of *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusion: By increasing the concentration of bismuth oxide nanoparticles, its inhibitory effect increased. The results showed that there is a significant difference between the groups exposed nanoparticle and ciprofloxacin.

Keywords: Bismuth oxide nanoparticles, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm.

Correspondence to: Farzaneh Hosseini

Tel: +98 9123472441

E-mail: fa_hosseini@iaiu-tnb.ac.ir

Journal of Microbial World 2019, 12(2): 172-185.



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.