

## مقاله تحقیقی

سنتز و بررسی اثر ضد میکروبی کامپوزیت گرافن اکسید-کیتوزان بر علیه باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس

رسول منصوری<sup>۱</sup>، معصومه مهدوی اور تاکنند<sup>۲\*</sup>، مهساسادات میرعلینقی<sup>۳</sup>

۱. گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا،

ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

۳. گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

\*مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: masumehmahdavi@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۲۴

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۸

### چکیده

مقابله با پدیده مقاومت دارویی در راستای کاهش بروز آن و یا محدود نمودن عوامل میکروبی مقاوم از اهمیت زیادی برخوردار است. این مطالعه با هدف سنتز گرافن اکسید اصلاح شده با کیتوسان و بررسی اثر ضد میکروبی آن بر علیه اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد. پس از سنتز گرافن اکسید، اصلاح ساختار سطحی آن با کیتوسان (CS/GO) انجام شد. شکل و اندازه تقریبی نانو ورقه های GO و CS/GO با استفاده از میکرو سکوپ الکترونی عبوری نشر میدان (SEM) و دستگاه پراش پرتو X (XRD) بررسی شد. اثر ضد میکروبی گرافن اکساید و کامپوزیت گرافن اکساید - کیتوسان روی سویه استاندارد باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به روش میکروداپلوشن برآت، انجام شد. یافته های این مطالعه نشان داد که گرافن اکساید به تنهایی بر علیه اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس موثر می باشد ولی اصلاح ساختار سطحی گرافن اکساید با کیتوسان اثر ضد میکروبی آن را به مقدار قابل توجهی افزایش داده است. بر اساس نتایج به دست آمده نانو کامپوزیت CS/GO می تواند در درمان عفونت های باکتریایی مود استفاده قرار گیرد.

**واژه های کلیدی:** گرافن اکساید اصلاح شده با کیتوسان، کامپوزیت، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس، اثر ضد میکروبی

### مقدمه

ساختار در حدود ۰/۳۳۵ نانومتر است که این بدان معناست که سه میلیون لایه گرافن انباشته شده بر روی هم در حدود یک میلی متر پهنا دارد (۱). در چند سال گذشته، تحقیقات در باره گرافن و گرافن اکسید در کاربردهای زیست پزشکی، گسترده و چشمگیر بوده است، که این ناشی از خواص منحصر به فرد، ساختار دو بعدی مسطح، سطح بزرگ شیمیایی، پایداری مکانیکی و شیمیایی بالا، سمیت سلولی

گرافن، آلوتروپی از کربن است به ضخامت یک اتم که از شبکه ای لانه زنبوری شکل از کربن های  $sp^2$  تشکیل شده است که اولین بار در سال ۲۰۰۴ میلادی سنتز شده است. طول پیوند کربن - کربن در این ساختار در حدود ۰/۱۴۲ نانومتر است. لایه های گرافن بر روی هم انباشته می شوند تا گرافیت را تشکیل دهند که فاصله هر دو لایه در این

افزایش یافته است تا بتوان به وسیله آنها، قدرت و طیف ا ضد میکروبی را نسبت به گذشته توسعه داد (۷). به این منظور این مطالعه با هدف درمان ترکیبی بر علیه باکتر های گرم مثبت و گرم منفی، استفاده از روش سند کامپوزیت گرافن اکسید/کیتوزان و بررسی اثر ضد میکرو؛ آن بر علیه سویه های استاندارد اشرشیاکلی استفیلوکوکوس انجام شد.

### مواد و روش‌ها

#### سنتز گرافن اکسید (GO)

سنتز گرافن اکسید، با اندکی تغییرات به روش هام انجام شد (۸). ۲/۵ g سدیم نیترات به ۱۱۵/۰ mL محلول  $H_2SO_4$  در ارلنی ته صاف به حجم ۵۰۰ mL، درون حم یخ اضافه و برای کاهش دما به مدت ۱۵ min همزده شد سپس، ۲/۵ g پودر گرافیت به تدریج به محلول اضافه و همزدن سریع کاملاً در محلول پخش شد. ۱۵/۰ g پتاس پرمنگنات به آرامی به مخلوط واکنش اضافه و دما به ط مداوم و با دقت به وسیله دماسنج کنترل شد، به طور که همواره پایین‌تر از  $15^{\circ}C$  باقی بماند. سوسپانسیو حاصل، ۶۰ min در حمام فراصوت با دمای  $35^{\circ}C$  همزده شد. آن‌گاه، در زیر هود با ۲۵۰/۰ mL آب دیونیزه رقیق شد و ظرف واکنش در حمام آب داغ به مدت ۱۵ min در ای دما نگهداشته و محلول همزده شد. در پایان، برای کاهش پرمنگنات باقی مانده به یون‌های منگنز در محلول آبی، L ۲۵/۰ آب اکسیژنه، قطره قطره به آن اضافه شد. در این مرحله رنگ محلول قهوه‌ای تیره مشاهده شد. گرافن اکسید تولیدی پس از سانتریفوژ کردن محلول با دور بالا صاف، با ۲۵۰/۰ mL محلول آبی HCl (۱:۱۰) برای حذف یون‌های فلزی و سپس چندین بار با آب مقطر برای حذف اسید شستشو داده شد تا محلول زیر صافی کاملاً خنثی شود. جامد سیاه رنگ باقی مانده در دمای محیط خشک شد. ساختار شیمیایی و نوع گروه‌های عاملی گرافن اکسید با دستگاه طیف‌سنج تبدیل فوریه‌ی زیر قرمز (مدل 870 NEXUS Thermo Nicolet، آمریکا) بررسی شد. دستگاه پراش اشعه‌ی ایکس (مدل Philips PW 1800، آمریکا) با پرتو  $Cu K\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) برای شناسایی ذ

پایین و زیست سازگاری خوب این ماده می باشد و تا به امروز این ماده در زمینه‌های مختلف ضدباکتری، مهندسی بافت و دارورسانی به کارگرفته شده است (۲). اثر گرافن اکسید برای از بین بردن طیف گسترده‌ای از عوامل بیماریزا از جمله باکتريوفاژ MS2 و باکتری ها مختلف مانند استفیلوکوک اورئوس، اشریشیا کلی، سالمونلا، انترکوکوس فاسیوم، انترکوکوس فکالیس و شیگلا مطالعه و تایید شده است (۳). همچنین گرافن و مشتقات آن دارای فعالیت مهارکنندگی در برابر برخی از پاتوژن های مهم مانند استفیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، آسینتوباکتر بومانی و کلبسیلا پنومونیه میباشد. این نانوساختار می تواند با القا مرگ سلولی به عنوان یک مهارکننده ی خوب مانع از رشد باکتری ها شود (۴).

کیتوسان یک آمینو پلی ساکارید خطی ترکیبی از رابط های به طور تصادفی پراکنده شده (۴→۱) واحدهای D-گلوکز آمین و N-استیل-D-گلوکز آمین است. کیتوسان توسط داستیلاسیون کیتین (پلی ساکارید طبیعی و فراوان موجود در اسکلت خارجی سخت پوستانی همچون خرچنگ و میگو) تهیه می‌شود (۵). این پلی ساکارید کاتیونی به دلیل دسترس پذیری فراوان، چسبندگی بی نظیر، خواص دارویی مناسب و دیگر خواص سودمند بیولوژیکی مثل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، عدم سمیت و تحریک کم سیستم ایمنی، در موارد پزشکی، بیوتکنولوژی و دارویی مورد توجه گسترده قرار گرفته است. خواص فیزیکیوشیمیایی و بیولوژیکی کیتوسان به شدت توسط وزن مولکولی و درجه داستیلاسیون، تحت تاثیر قرار می گیرد. کیتوسان در آب محلول و دارای بار مثبت است و این ویژگی از نقطه نظر تکنیکی اهمیت بسیاری دارد چرا که پلیمر را قادر می سازد تا با پلیمرهای دارای بار منفی، درشت مولکول‌ها و حتی با برخی پلی آنیون‌ها در محیط آبی برهم کنش داشته باشد. پس از برهمکنش کیتوسان با گروه‌های آنیونی روی سطح سلول، تخریب غشا آغاز می‌شود و در پی آن پروتئین‌های سلولی شکسته می‌شوند (۶). با توجه به گسترش مقاومت های آنتی بیوتیکی در باکتری ها و افزایش هزینه های سنگین درمانی آنها، تمایل به سنتز ترکیبات ضد میکروبی موثرتر از منابع جدید

1800، آمریکا) با پرتو Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) به کار برده شد. شکل ظاهری و ویژگی‌های سطحی آن استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری نشر میدان (FE-SEM) (مدل Sigma، شرکت Zeiss، آلمان) تعیین شد.

#### تهیه سوبیه های باکتری استاندارد مورد مطالعه

باکتری های مورد مطالعه، باکتری گرم منفی *Escherichia coli* (ATCC 25922) و باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) بود که به صورت لیوفریزه از کلکسیون میکروبی ایران در انستیتو پاستور خریداری شد.

**تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) گرافن اکسید و گرافن اکسید اصلاح شده با کیتوسان به روش میکروداپلوشن برات**  
برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، ابتدا گرافن اکسید توسط محلول سرم فیزلولوژی رقیق شد. ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۴۰۰ تا ۳/۱۲  $\mu\text{g/ml}$  از گرافن اکسید براساس روش سریال داپلوشن به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی افزوده شد. سوسپانسیون میکروبی که با نیم مک فارلند برابر شده بود به وسیله محیط کشت مولر هینتون برات به میزان ۱/۱۰۰، جهت به دست آوردن تعداد  $10^6 \times 0.5$  CFU/ml رقیق شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌ها افزوده شد. در این آزمون آنتی بیوتیک جنتامایسین به عنوان کنترل نمونه در نظر گرفته شد. به منظور کنترل زمینه از گرافن اکسید و محیط کشت (بدون سوسپانسیون میکروبی) استفاده شد. سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت بدون گرافن اکسید به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. در نهایت میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، انکوبه شد. پایین‌ترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد و فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. این آزمایش برای هر باکتری سه بار تکرار گردید.

بلوری ورقه‌های گرافن اکسید به کار برده شد. شکل ظاهری و ویژگی‌های سطحی گرافن اکسید با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری نشر میدان (FE-SEM) (مدل Sigma، شرکت Zeiss، آلمان) تعیین شد.

#### تهیه گرافن اکسید اصلاح شده با کیتوسان (CS/GO)

ابتدا محلول ۲٪ V/V از استیک اسید تهیه شد. بدین ترتیب که ۱ mL استیک اسید با سمپلر جدا و در یک بالون ۵۰ mL با آب دیونیزه به حجم رسانده شد. سپس ۰/۴ پودر کیتوسان (خریداری شده از شرکت سیگما آلدریج) به تدریج به ۲۰ mL محلول ۲٪ V/V استیک اسید افزوده و انحلال انجام شد تا یک محلول ۲٪ W/V از کیتوسان به دست آید. سپس محلول ۲۴ ساعت در دمای اتاق با قرار دادن مگنت داخل ظرف هم زده شد. روز بعد محلول یک ساعت در حمام فرا صوت با دمای ۲۵ °C قرار گرفت سپس ۳ mL گلو تار آلدئید (GLA) (۵۰٪ WT) در آب) به عنوان عامل ایجاد کننده اتصال عرضی به محلول کیتوسان آرام آرام افزوده و به مدت نیم ساعت همزدن ادامه یافت. ۰/۳ g گرافن اکسید به مخلوط اضافه و به مدت ۹۰ min در حمام آب با دمای ۵۰ °C به طور مداوم با قرار دادن مگنت داخل ظرف واکنش هم زده شد. با اندازه گیری pH محلول حدود ۳/۵ بود.

سپس محلول سود ۰/۱ M (در ۱۰۰ mL آب ۰/۴ گرم سود) تهیه شد و آرام آرام سود را به محلول اضافه نموده تا pH حدود ۹/۵ شد و ۶۰ min در دمای ۸۰ °C در حمام آب قرار گرفت و محلول حاصل را درون قیف ریخته، ابتدا با اتانول برای اینکه pH برابر ۷ شود و سپس چندین بار با آب دیونیزه شستشو داده شد. محصول نهایی در دمای ۴۰ °C خشک شد. CS/GO پس از خشک شدن درون هاون کاملاً ساییده شد تا اندازه‌ی ذرات آن به ۷۵ تا ۱۲۵  $\mu\text{m}$  برسد. ساختار شیمیایی و نوع گروه‌های عاملی با دستگاه طیف‌سنج تبدیل فوریه‌ی زیر قرمز (مدل 870 NEXUS شرکت ThermoNicolet، آمریکا) بررسی شد. دستگاه پراش اشعه‌ی ایکس (مدل Philips PW

<sup>2</sup>minimum bactericidal concentration

<sup>1</sup>minimum inhibitory concentration

C=O گروه کربوکسیلیک اسید و خمشی C—O—H گروه-های فنلی هستند. پیک‌های واقع در  $1632$  و  $1790$   $\text{cm}^{-1}$  به ترتیب، به ارتعاشات کششی C=C آروماتیک و ارتعاشات خمشی C—H نسبت داده می‌شوند. گروه‌های عاملی قطبی به ویژه گروه‌های هیدروکسیل تشکیل پیوند هیدروژنی میان لایه‌های GO و نیز میان GO و مولکول‌های آب را تسهیل می‌سازند.

الگوی کیتوسان در شکل ۴-۱ (c) دارای یک پیک قوی و پهن در محدوده  $3200 - 3500$   $\text{cm}^{-1}$  است که به ارتعاشات کششی O—H ارتعاش امتداد یافته‌ی  $\text{N—H}^+$  و پیوندهای هیدروژنی میان مولکول پلی ساکارییدی کیتوسان نسبت داده می‌شود. دو نوار شاخص واقع در  $1608$  و  $1660$   $\text{cm}^{-1}$  به ترتیب، متعلق به ارتعاش خمشی N—H در  $\text{NH}_2$  و ارتعاش کششی C=O در راستای شیوه‌ی تغییر شکل  $\text{N—H}^+$  در  $\text{NHCO}$  (آمید نوع ۱) است. در طیف کامپوزیت CS/GO (شکل ۴-۱ (b)) شدت پیک‌های ظاهر شده در  $3400$  ( $\nu_{\text{O—H}}$ ) و  $1075$  ( $\nu_{\text{C—H}}$ ) در مقایسه با GO (طیف (a)) افزایش یافته است. حضور این پیک‌ها ناشی از ارتعاشات گروه‌های —OH کیتوسان است که روی سطح GO جذب شده‌اند. پیک واقع در  $1743$   $\text{cm}^{-1}$  (مربوط به گروه‌های کربوکسیلیک GO) در طیف CS/GO ناپدید شده است. این امر تأیید می‌کند که گروه‌های کربوکسیلیک GO با کیتوسان، برای سنتز کامپوزیت CS/GO واکنش کرده‌اند. در صورتی که شدت نوار جذبی در  $2700$  و  $2800$   $\text{cm}^{-1}$  متعلق به کششی متقارن و نامتقارن C—H در  $\text{CH}_2$ ، افزایش قابل ملاحظه‌ای یافته است.

کیتوسان دارای گروه‌های عاملی  $\text{—NH}_2$  در زنجیر ماکرو مولکول خود است. این گروه‌ها می‌توانند با پیوندهای هیدروژنی و یا برهم‌کنش‌های الکتروستاتیکی با گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار GO تشکیل شوند. با بررسی طیف FTIR کامپوزیت CS/GO می‌توان نتیجه گرفت که گروه‌های کربوکسیل GO با گروه‌های  $\text{—NH}_2$  کیتوسان برهم‌کنش می‌کنند تا آمیدها (نوار واقع در  $1660$   $\text{cm}^{-1}$ ) و گروه‌های کربوکسیل نوار ( $\approx 1400$   $\text{cm}^{-1}$ ) را تشکیل دهند. حمله‌ی

ابتدا برای تهیه محلول ذخیره CS/GO، ۸ میلی گرم از این پودر برداشته و توسط سرم فیزیولوژی استریل حجم آن را به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد و برای یکنواخت شدن محلول کاملاً سونیکیت شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های ۴۰۰ تا  $3/12$   $\mu\text{g/ml}$  از CS/GO براساس روش سریال دایلوژن به یک ردیف از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ تایی افزوده شد. بقیه مراحل مانند روش ذکر شده در بالا انجام گرفت و MIC بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری تعیین گردید.

از رقت MIC و چند رقت بالاتر از آن (پس از شیک نمودن میکروپلیت)، به میزان ۲۰ میکرولیتر در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباتور گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی گردیده و اولین رقت که در آن رشدی روی محیط کشت دیده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری‌ها گزارش گردید. این مرحله نیز برای هر باکتری سه بار تکرار شد.

## نتایج

### نتایج سنتز گرافن اکسید و گرافن اکسید اصلاح

#### شده با کیتوسان

#### نتایج طیف بینی FTIR

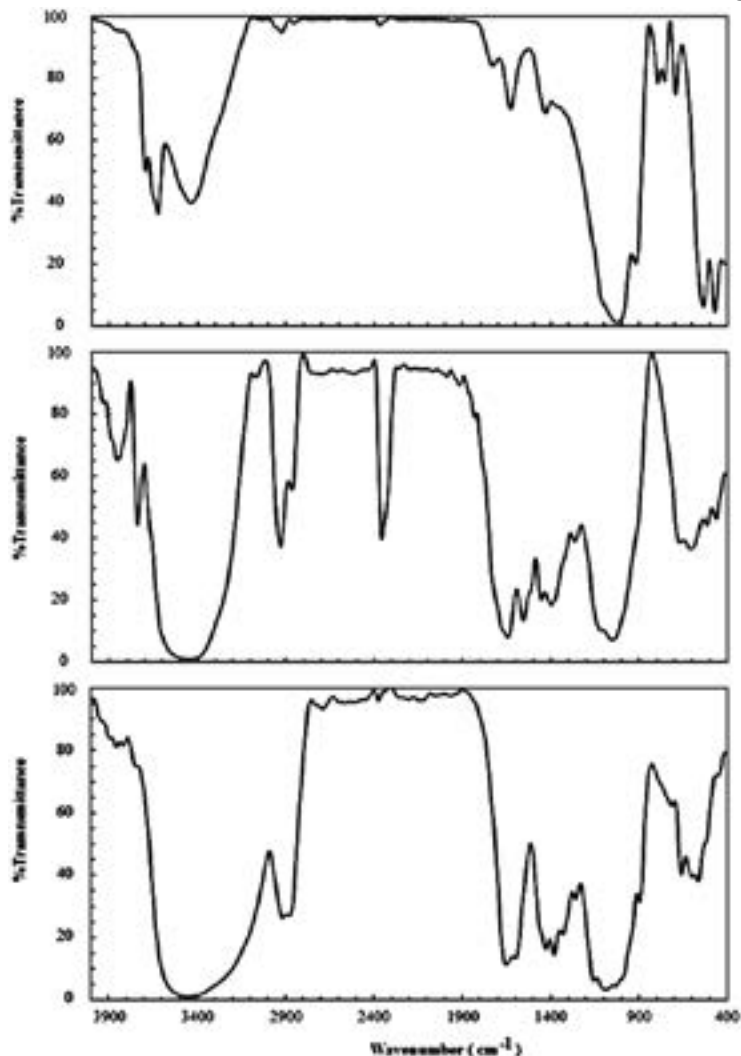
ساختار شیمیایی جاذب و نوع گروه‌های عاملی آن با استفاده از طیف تبدیل فوریه‌ی زیر قرمز (FTIR) شناسایی شد. شکل ۱ (a)، (b)، (c)، به ترتیب، طیف های IR، GO، CS/GO، کیتوسان، را در ناحیه‌ی  $400 - 4000$   $\text{cm}^{-1}$  نشان می‌دهد. در طیف GO (شکل ۴-۱ (a)) نوارهای جذبی مشاهده شده در  $3400 - 3600$   $\text{cm}^{-1}$  متعلق به ارتعاشات کششی گروه هیدروکسیل O—H است که به مولکول‌های آب جذب شده توسط GO و یا مولکول‌های آب محبوس شده میان لایه‌های درونی آن نسبت داده می‌شوند. پیک جذبی بسیار قوی در  $1018$   $\text{cm}^{-1}$  و به ارتعاشات کششی C—O اپوکسی مربوط است. نوارهای موجود در  $1743$  و  $1430$   $\text{cm}^{-1}$  به ترتیب، نشان دهنده‌ی ارتعاشات کششی

<sup>2</sup> deformation mode

<sup>1</sup> extension vibration

۱۶۰۸ در طیف CS/GO مؤید این امر است.

هسته دوستی آمین به گروه‌های اپوکسی GO نیز موجب تشکیل آمین می‌شود. افزایش شدت نوار در  $\text{cm}^{-1}$

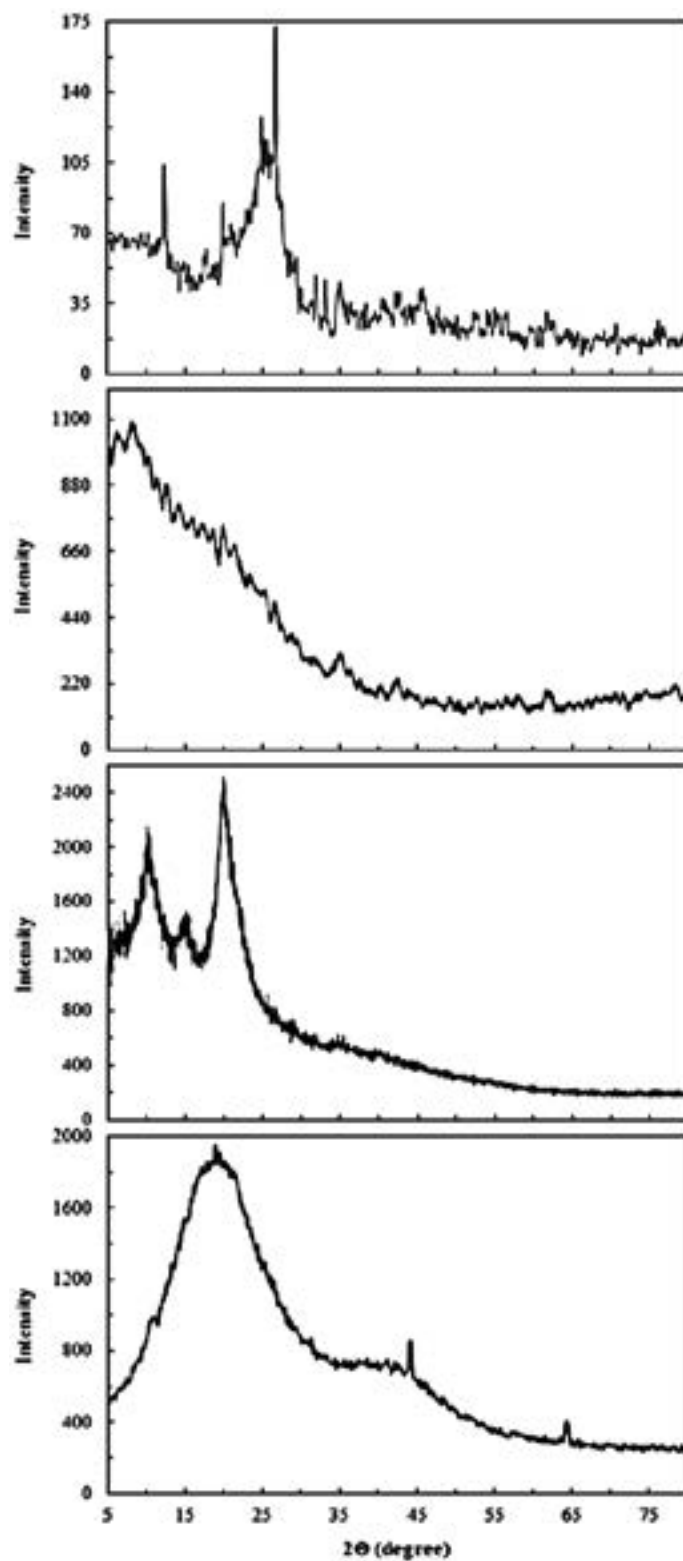


شکل ۱ - طیف IR (a) GO, (b) CS/GO, (c) کیتوسان.

می‌شود. پیک ضعیف و پهن واقع در  $2\theta = 25^\circ$  (شکل ۴-۲) (b) نمایانگر وجود مقداری گرافیت اکسید نشده در GO است. الگوهای XRD کیتوسان، CS/GO در شکل‌های ۴-۲ (c) و (d)، هر دو، دارای یک پیک قوی در  $2\theta = 19/91^\circ$  هستند که به حالت آمورف کیتوسان نسبت داده می‌شود. این امر بیانگر آن است که ساختار آمورف مانند کیتوسان در نانوکامپوزیت CS/GO همچنان محفوظ باقی می‌ماند.

### نتایج آنالیز XRD

ساختار بلوری جاذب با تکنیک پراش اشعه‌ی ایکس (XRD) مورد ارزیابی قرار گرفت، الگوهای XRD گرافیت، GO، CS/GO، کیتوسان، به ترتیب در شکل‌های ۲ (a)، (b)، (c)، (d) مشاهده می‌شوند. همان‌گونه که از شکل‌های ۴-۲ (a) و (b) پیداست، گرافیت یک پیک قوی (۰۰۲) در زاویه‌ی پراش  $26/66^\circ$  را نشان می‌دهد، در صورتی‌که پیک مشخصه‌ی GO در  $2\theta = 8/18^\circ$  ظاهر

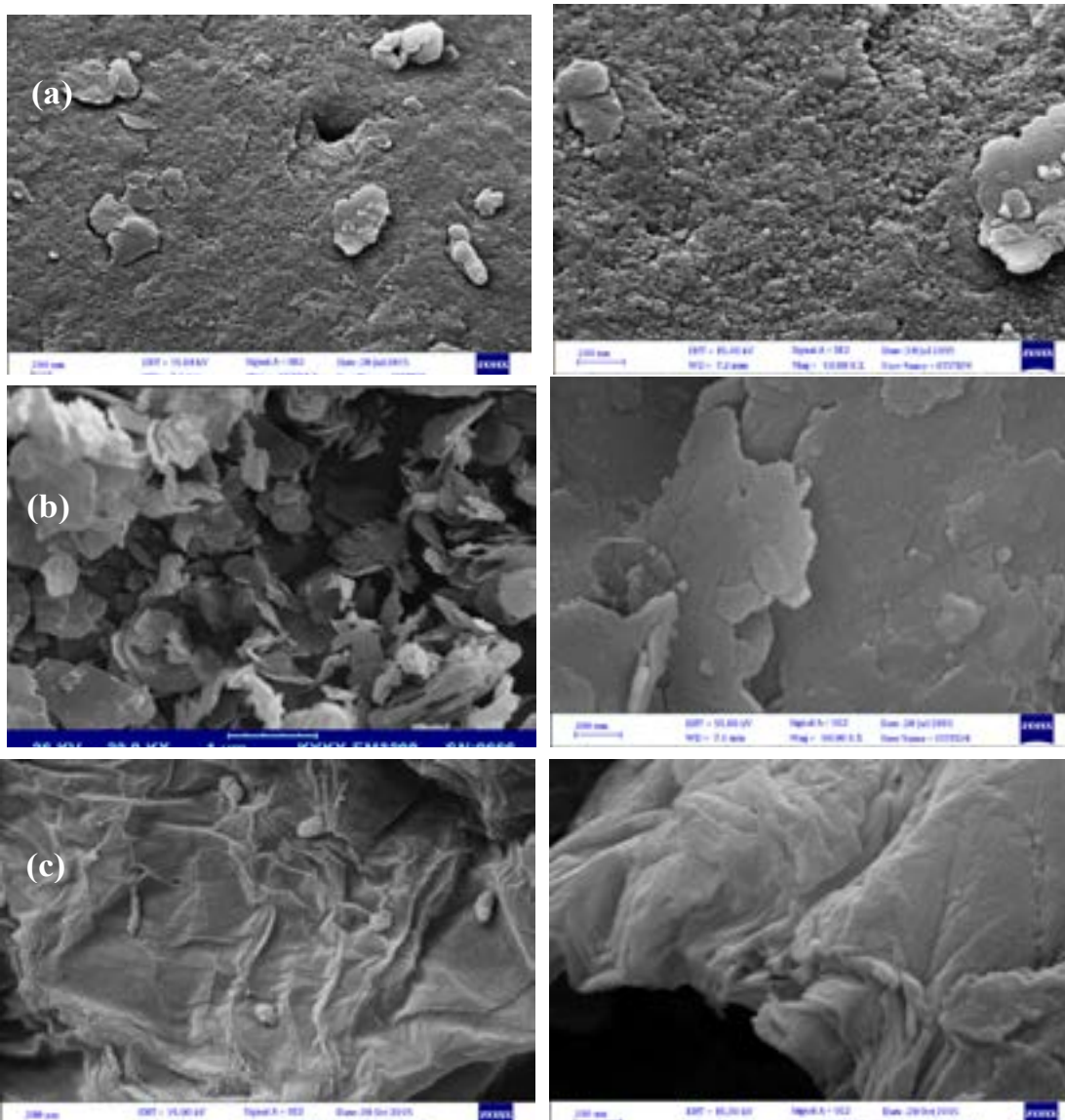


شکل ۲ - الگوی پراش اشعه‌ی ایکس (XRD) گرافیت (a)، GO (b)، CS/GO (c)، کیتوسان (d).

### نتایج آنالیز FESEM

برای مطالعه‌ی ویژگی‌های سطح نانو جاذب سنتزی از میکروسکوپ الکترونی روبشی با آشکارساز FE (FESEM) استفاده شد. شکل‌های ۳ (a)، (b)، (c)، به ترتیب تصاویر FESEM گرافیت، GO و CS/GO را در میدان مغناطیسی ۱۵ KeV نشان می‌دهد. بزرگ‌نمایی

تصاویر سمت چپ ۲۰۰۰۰ و تصاویر سمت راست ۵۰۰۰۰ برابر است. در شکل ۳-۴ (b) ساختار لایه‌ای GO با سطح یکنواخت و لبه‌های نسبتاً تیز و بسیار چین‌خورده به خوبی مشاهده می‌شود. سطح CS/GO (شکل ۳-۴ (c)) ناهموارتر می‌شود. این امر، قرارگیری مقادیر بالای کیتوسان روی لایه‌های GO را تأیید می‌کند.



شکل ۳ - تصاویر FESEM گرافیت، (a) گرافیت، (b) GO، (c) CS/GO. بزرگ‌نمایی تصاویر سمت چپ بیست هزار برابر و تصاویر سمت راست پنجاه هزار برابر است.

استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۴ تصویر میکروپلیت های ۹۶ خانه ای مورد استفاده برای این آزمایش را نشان می دهد.



شکل ۴ - تصویر یکی از میکروپلیت های ۹۶ خانه ای: بررسی اثر ضد میکروبی CS/GO در باکتری اشرشیاکلی. MIC گرافن اکسید برای باکتری اشرشیاکلی ۲۰۰  $\mu\text{g/ml}$  و برای استافیلوکوکوس اورئوس ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  مشاهده شد. MIC گرافن اکسید اصلاح شده با کیتوسان برای دو باکتری ۲۵  $\mu\text{g/ml}$  گزارش شد. نتایج MIC و MBC در جدول ۱ به تفکیک نشان داده شده است.

جدول ۱ - نتایج MIC و MBC گرافن اکسید (GO) و کامپوزیت گرافن اکسید-کیتوسان (CS/GO) بر علیه باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس.

	GO		CS/GO	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	200 $\mu\text{g/ml}$	400 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6536)	100 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$

فناوری نانو در زمینه بالینی مورد استفاده قرار گرفته است. گرافن و مشتقات حاصل از آن در چند سال اخیر به عنوان ترکیبات ضد میکروبی مورد توجه قرار گرفته است. همچنین گرافن اکسید به دلیل انحلال پذیری و قابلیت پراکندگی، از سمیت و خطر کمتر و در نتیجه از سازگاری زیستی بیشتری برخوردار است و از طرفی، سلول های زیستی می-توانند روی بسترهای گرافنی به خوبی رشد کنند (۱۰،۱۱). از سوی دیگر، کیتوزان (CS) به علت بالا بودن قابلیت تجزیه زیستی، ویژگی های غیر سمی و خواص ضد میکروبی، پلیمری است که به طور گسترده ای به عنوان عامل ضد میکروبی به تنهایی یا با پلیمرهای طبیعی دیگر ترکیب شده است (۱۲،۱۳). هم کیتوزان و هم گرافن

### بحث و نتیجه گیری

با وجود پیشرفت های گسترده در زمینه توسعه داروهای ضد میکروبی و اثربخشی مسلم این داروها، درمان اکثر بیماری های عفونی با مشکل روبه رو است و نیاز به سنتز داروهای جدید از سایر منابع، به منظور دستیابی به اثرات درمانی بیشینه و مؤثر، ضروری به نظر می رسد. از جمله مشکلات استعمال داروهای آنتی میکروبیال به روش سنتی میتوان به مصرف مقادیر فراوانی از دارو، برهمکنش های نامناسب این عوامل در طول انتقال، انتقال بسیار پایین عوامل ضد میکروبی از غشا سلولی و ظهور مقاومت در مقابل این داروها اشاره کرد (۹). در طول چند دهه گذشته، کاربرد



آمد. در رابطه سنتز و بررسی اثر ضد میکروبی CS/GO نیز مطالعاتی انجام شده است که از جدیدترین آنها می توان به مطالعه Jiang و همکارانش در سال ۲۰۱۶ اشاره نمود که کاربرد های ضد میکروبی کامپوزیت کیتوزان-گرافن اکسید مغناطیسی بر علیه باکتری اشرشیاکلی بررسی و تأیید نمودند (۱۶). Chowdhur و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در بخشی از این تحقیق خود، پس از سنتز CS/GO، ساختارهای بلوری، گروه های عاملی سطح و مورفولوژی آن با استفاده از الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. سپس حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، CS/GO بر علیه دو باکتری گرم منفی *E. coli* و باکتری های گرم مثبت *S. aureus* بررسی نمودند. نتایج نشان داد که MIC برای هر دو باکتری مورد مطالعه ۲۵ µg/ml است که نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر مطابقت می نماید (۱۷). همچنین Sundar و همکارانش در سال ۲۰۱۴ نانوکامپوزیت های کیتوزان گرافنی (CS-GO) را سنتز نمودند و فعالیت ضد باکتری آن را بر روی *Escherichia coli*، یک باکتری گرم منفی و *Bacillus subtilis* یک باکتری گرم مثبت مورد آزمایش قرار دادند و نشان دادند که نانوکامپوزیت CS-GO دارای فعالیت ضد باکتری بالاتری در مقایسه با فعالیت CS و GO به صورت جداگانه بود (۱۸). این مطالعات نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر را تأیید می نماید.

در تحقیق حاضر اثر ضد میکروبی گرافن اکسید روی هر دو باکتری مورد مطالعه اثر ضد میکروبی است اما این تاثیر بر علیه باکتری گرم منفی اشرشیاکلی در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک باکتری گرم مثبت، بیشتر است. در رابطه با مکانیسم اثر گرافن اکسید روی باکتری ها مطالعات زیادی انجام شده است که نشان می دهد آسیب غشای سلولی باکتری ناشی از تماس مستقیم باکتری با لبه بسیار تیز نانو دیواره گرافنی و به دنبال آن انتشار آدنین و پروتئین از باکتری که مکانیسم موثر در غیرفعال سازی باکتری می باشد (۱۹). همچنین به نظر می رسد که آنیون سوپر اکسید تولید شده توسط GO می تواند غشای باکتری ها را مختل کند (۲۰). همچنین مشخص شده که باکتری های گرم منفی مانند اشرشیاکلی که دارای

اکسید دارای فعالیت ضد باکتریایی هستند، اما به صورت جداگانه نمی توانند به عنوان عوامل ضد باکتری قوی عمل کنند. از این رو به منظور گسترش کاربرد این دو ماده و سنتز نانوکامپوزیت های گرافن/کیتوزانی (CS-GO) می تواند اثرات آنها را افزایش دهد.

در این تحقیق ابتدا گرافن اکسید سنتز شد و سپس ساختار سطحی آن توسط کیتوسان اصلاح شد. طیف سنجی تبدیل فوریه ی زیر قرمز (FTIR)، الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) و تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری-نشر میدان (FE-SEM) برای تعیین ویژگی های CS/GO سنتزی به کار برده شد. تمام آنالیزها نشان دادند گرافن اکسید به خوبی توسط کیتوسان اصلاح شده است. سپس اثر ضد میکروبی گرافن اکسید بررسی شد. MIC گرافن اکسید در سویه استاندارد باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۲۰۰ µg/ml و ۲۰۰ µg/ml به دست آمد. از جمله مطالعاتی که در این زمینه انجام گرفته است می توان به مطالعه به پژوهشی که توسط Badieia و همکارانش در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت اشاره کرد که فعالیت ضد میکروبی اکسیدگرافن در مقابل باکتری اشرشیاکلی با استفاده از روش واحد کلونی ساز (CFU) تخمین زده شد. نتایج نشان داد که ماده خاصیت ضد میکروبی بالایی در مقابل باکتری مورد مطالعه دارد (۱۴). همچنین Hu و همکاران (۲۰۱۰) موفق شدند که از گرافن اکسید برای ساخت ورقه ضد باکتری استفاده کنند. صفحات دو بعدی این ماده به طور موثری جلوی رشد باکتری های اشرشیاکلی را می گیرد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان دادند که غشاهای سلولی باکتری های *E. coli* قرار داده شده روی صفحات گرافنی به شدت تخریب شدند. این تخریب بدین دلیل رخ می دهد که گرافن وارد اندوزوم سیتوپلاسم این سلول ها می شود و آن را به بیرون سلول انتقال می دهد. تقریباً ۹۹٪ این سلول ها تنها پس از دو ساعت تماس با یک محلول  $85 \text{ g mL}^{-1}$  از گرافن اکسید در دمای  $37^\circ \text{C}$  تخریب شدند (۱۵). در ادامه تحقیق، اثر ضد میکروبی گرافن اکسید اصلاح شده توسط کیتوزان نیز بررسی شد و MIC آن در هر دو سویه مورد مطالعه اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵ µg/ml به دست

اکسید اصلاح شده با کیتوزان، می‌تواند روش نوینی را برای مبارزه با باکتری‌ها ایجاد نموده و جایگزین مناسبی جهت جلوگیری از پیدایش مقاومت های آنتی‌بیوتیک‌ها پیشنهاد نماید.

### تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا می‌باشد.

یک غشای خارجی هستند، به آسیب غشای سلولی ناشی از نانو دیواره مقاوم تر هستند و در مقابل باکتری های گرم مثبتی مانند استافیلوکوکوس اورئوس که فاقد غشای خارجی است، آسیب پذیرتر می‌باشد (۲۱). با اصلاح ساختار سطحی گرافن اکسید توسط کیتوزان علاوه بر افزایش اثرات ضد میکروبی و کاهش دوز موثره آن نسبت گرافن اکسید، نانوکامپوزیت CS/GO روی هر دو باکتری گرم مثبت و منفی به میزان مشابهی تاثیر گذار بوده است و که این تاثیر می‌تواند به علت حضور کیتوزان باشد. این مطالعه به دلیل مشاهده تأثیرات مثبت استفاده گرافن

### منابع مورد استفاده

- Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W., Ruoff, R. S., 2010. The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews* 39(1): 228-240.
- Bao, H., Pan, Y., Ping, Y., Sahoo, N. G., Wu, T., Li, L., Li, J., Gan, L. H., 2011. Chitosan-functionalized graphene oxide as a nanocarrier for drug and gene delivery. *Small* 7(11): 1569-1578.
- Liu, L., Gao, Y., Liu, Q., Kuang, J., Zhou, D., Ju, S., Han, B., Zhang, Z., 2013. High mechanical performance of layered graphene oxide/poly (vinyl alcohol) nanocomposite films. *Small* 9(14): 2466-2472.
- Leid, J. G., Ditto, A. J., Knapp, A., Shah, P. N., Wright, B. D., Blust, R., Christensen, L., Clemons, C. B., Wilber, J. P., Young, G. W., Kang, A. G., 2011. In vitro antimicrobial studies of silver carbene complexes: activity of free and nanoparticle carbene formulations against clinical isolates of pathogenic bacteria. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 67(1):138-148.
- Samar, M. M., El-Kalyoubi, M. H., Khalaf, M. M., El-Razik, M. A., 2013. Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. *Annals of Agricultural Sciences* 58(1): 33-41.
- Goy, R. C., Britto, D. D., Assis, O. B., 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* 19(3): 241-247.
- Zhang, L., Lu, Z., Zhao, Q., Huang, J., Shen, H., Zhang, Z., 2011. Enhanced chemotherapy efficacy by sequential delivery of siRNA and anticancer drugs using PEI-grafted graphene oxide. *Small* 7(4): 460-464.
- Humers, W. S., Offeman, R. E., 1958. Preparation of graphitic oxide [J]. *J Am Chem Soc* 80(6): 1339.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18(3): 268-281.
- Geim, A. K., 2009. Graphene: status and prospects. *Science* 324(5934): 1530-1534.
- Yang, X., Zhang, X., Liu, Z., Ma, Y., Huang, Y., Chen, Y., 2008. High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide. *The Journal of Physical Chemistry C* 112(45): 17554-17558.
- De Paz, L. E. C., Resin, A., Howard, K. A., Sutherland, D. S., Wejse, P. L., 2011. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus* mutant biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 77(11): 3892-3895.
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., Zou, X., 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research* 339(16): 2693-2700.
- Badie, E., Sangpour, P., Bagheri, M., Pazouki, M., 2014. Graphene oxide antibacterial sheets: Synthesis and characterization (research note). *International Journal of Engineering-Transactions C: Aspects* 27(12): 1803.
- Hu, W., Peng, C., Luo, W., Lv, M., Li, X., Li, D., Huang, Q., Fan, C., 2010. Graphene-based antibacterial paper. *ACS nano* 4(7): 4317-4323.
- Jiang, Y., Gong, J. L., Zeng, G. M., Ou, X. M., Chang, Y. N., Deng, C. H., Zhang, J., Liu, H.

- graphene oxide composite for anti-microbial and dye removal applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 82: 702-710.
17. Chowdhuri, A. R., Tripathy, S., Chandra, S., Roy, S., Sahu, S. K., 2015. A ZnO decorated chitosan-graphene oxide nanocomposite shows significantly enhanced antimicrobial activity with ROS generation. *RSC Advances* 5(61): 49420-49428.
  18. Sundar, K., Harikarthick, V., Karthika, V. S., Ravindran, A., 2014. Preparation of chitosan-graphene oxide nanocomposite and evaluation *Bionanoscience* 8(3): 207-212.
  19. Nanda, S. S., Yi, D. K., Kim, K., 2016. Study of antibacterial mechanism of graphene oxide using Raman spectroscopy. *Scientific Reports* 6: 28443.
  20. Kotchey, G. P., Allen, B. L., Vedala, H., Yanamala, N., Kapralov, A. A., Tyurina, Y. Y., Klein-Seetharaman, J., Kagan, V. E., Star, A., 2011. The enzymatic oxidation of graphene oxide. *ACS nano* 5(3): 2098-2108.
  21. Akhavan, O., Ghaderi, E., 2010. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS nano* 4(10): 5731-5736.