

بررسی اثر نانوذرات نقره بر بیوفیلیم‌های ناشی از لیستریا مونوسیتوزنز

راضیه احمدی نسب^۱، سید سهیل آقائی^{۱*}، محمدعلی قاسمزاده^۲

۱. گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

۲. گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۰۹)

چکیده

سابقه و هدف: لیستریا مونوسیتوزنز به عنوان یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای مواد غذایی شناخته شده است که می‌تواند منجر به عفونت‌های جدی به ویژه در نوزادان، افراد مسن، باردار و همچنین افرادی با نقص ایمنی شود. این باکتری در مواد غذایی گوناگون یافت می‌شود و موجب مننژیت، سپتیسمی و سقط جنین در زنان باردار می‌شود. همچنین بر روی بسیاری از سطوح در تماس با مواد غذایی و وسایل پزشکی تشکیل بیوفیلیم می‌دهد. تشکیل بیوفیلیم توسط این باکتری در سطوح مختلف، یکی از مهمترین مشکلات در صنایع غذایی است. نانوذرات فلزی ترکیبات ضد میکروبی موثری برای کنترل و حذف بیوفیلیم‌های باکتریایی از سطوح غیرزنده می‌باشند. هدف اصلی این تحقیق سنتز نانوذرات یدید نقره در شرایط آزمایشگاهی و ارزیابی خواص ضد میکروبی آنها برای مهار تشکیل بیوفیلیم و ریشه کن سازی بیوفیلیم لیستریا مونوسیتوزنز (ATCC ۱۳۹۸) می‌باشد.

روش کار: در این تحقیق نانوذرات یدید نقره به روش سونوشیمیایی سنتز شدند و با استفاده از روش‌های UV-Vis، FT-IR، EDX و میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد تایید قرار گرفت. خاصیت ضد میکروبی و آنتی بیوفیلیم نانوذرات سنتز شده با استفاده از روش چاهک گذاری بر روی آگار و با روش رقت در میکروپلیت ۹۶ خانه ای به صورت متوالی تعیین شد.

نتایج: نانوذرات نقره سنتز شده دارای ساختار کروی با ابعاد حدود ۳۰ نانومتر بودند. فعالیت آنتی بیوفیلیم و حذف بیوفیلیم توسط نانوذرات یدید نقره به ترتیب در ۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

بحث: بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق نانوذرات یدید نقره می‌تواند به عنوان عامل ضد میکروبی موثر برای مهار تشکیل بیوفیلیم لیستریا مونوسیتوزنز در صنایع غذایی استفاده شود.

کلیدواژگان

آنتی بیوفیلیم، فعالیت ضد میکروبی، لیستریا مونوسیتوزنز، نانوذرات نقره.



مقدمه

لیستریامونوسایتوزنز اغلب از طریق مواد غذایی آلوده به انسان منتقل و باعث ایجاد لیستریوزیس در انسان می‌گردد. این باکتری علاوه بر ایجاد علائم معمول می‌تواند عامل عفونت غذایی منجر به مننژیت، سپتیسمی و سقط جنین در زنان باردار گردد (۱). از طرفی در موارد اپیدمیک عفونت غذایی میزان مرگ و میر ۳۰ تا ۴۰ درصد و در افراد مستعد تا ۷۵ درصد هم گزارش شده است (۲). لیستریا به طور معمول در محیط اطراف انسان و طبیعت یافت می‌شود و تاکنون مطالعات گسترده ای این باکتری را از مواد غذایی گوناگون شامل: گوشت و فراورده‌های آن شیر و لبنیات و سبزیجات جدا نموده اند (۳). لیستریامونوسایتوزنز یک باکتری سرما دوست است و لذا در دمای پایین یخچالی قادر به رشد و تکثیر است و نگهداری مواد غذایی، به ویژه مواد غذایی خام در یخچال مشکلی را حل نمی‌نماید (۴).

میزان مرگ و میر ناشی از لیستریوزیس، دوز نسبتا پایین باکتری جهت ایجاد عفونت، فراوانی آن در طبیعت و آلودگی بسیاری از مواد غذایی، باعث گردیده است تا تلاش‌های فراوانی در جهت روشن شدن مکانیسم‌های انتقال آن به مواد غذایی صورت گیرد (۵). در حقیقت بیوفیلم، گروهی از سلول‌های میکروبی است که با شبکه ای از کانال‌های داخلی در ماتریکس گلیکوپروتئینی و پلی ساکاریدی خارج سلولی به نام ماده پلی مریک خارج سلولی در ارتباط هستند. ماده پلی مریک خارج سلولی نقش انتقال مواد غذایی، اتصال به سطوح و افزایش مقاومت به عوامل باکتری کش را دارد (۶). بیوفیلم در سیستم‌های آب صنعتی، تجهیزات پزشکی و صنایع غذایی تشکیل می‌گردد (۷). بیوفیلم‌ها با عوامل ضد باکتریایی مثل ضد عفونی‌کننده‌ها، حرارت،

خشک کردن از بین نمی‌روند و بر روی سطح باقی مانده و خصوصا در بیمارستان‌ها سبب آلودگی و انتقال بیماری‌های عفونی می‌گردند و به طور فیزیکی از باکتری‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان و آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت می‌کند این پدیده یکی از علل عود بیماری‌های عفونی می‌باشد (۸). با توجه به مشکلات گفته شده نانوذرات فلزی به عنوان عوامل ضد میکروبی موثرند و آن‌ها برای هدف نگهداری مواد غذایی و محافظت در محیط صنعتی با هم ترکیب می‌شوند. نانوذرات با طراحی سطوحی می‌توانند از تشکیل بیوفیلم جلوگیری کنند که این سطوح می‌تواند کلنی شدن باکتری‌ها و تشکیل بیوفیلم را محدود کند (۹). عملکرد نانویی این سطوح با پوشش مواد نانویی بستر می‌تواند از چسبندگی باکتریایی و تشکیل بیوفیلم جلوگیری نماید. بسیاری از نانوذرات دارای خواص ضد میکروبی هستند و فعالیت‌هایی ضد تشکیل بیوفیلم را انجام و نمایش می‌دهند (۱۰).

نانو ذرات نقره عمدتا در زمینه‌هایی مانند فتوگرافی، طبقه بندی بیولوژیکی، تشخیص نوری و فعالیت ضد میکروبی استفاده شده است (۱۱). نانو ذرات نقره تشکیل بیوفیلم را از بین می‌برند (۱۲). یکی از دلایل کاربرد گسترده این نانو ذرات، به دلیل خاصیت ضد باکتریایی این ذرات است و در واقع نانو ذرات نقره برای عوامل بیماری زا یک سم تلقی می‌شوند و برای بدن انسان، غذاها و بافت‌ها بی ضررند (۱۳).

از آنجایی که از بین بردن بیوفیلم باکتریایی تشکیل شده روی سطوح، بسیار مشکل است و بیوفیلم‌ها منبع بالقوه آلودگی منجر به فساد مواد غذایی و انتقال عوامل بیماری‌ها می‌باشند، بنابراین ممانعت از تشکیل آنها و یا حذف آن‌ها از سطوح در صنایع غذایی برای سلامت عمومی جامعه حائز اهمیت می‌باشد که در نتیجه در این تحقیق سعی شد با سنتز نانوذرات نقره از تشکیل بیوفیلم باکتری لیستریامونوسایتوزنز جلوگیری شود.



مواد و روش کار

تهیه نانوذرات یدید نقره به روش سونوشیمیایی^۱

۰,۴۲۵ گرم نیترات نقره را در ۲۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل کرده و بعد ۰,۲ گرم سدیم دو سیل سولفات به آن اضافه شد، سپس در یک بشر دیگر مقدار ۰,۴۱۵ گرم یدید پتاسیم را در ۲۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل کرده، سپس در دستگاه اولتراسیون یدید پتاسیم به محلول نیترات نقره و سدیم دو سیل سولفات به صورت قطره قطره اضافه شد. سپس محلول آماده شده در داخل فالكون ریخته شد و در سانتیفریژ دور ۱۳۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه گذاشته شد. رسوب حاصله جدا گردید و با آب مقطر و اتانول شستشو داده شد سپس در دمای اتاق و به دور از نور خورشید خشک گردید. نانو ذرات نقره آماده گردید که برای اطمینان از حضور و ویژگی‌های نانو ذرات به بنیاد علوم کاربرد رازی در تهران فرستاده شد و نتایج بررسی گردید (۱۴).

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده یدید نقره

در این تحقیق بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات یدید نقره به دو روش چاهک گذاری و حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC^۲) انجام شد.

چاهک گذاری^۳

در این روش از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. ابتدا سوآب استریل را با سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک فارلند به خوبی آغشته نموده و در سطح پلیت کشت چمنی داده شد. سپس با انتهای پیپت پاستور، چاهک به قطر 6 میلی متر ایجاد کرده و مقدار 5×10^5 میکروگرم بر میلی لیتر از

نانوذرات نقره و در اندازه‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر در شرایط استریل درون چاهک‌ها ریخته شد و پلیت‌ها به مدت ۱ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در صورت مشاهده هاله عدم رشد باکتری، قطر هاله اندازه‌گیری شد (۱۵).

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) با استفاده از میکرودایلوشن

تهیه سوسپانسیون باکتریایی

برای تهیه سوسپانسیون 1.5×10^6 ابتدا ۱۰ میکرولیتر از کدورت نیم مک فارلند را در ۱۹۰ میکرولیتر آب مقطر حل کرده و سپس ۲۰ میکرولیتر از رقت دوم را در ۱۸۰ میکرولیتر آب مقطر ریخته تا کدورت 1.5×10^6 به دست آمد.

MIC پایین ترین غلظت دارویی است که در آن هیچ رشد قابل مشاهده باکتریایی بعد از گرماگذاری دیده نمی شود. ولی رشد در محیط کنترل باید دیده شود. در این مطالعه از پلیت‌های ۹۶ خانه ای استفاده گردید. در داخل این میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای، ابتدا به ۱۰ تا از خانه‌های ردیف اول آن، ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات اضافه کردیم، به خانه ۱۱، ۱۵۰ میکرولیتر محیط و سوسپانسیون باکتریایی اضافه شد و به خانه ۱۲ نیز ۱۵۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات بدون باکتری و بدون نانوذرات اضافه گردید.

سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات در خانه اول ریخته شد و بعد از خانه اول ۱۰۰ میکرولیتر بر داشته شد و در خانه دوم ریخته شد و به همین ترتیب تا خانه ۱۰ پیش رفتیم و ۱۰۰ میکرولیتر آخر را دور ریختیم. سپس به خانه‌های ردیف اول تا دهم ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی اضافه شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه قرار گرفت. سپس بعد از گذشت زمان مورد نظر رشد میکروبی از طریق

1. Ultrasonic
2. Minimum Inhibitory Concentration
3. Well diffusion



مدت ۲۰ دقیقه ثابت شدند، سپس متانول باقی مانده را از پلیت‌ها خارج کرده و برای رنگ آمیزی از ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد پلیت‌ها با استفاده از آب مقطر استریل تا خارج شدن کامل رنگ شست و شو داده شدند و در مجاورت هوا خشک شدند، سپس با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ متصل شده به باکتری‌های موجود در بیوفیلم را از آن‌ها جدا کرده و در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA Reader حداکثر طول موج جذبی (OD)، هر چاهک خوانده شد (آزمایش سه بار تکرار شد). (۱۸ و ۱۹).

بررسی اثر مهار کنندگی از تشکیل بیوفیلم در باکتری لیستریا مونوسایتوزنز با روش میکروپلیت

روش اندازه گیری میزان تأثیر ضد بیوفیلمی به این صورت بود که ابتدا از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ای از جنس پلی استایرن استفاده شد به این ترتیب که مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت در داخل چاهک‌ها ریخته شد مقدار ۴۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف نانو به چاهک‌ها اضافه شد و در نهایت مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی هم اضافه شد یکی از چاهک‌ها به عنوان شاهد دارای ۲۵۰ میکرولیت محیط و باکتری و یک چاهک دیگر به عنوان شاهد منفی دارای ۲۵۰ میکرولیت محیط بدون باکتری و بدون نانوذرات انتخاب شد.

سپس میکروپلیت‌ها در دو زمان متفاوت ۲۴ و ۴۸ ساعت در داخل انکوبه ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد و بعد از گذشت زمان‌های متوالی میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج و محتویات آن‌ها را به آرامی خالی کرده و برای حذف باکتری‌های متصل نشده، چاهک‌ها با استفاده از آب مقطر یک بار شست و شو داده شدند. در مرحله بعد باکتری‌های بیوفیلم در کف چاهک‌ها با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر متانول به

طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و کمترین غلظتی از نانو ذرات که مانع رشد باکتری مورد آزمایش شد به عنوان MIC گزارش گردید (آزمایش سه بار تکرار شد) (۱۶).

غلظت مورد استفاده برای نانوذرات یدید نقره ۱۰۰ میکروگرم بر میلی به دست آمد. به این ترتیب که برای نانوذرات نقره، ۰,۰۰۵ گرم از نانوذرات یدید نقره در ۵۰ سی سی آب مقطر استریل حل شد تا رقت ۱۰۰ به دست آمد (۱۷).

توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری لیستریا مونوسایتوزنز به روش میکروپلیت

توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری لیستریا مونوسایتوزنز با روش میکروپلیت انجام شد. به صورت خلاصه، ۱۸۰ میکرولیتر از سه محیط مختلف (برین هارت اینفیوژن برات، لوریا برتانی برات، تریپتون سوی برات) با سمپلر استریل درون چاهک‌های میکروپلیت ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت 1.5×10^6 در هر سه محیط به هر چاهک اضافه شد طوری که حجم محتویات هر چاهک به ۲۰۰ میکرولیتر رسید. از چاهک‌های ردیف آخر به عنوان شاهد منفی (بلانک) استفاده شده که حاوی فقط ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون باکتری در نظر گرفته شده بود. (به منظور کاهش خطا و ارائه تجزیه تحلیل قابل اعتماد نتایج، برای باکتری مورد آزمون حداقل سه چاهک در نظر گرفته شد).

سپس پلیت‌ها در ۵ متوالی روز و در دمای ۳۷ درجه بررسی شدند. بعد از گذشت زمان‌های متوالی میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج و محتویات آن‌ها را به آرامی خالی کرده و برای حذف باکتری‌های متصل نشده، چاهک‌ها با استفاده از آب مقطر یک بار شست و شو داده شدند. در مرحله بعد باکتری‌های بیوفیلم در کف چاهک‌ها با استفاده از ۱۵۰ میکرولیتر متانول به



مدت ۲۰ دقیقه ثابت شدند، سپس متانول باقی مانده را از پلیت‌ها خارج کرده و برای رنگ آمیزی از ۲۵۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد پلیت‌ها با استفاده از آب مقطر استریل تا خارج شدن کامل رنگ شست و شو داده شدند و در مجاورت هوا خشک شدند، آن گاه با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ متصل شده به باکتری‌های موجود در بیوفیلم را از آن‌ها جدا کرده و در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA Reader حداکثر طول موج جذبی (OD)، هر چاهک خوانده شد (آزمایش سه بار تکرار شد). رقت‌های استفاده شده در مهار بیوفیلم برای نانو ذرات یدید نقره ۲۰، ۲۵، ۱۵، ۱۰، ۵ و میکروگرم بر میلی لیتر بود (۲۰ و ۱۷). سپس نتایج مهار بیوفیلم در رقت‌های مختلف نانوذرات بررسی شد.

بررسی اثر نانوذرات در حذف بیوفیلم باکتری لیستریا مونوسایتوزنز با روش میکروپلیت

برای سنجش اثر این نانوذرات به منظور حذف و یا کشتن سلول‌های مولد بیوفیلم، از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ای استفاده شد به این ترتیب که مقدار ۲۰۰ میکرولیت از محیط کشت در چاهک‌ها ریخته شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل 1.5×10^6 اضافه شد یکی از چاهک‌ها به عنوان شاهد دارای ۲۵۰ میکرولیتر محیط و باکتری و یک چاهک دیگر به عنوان شاهد منفی دارای ۲۵۰ میکرولیت محیط بدون باکتری و بدون نانوذرات در نظر گرفته شد. سپس میکروپلیت‌ها در گرمخانه ۳۷ گذاشته شدند. بعد از گذشت مدت زمان معین برای تشکیل بیوفیلم پاتوژن‌ها، میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج و مقدار ۴۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف نانوذرات به آنها اضافه شد و بعد دوباره به مدت ۲۴ ساعت در انکوبه گذاشته شدند. سپس

میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج و محتویات آن‌ها را به آرامی خالی کرده و چاهک‌ها با استفاده از آب مقطر یک بار شست و شو داده شدند تا تمامی باکتری‌های پلانکتونیک حذف گردند. در مرحله بعد باکتری‌های بیوفیلم در کف چاهک‌ها با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر متانول به مدت ۲۰ دقیقه ثابت شدند، سپس متانول باقی مانده را از پلیت‌ها خارج کرده و برای رنگ آمیزی از ۲۵۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد پلیت‌ها با استفاده از آب مقطر استریل تا خارج شدن کامل رنگ شست و شو داده شدند و در مجاورت هوا خشک شدند، آن گاه با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ متصل شده به باکتری‌های موجود در بیوفیلم را از آن‌ها جدا کرده و در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA Reader حداکثر طول موج جذبی (OD)، هر چاهک خوانده شد (آزمایش سه بار تکرار شد). رقت‌های استفاده شده در حذف بیوفیلم برای نانو ذرات یدید نقره، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد (۱۷، ۲۱ و ۲۲).

سنجش میزان تشکیل بیوفیلم

وضعیت تشکیل بیوفیلم در چاهک‌ها نیز طبق فرمول زیر محاسبه گردید که در آن ODC میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل و ODT میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار می‌باشد (۲۳).

عدم تشکیل بیوفیلم = $OD \leq ODC$

قدرت تشکیل بیوفیلم = $OD \leq (2 \times ODC) < ODC$

ضعیف

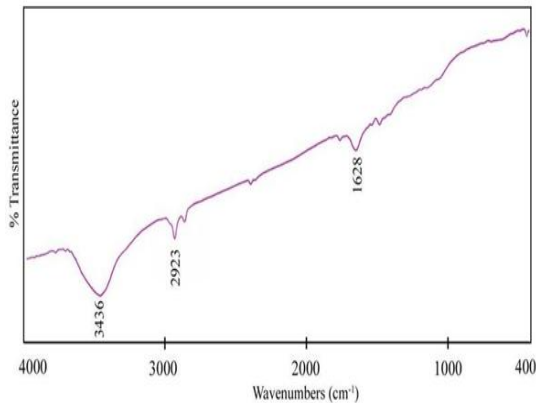
قدرت تشکیل = $(4 \times ODC) < OD \leq (2 \times ODC)$

بیوفیلم متوسط

قدرت تشکیل بیوفیلم قوی = $OD < (4 \times ODC)$



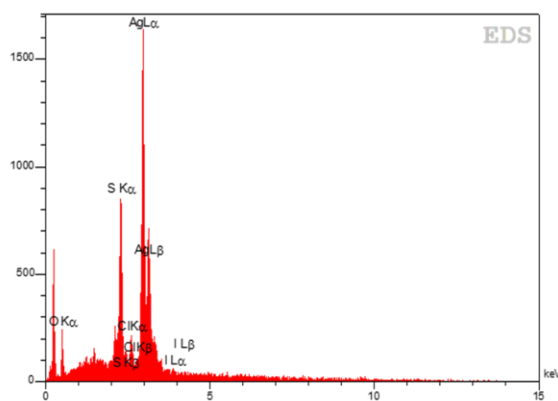
می‌باشد.



شکل ۲- طیف FTIR نانو ذرات پدید نقره

تأیید نانوذرات نقره به روش طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)^۳

نمودار ۳ طیف EDX نانوذرات پدید نقره را نشان می‌دهد که نقره بیشترین ترکیب را در بین مواد ساخته شده دارد.



شکل ۳- طیف EDX نانوذرات پدید نقره

تأیید نانوذرات پدید نقره توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)^۴

بعد از آماده سازی نانوذرات پدید نقره نتایج آن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی تأیید گردید که بنابر نتایج به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات دارای ساختار کروی بوده و دارای ابعاد حدود ۳۰ نانومتر می‌باشند.

3. Energy dispersive x ray (EDX)
4. Scanning Electron Microscop (SEM)

سنجش درصد کاهش تشکیل بیوفیلم

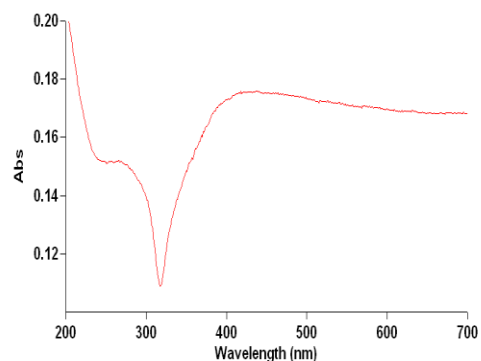
سنجش کارائی ترکیب ضد میکروبی یا درصد کاهش بیوفیلم را می‌توان از طریق جذب نوری چاهک‌های تیمار شده، کنترل و شاهد با توجه به رابطه زیر محاسبه نمود که در این رابطه ODC، میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل ODB میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد و ODT میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار شده است (۲۳).

$$\% \text{ میزان کاهش بیوفیلم} = \frac{((ODC-ODB)-(ODT-ODB))}{(ODC-ODB)} \times 100$$

نتایج

تأیید نانوذرات پدید نقره به روش طیف نگاری جذبی فرابنفش و مرئی (UV-Vis)^۱

نمودار ۱ طیف UV نانو ذرات پدید نقره را نشان می‌دهد که در ۳۲۰ نانومتر پیک داده است و یکی از مشخصه‌های نانوذرات پدید نقره می‌باشد.



شکل ۱- طیف UV نانوذرات پدید نقره

تأیید نانوذرات نقره به روش طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)^۲

نمودار ۲ طیف FTIR نانو ذرات پدید نقره را نشان می‌دهد که مشخصه وجود نانو ذرات پدید نقره

1. Ultra violet/visible spectroscopy (UV-Vis)
2. Fourier transformation infrared (FT-IR)



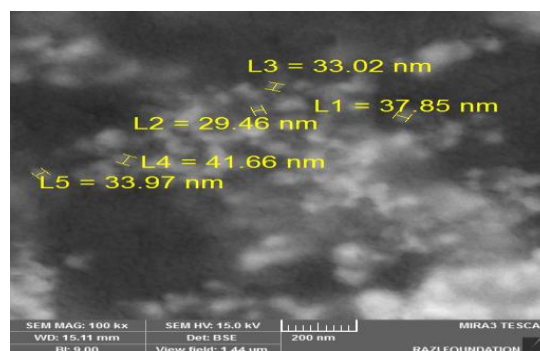
می‌دهد که باکتری بیماریزا لیستریا مونوسایتوژنز در بهترین حالت، بیشترین قطر هاله عدم رشد آن ۲۵ میلی متر مشاهده شد.

جدول ۱- قطر هاله ی عدم رشد لیستریا مونوسایتوژنز توسط نانو ذرات یدید نقره

مقدار نانو ذرات باکتری بیماریزا	۲۰ میکرو لیتر	۳۰ میکرو لیتر	۴۰ میکرو لیتر	۵۰ میکرو لیتر
لیستریا مونوسایتوژنز	۳±۲۳ mm	۳±۲۵ mm	۳±۲۵ mm	۳±۲۵ mm

روش حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) توسط نانو ذرات یدید نقره

روش حداقل غلظت مهار کنندگی توسط نانو ذرات یدید نقره بر روی باکتری لیستریا مونوسایتوژنز انجام شد. در این تحقیق غلظت مورد استفاده برای نانو ذرات یدید نقره ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد (علامت مثبت نشان دهنده رشد باکتری و علامت منفی نشان دهنده عدم رشد باکتری می‌باشد).



شکل ۸- نانو ذرات یدید نقره توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM

فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات یدید نقره

فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات یدید نقره بر روی باکتری بیماریزای لیستریا مونوسایتوژنز به دو روش چاهک گذاری و حداقل غلظت مهار کنندگی مورد بررسی قرار گرفت.

روش چاهک گذاری

روش چاهک گذاری برای نانو ذرات یدید نقره با غلظت 5×10^5 میکروگرم بر میلی لیتر در اندازه‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرو لیتر انجام شد.

چاهک گذاری نانو ذرات یدید نقره

جدول زیر نتایج حاصل از چاهک گذاری نانو ذرات یدید نقره و اندازه قطر هاله ی عدم رشد را نشان

جدول ۲- نتایج حاصل از حداقل غلظت مهار کنندگی لیستریا مونوسایتوژنز توسط نانو ذرات یدید نقره

چاهک باکتری بیماریزا	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱ تیمار شده	۱۲ کنترل شده
لیستریا مونوسایتوژنز	۰,۱۴۳	۰,۱۶۲	۰,۱۷۲	۰,۲۴۱	۰,۲۵۶	۰,۲۷۰	۰,۲۹۲	۰,۲۹۳	۰,۲۹۸	۰,۳۱۵	۰,۳۱۶	۰,۱۹۲
	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

گراد بر روی باکتری لیستریا مونوسایتوژنز بررسی شد که بهترین شرایط تشکیل بیوفیلم در لیستریا مونوسایتوژنز در محیط کشت تریپتون سوی برات و مدت زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد.

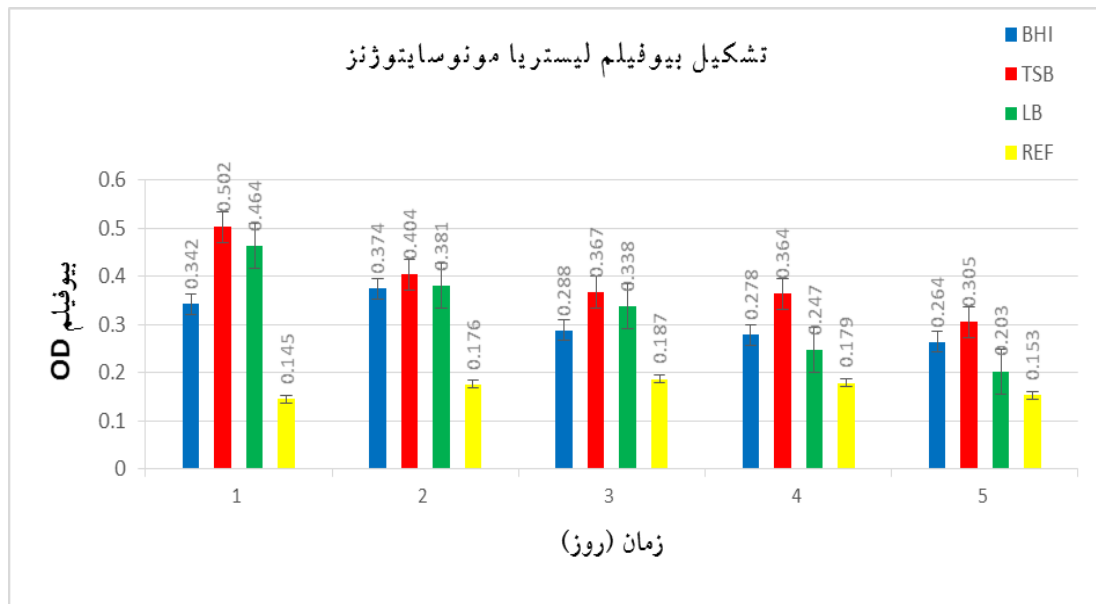
تشکیل بیوفیلم در باکتری لیستریا مونوسایتوژنز

تشکیل بیوفیلم در ۵ روز متوالی و در سه محیط کشت (برین هارت اینفیوژن برات، تریپتون سوی برات، لوریا برتانی برات) در دمای ۳۷ درجه سانتی



جدول ۳- تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسایتوژنز در ۵ روز متوالی و سه محیط کشت مختلف

محیط	روز					کنترل شده
	۱	۲	۳	۴	۵	
برین هرت ایفیوژن براث	۰,۳۴۲	۰,۳۷۴	۰,۲۸۸	۰,۲۷۸	۰,۲۶۴	۰,۱۴۵
تریپتون سوی براث	۰,۵۰۲	۰,۴۰۴	۰,۳۶۷	۰,۳۶۴	۰,۳۰۵	۰,۱۸۷
لوریا برتانی براث	۰,۴۶۴	۰,۳۸۱	۰,۳۳۸	۰,۲۴۷	۰,۲۰۳	۰,۱۷۹



شکل ۵- نمودار حاصل از تشکیل لیستریا مونوسایتوژنز در ۵ روز متوالی و سه محیط کشت مختلف

غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی باکتری لیستریا مونوسایتوژنز انجام شد.

مه‌ار بیوفیلم لیستریا مونوسایتوژنز توسط نانو ذرات
دید نقره

مه‌ار بیوفیلم توسط نانوذرات دید نقره با

جدول ۴- مه‌ار بیوفیلم باکتری لیستریا مونوسایتوژنز توسط نانوذرات دید نقره

کنترل شده	تیمار شده	رقت					باکتری‌های بیماری‌زا
		۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر	۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر	
۰,۱۷۸	۰,۵۰۰	۰,۴۰۳	۰,۳۴۳	۰,۲۸۶	۰,۲۶۸	۰,۲۵۲	لیستریا مونوسایتوژنز
		٪۳۰	٪۵۰	٪۶۶	٪۷۲	٪۷۷	درصد کاهش بیوفیلم



میکروگرم بر میلی لیتر بر روی باکتری لیستریا مونوسایتوژنز انجام شد.

حذف بیوفیلم باکتری لیستریا مونوسایتوژنز توسط نانو ذرات یدید نقره

حذف بیوفیلم توسط نانو ذرات یدید نقره با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰

جدول ۵- حذف بیوفیلم لیستریا مونوسایتوژنز توسط نانو ذرات یدید نقره

رقت	۱۰۰	۵۰	۲۵	۲۰	۱۵	۱۰	۵	تیمار شده	کنترل شده
لیستریا مونوسایتوژنز	۰,۱۸۲	۰,۲۰۴	۰,۲۲۱	۰,۲۷۵	۰,۳۱۹	۰,۳۴۳	۰,۳۹۹	۰,۵۲۰	۰,۱۸۹

میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM) انجام شد که نانو ذرات به دست آمده دارای ساختار کروی بوده و با ابعاد حدود ۳۰ نانومتر مشاهده شدند.

نی پور و همکاران در سال ۲۰۱۵ در بررسی مقایسه‌ای اثرات آنتی میکروبیال نانو پارتیکل‌های نقره و روی بر باکتری‌های پاتوژن سودوموناس آئروجینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس، نانو ذرات نقره را به روش رسوب گیری شیمیایی سنتز کردند و تأییدیه نانو ذرات را با روش میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) انجام دادند که ابعاد به دست آمده از نانو ذرات آنها حدود ۲۰-۳۵ نانومتر مشاهده شده است (۲۵).

در این تحقیق برای انجام خاصیت ضد میکروبی بر روی لیستریا مونوسایتوژنز از نانو ذرات یدید نقره سنتز شده استفاده شد. نتایج حاصل نشان داد که نانو ذرات یدید نقره به روش چاهک گذاری و حداقل غلظت مهار کنندگی دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی باکتری لیستریا مونوسایتوژنز بوده است.

توکلیان و همکاران در سال ۲۰۱۴ ابتدا نانو ذرات نقره را تولید کردند سپس خاصیت آنتی میکروبی قطعات سفال محتوی نانو ذرات نقره بر روی دو پاتوژن غذایی اش‌ریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند. اثر مثبت آنتی باکتریال نانو ذرات نقره در هر

بحث و نتیجه گیری

نانو ذرات نقره به دلیل خواص ضد میکروبی بی نظیر و سمیت کم برای سلول‌های پستانداران به یکی از رایج‌ترین نانو ذرات در محصولات مصرفی تبدیل گشته‌اند. در میان نانومواد دارای خاصیت ضد میکروبی، نانو ذرات نقره به صورت گسترده استفاده میشوند. این ذرات به عنوان عوامل ضد میکروبی در بیش از ۱۰۰ محصول مصرفی از مکمل‌های غذایی گرفته تا پوشش‌دهندگان سطوح به کار رفته اند (۲۴).

در پژوهش حاضر اثر نانو ذرات نقره در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسایتوژنز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به خوبی نشان داد که نانو ذرات نقره می‌توانند مانع تشکیل بیوفیلم این باکتری شوند. نانو ذرات نقره در غلظت ۵ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع تشکیل بیوفیلم شد و در غلظت‌های بالاتر توانست بیوفیلم تشکیل شده را از بین ببرد.

در این تحقیق نانو ذرات یدید نقره به روش سونوشیمیایی سنتز شد و تأییدیه آن با استفاده از روش‌های طیف نگاری جذبی فرابنفش مرئی (UV-VIS)، طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، طیف سنج پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) و



مورد تایید شد و مشخص کردند که اثر ظروف تولید شده محتوی نانو ذرات نقره بر روی باکتری گرم منفی اشرشیاکلی بیشتر از باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوساست. تصور می‌شود این بدلیل ضخامت بیشتر دیواره پتیدوگلیکان در باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی است. همچنین نشان دادند با افزایش میزان نقره قطعات سفال محتوی نانو ذرات نقره خاصیت ضد میکروبی این ظروف افزایش می‌یابد (۲۶).

در تحقیق حاضر در بررسی فعالیت مهار کنندگی از تشکیل بیوفیلم از نانوذرات یدید نقره طبق بررسی‌های انجام شده در روش حداقل غلظت مهار کنندگی از غلظت‌های ۲۵، ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. طبق مشاهدات انجام شده اثر نانوذرات یدید نقره در تشکیل بیوفیلم بر روی باکتری لیستریا مونوسایتوزنز بررسی شد که نانو ذرات یدید نقره در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مهار ۷۷٪ را داشته است.

پالانیسمی و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر نانو ذرات نقره در تشکیل بیوفیلم در سویه‌های حساس و مقاوم به چند دارو از سودوموناس آئرجینوزا را بررسی کردند. در سویه حساس با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذرات نقره مهار ۶۷٪ را داشته است و با همین غلظت از نانو ذرات نقره در سویه مقاوم مهار ۵۶٪ را داشته است. بنابراین اثبات کردند که نانو ذرات نقره می‌تواند به عنوان یک درمان جایگزین برای کاهش شدت بیماری به علت عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئرجینوزا استفاده شود (۲۷).

حذف ناقص بیوفیلم موجب رشد مجدد قسمت باقی مانده بیوفیلم روی سطوحی که هنوز دارای تعدادی سلول‌های زنده هستند، می‌گردد. این پدیده باعث می‌شود که میکروارگانیسم‌ها بعد از گذشت مدت زمان کوتاهی به حالت اولیه خود برگردند، ساختمان خود را تعمیر کنند و دوباره سبب آلودگی

سیستم شوند. از این رو توجه به این نکته ضروری است که بعد از اثر عوامل ضد میکروبی چه میزان ویا چه تعداد از سلول‌های بیوفیلم هنوز زنده هستند و توانایی رشد و تکثیر را دارند. در پژوهش حاضر در بررسی حذف بیوفیلم، غلظت‌های مورد استفاده از نانوذرات یدید نقره ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد و اثر نانوذرات نقره در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسایتوزنز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به خوبی نشان داد که نانوذرات نقره می‌توانند مانع تشکیل بیوفیلم این باکتری شوند. نانو ذرات نقره در غلظت ۵ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مانع تشکیل بیوفیلم شد و در غلظت‌های بالاتر توانست بیوفیلم تشکیل شده را از بین ببرد.

مرتضوی و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر نانوذرات نقره را در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمایتیس مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که نانوذرات کلوئیدی نقره می‌توانند مانع تشکیل بیوفیلم این باکتری شوند و همچنین نشان دادند که نانو ذره نقره در غلظت $\geq 0/5$ ppm مانع تشکیل بیوفیلم شد و در غلظت‌های بالاتر (≥ 150 ppm) توانست بیوفیلم تشکیل شده را از بین ببرد (۲۸).

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد نانوذرات نقره می‌تواند از تشکیل بیوفیلم باکتری لیستریا مونوسایتوزنز جلوگیری نماید و در غلظت‌های بالاتر توانایی از بین بردن بیوفیلم از قبل تشکیل شده را دارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی قم انجام شده است که بدین وسیله از مسئولین محترم این دانشگاه تشکر و قدردانی می‌شود.



منابع و مأخذ

1. Farber JM, Peterkin Pl. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol Rev* 1991; 55: 476-511.
2. Aguado v, Vitas Al, Garcia-Jalon I. Characterization of *L. monocytogenes* and *L. Innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *Int J Food Microbiol* 2004; 90(3): 341-7.
3. Bell C. *Listeria*, A practical approach to the organism and its control in foods. 2nd ed. London: Blackwell Pub; 2005; 50.
4. Hof H, Rocourt J. Is any strain of *L. monocytogenes* detected in food a health risk? *Int J food Microbiol* 1992; 16(3): 173-81.
5. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms: annual reviews. *J Microbiol* 1995; 49: 711-745.
6. Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
7. Trachoo, N. (2003). Biofilms and the food industry. *Biofilms*, 25(6), 808.
8. Hoyle, B. D., & Costerton, J. W. (1991). Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. In *Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques* (pp. 91-105). Birkhäuser Basel.
9. Aswathanarayan, J. B., & Vittal, R. R. (2013). Microbial biofilms and their control by various antimicrobial strategies. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Microbial Pathogens and strategies for combating them: Science, Technology and Education* (pp. 124-133). Formatex Badajoz.
10. Lellouche, J., Friedman, A., Gedanken, A., & Banin, E. (2012). Antibacterial and antibiofilm properties of yttrium fluoride nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 7, 5611-5624.
11. Kearns, G. J., Foster, E. W., & Hutchison, J. E. (2006). Substrates for direct imaging of chemically functionalized SiO₂ surfaces by transmission electron microscopy. *Analytical chemistry*, 78(1), 298-303.
12. Chapman, J., Weir, E., & Regan, F. (2010). Period four metal nanoparticles on the inhibition of biofouling. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 78(2), 208-216.
13. Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27(1), 76-83.
14. Safaei-Ghomi, J., & Ghasemzadeh, M. A. (2013). Silver iodide nanoparticle as an efficient and reusable catalyst for the one-pot synthesis of benzofurans under aqueous conditions. *Journal of Chemical Sciences*, 125(5), 1003-1008.
15. Lertcanawanichakul, M., & Sawangnop, S. (2011). A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 5(2), 161-171.
16. Glamoclija, J. M., Sokovic, M. D., Siljegovic, J. D., Ristic, M. S., Ciric, A., & Grubisic, D. V. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Echinophora spinosa* L.(Apiaceae) essential oil. *Records of Natural Products*, 5(4), 319.
17. Khiralla, G. M., & El-Deeb, B. A. (2015). Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1001-1007.
18. Palanisamy, N. K., Ferina, N., Amirulhusni, A. N., Mohd-Zain, Z., Hussaini, J., Ping, L. J., & Durairaj, R. (2014). Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of nanobiotechnology*, 12(1), 2.



19. Kalpana, B. J., Aarthy, S., & Pandian, S. K. (2012). Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(6), 1778-1794.
20. Duarte, A., Alves, A. C., Ferreira, S., Silva, F., & Domingues, F. C. (2015). Resveratrol inclusion complexes: antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. *Food Research International*, 77, 244-250.
21. Mortazavi, H., Nakhaei Moghaddam, M., & Abadi, N. S. (2015). Study of the Effect of Silver Nanoparticles on Biofilms Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 14(2), 125-136.
22. Dheilily, A., Soum-Soutéra, E., Klein, G. L., Bazire, A., Compère, C., Haras, D., & Dufour, A. (2010). Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. *Applied and environmental microbiology*, 76(11), 3452-3461.
23. Habibipour, R., & Moradi Haghgou, L. (2015). Study on Hydro-Alcoholic Extract Effect of Pomegranate Peel on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences*, 22(3), 195-202.
24. Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential application and implications. *Water Res* 2008; 42(18): 4591-602.
25. Nabipour, Y., Rostamzad, A., & Ahmadi, S. (2015). The Evaluation of Antimicrobial Properties of Zink and Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus*. www.sjimu.medilam.ac.ir, 23(5), 173-181.
26. Tavakolian, S., Manteghian, M., Asadi, Gh., Najarpiraie, Sh., Shabian, Sh. (2014). Impregnation of porcelain pots with silver nanoparticles by an innovative pervaporation technic and study of the effects on food stock pathogens (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), 4, 693-8.
27. Palanisamy, N. K., Ferina, N., Amirulhusni, A. N., Mohd-Zain, Z., Hussaini, J., Ping, L. J., & Durairaj, R. (2014). Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of nanobiotechnology*, 12(1), 2.
28. Mortazavi, H., Nakhaei Moghaddam, M., & Abadi, N. S. (2015). Study of the Effect of Silver Nanoparticles on Biofilms Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 14(2), 125-136.

