

تولید زیستی نانو ذرات اکساید جست با استفاده از باکتری ساکروتروف *Microbacterium sp.* و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن

بشیر احمد عاصم^{۱*}، محمد عارف احساس^۲

۱- پوهنمل، بیولوژی، تعلیم و تربیه، مؤسسه تحصیلات عالی غور، فیروزکوه، افغانستان (نویسنده مسئول)
bashirahmadaseem@ghru.edu.af

۲- پوهنیار، بیولوژی، تعلیم و تربیه، مؤسسه تحصیلات عالی غور، فیروزکوه، افغانستان
Arif_ahsas@ghr.edu.af

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۱۰ - تاریخ نشر: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰

چکیده

در سال‌های اخیر فناوری نانو به دلیل تأثیر گسترده روی تمامی عرصه‌های علم و زندگی از جمله بیولوژی و علوم طبی، به کانون توجه بسیاری از پژوهشگران تبدیل شده است. خواص منحصر به فرد فیزیکی، کیمیاوی، نوری، الکترونیکی و مقناطیسی ذرات در ابعاد نانو منجر به تلاش‌های بسیاری پیرامون چگونگی استحصال آن‌ها شده است. نانو ذرات اغلب به روش‌های مختلف فیزیکی و کیمیاوی تولید می‌شوند، باین حال بیشتر این روش‌ها نیازمند صرف انرژی زیاد و همراه با تولید محصولات جانبی زهری و خاصیت آلوده‌کننده هستند. از این رو کشف و توسعه روش‌های سازگار با محیط زیست مانند سنتز بیولوژیکی نانو ذرات توسط باکتری‌ها مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه استحصال نانو ذرات اکساید جست به وسیله استفاده از سوپرناتانت کشت میکروبی سویه مقاوم به سرمای *Microbacterium sp.* OSNP13 انجام شد. نانو ذرات تولید شده با استفاده از تجزیه‌های ساختاری UV-Vis، DLS و XRD مشخصه یابی شدند. نتایج نشان داد که اوسط اندازه نانو ذرات اکساید جست تولید شده ۵۹/۱۶ نانومتر است. در ادامه فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات تولید شده مورد ارزیابی قرار داده شد. مقادیر MIC نانو ذرات اکساید جست برای دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* برابر با ۵۰۰ میکرو گرام / میلی لیتر محاسبه شد. نانو ذرات اکساید جست تولید شده در این تحقیق خواص ضد میکروبی مناسبی از خود نشان داده‌اند و می‌توانند کاندید مناسبی برای استفاده به عنوان عوامل ضد میکروبی باشند.

کلیدواژه‌ها: *Microbacterium sp.* ساکروتروف، نانوذره اکساید جست، فعالیت انتی باکتریال حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی

استناد: عاصم، بشیر احمد و احساس، محمد عارف (۱۴۰۳). تولید زیستی نانو ذرات اکساید جست با استفاده از باکتری ساکروتروف *Microbacterium sp.* و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن. *مجله علمی- تحقیقی مؤسسه تحصیلات عالی غور*، سال اول، شماره ۱، صفحه ۲۲۹-۲۴۴.

Biosynthesis of ZnO Nanoparticles by Psychrotrophic *Microbacterium* sp. and Evaluation of its Antibacterial Activities

Bashir Ahmad Aseem^{1*}, Mohammad Arif Ahsas²

1* - Teaching Assistant, Biology, Education, Ghor Institute of Higher Education, Firozkoh, Afghanistan, (Corresponding Author), bashirahmadaseem@ghru.edu.af

2 - Teaching Assistant, Biology, Education, Ghor Institute of Higher Education, Firozkoh, Afghanistan, (Corresponding Author), Arif_ahsas@ghr.edu.af

Received: 30/05.2024 | Accepted: 31/08/2024 | Published: 28/6/2025

Abstract

In recent years, nanotechnology has gained considerable attention from researchers due to its extensive impact on various fields of science and life, including biology and biomedicine. The unique physical, chemical, optical, electronic, and magnetic properties of nanoparticles at the nanoscale have led to considerable efforts regarding their synthesis. They are often synthesized through various physical and chemical methods; however, many of these methods are energy-intensive and result in the production of toxic by-products with polluting properties. Therefore, the discovery and development of environmentally friendly methods, such as the biological synthesis of nanoparticles by bacteria, have gained attention. In this study, zinc oxide nanoparticles were synthesized using the supernatant of a microbial culture from a cold-tolerant strain of *Microbacterium* sp. OSNP13. The synthesized nanoparticles were characterized through structural analyses including UV-Vis, DLS, and XRD. The results indicated that the average size of the produced zinc oxide nanoparticles was 59.16 nm. Furthermore, the antibacterial activity of the synthesized nanoparticles was evaluated. The MIC of zinc oxide nanoparticles for *E. coli* and *S. aureus* was calculated to be 500 µg/ml. The copper oxide nanoparticles produced in this study exhibited significant antimicrobial properties and could be regarded as suitable candidates for use as antimicrobial agents.

Keywords: Psychrotrophic *Microbacterium* sp, ZnONPs, Antibacterial activity, MIC, MBC

Cite this article: Aseem, B. A & Ahsas, M. A. (2025). Biosynthesis of ZnO nanoparticles by psychrotrophic *microbacterium* sp. and evaluation of its antibacterial Activities. *Scientific-Research Journal of Ghor Institute of Higher Education*, 1 (1), 209-244.

مقدمه

نانوتکنولوژی محدوده‌ای از تکنالوژی است که در این محدوده انسان می‌تواند انواع ترکیبات، آلیاژها، وسایل و ابزارها و به‌طور کلی، سیستم‌ها و سازه‌های گوناگون را در مقیاس اتمی و مالیکولی و ابعاد نانومتری طراحی کرده و به مرحله ساخت برساند. آنتی‌بیوتیک‌ها در مراقبت‌های بهداشتی به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند که به‌موجب آن پاتوژن‌ها در حال تبدیل به میکروب‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بوده و تبدیل به یک بیماری جدی برای سلامتی انسان می‌شوند. در دهه‌های گذشته دانشمندان در سراسر جهان به دنبال عوامل ضد میکروبی جدید باقابلیت افزایش‌یافته بوده‌اند (Hu و همکاران، ۲۰۱۰؛ Li و همکاران، ۲۰۱۵). برای پاسخگویی به تقاضای روزافزون برای تهیه عوامل ضد باکتریای کارا تر، چندین نانو مواد تولید شده است. باین‌حال، بسیاری از نانو مواد ضد میکروبی که تاکنون گزارش شده‌اند با نگرانی در مورد مسمومیت، آلودگی محیط‌زیست، ناسازگاری بیولوژیکی و روش سنتز پیچیده همراه هستند (Musee و همکاران، ۲۰۱۱). در نتیجه همچنان یک چالش برای تولید نانو مواد ضد باکتری کارآمد، جدید و دوستدار محیط‌زیست وجود دارد. اکساید جست یک اکساید نیمه‌هادی بلوری با شکاف انرژی مستقیم برابر $3/37\text{eV}$ است. ساختار بلوری مهم اکساید جست نوع ورتزیت آن است ولی به شکل ساختاری بلاند روی هم وجود دارد. اکساید جست به دلیل خواص ویژه و دارا بودن شکاف انرژی بالا یکی از اصلی‌ترین نانوذره‌های فلزی است که کاربردهای متنوعی در صنعت و محیط‌زیست دارد. ایمنی اکساید جست و سازگاری آن با پوست انسان آن را به یک افزودنی مناسب برای منسوجات و سطوحی که در تماس با بدن انسان است تبدیل کرده است (Liu و همکاران، ۲۰۱۴). نانو ذرات اکساید جست اثرات ضد میکروبی روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین اسپورهایی که مقاوم به درجه حرارت بالا و پایین هستند از خود نشان می‌دهد (Azam و همکاران، ۲۰۱۲). فعالیت‌های ضد میکروبی نانو ذرات اکساید جست نسبت به میکرو ذرات به دلیل افزایش سطح نانو ذرات بهبود یافته است و هرچه اندازه ذرات کوچک‌تر باشد خاصیت ضد میکروبی افزایش می‌یابد (Padmavathy و Vijayarghavan، ۲۰۰۸). به‌طور کلی، اکساید جست توانایی باکتری را کاهش می‌دهد؛ باین‌حال تاکنون مکانیسم فعالیت ضد میکروبی آن به‌خوبی شناخته نشده است. پیشنهاد شده است که عامل اصلی فعالیت‌های ضد

میکروبی می‌تواند تولید پراکساید هایدروجن باشد. همچنین تجمع ذرات روی سطح باکتری به دلیل نیروی الکترواستاتیکی می‌تواند مکانیسم دیگر اثر ضد میکروبی نانوذره اکساید جست باشد (Zhang و همکاران، ۲۰۰۸). باین حال گونه‌های تعامل کننده‌ی آکسیجن تولیدشده روی سطح ذرات، انتشار آیون جست (Zn^{+})، اختلال در غشاء و پروسه‌های غشایی و همچنین نانو ذرات درونی می‌توانند از دلایل احتمالی آسیب سلولی باشد (Hajipour و همکاران، ۲۰۱۲). با توجه به مکانیسم‌های مقاومت فلزی کارآمد و پتانسیل بالای میکرو ارگانسیم‌های ساکروتروف در سنتز نانو ذرات و مطالعات بسیار اندکی که در خصوص سنتز نانو ذرات فلزی با این میکروارگانسیم‌ها انجام شده است، بنابراین در تحقیق حاضر توانایی سویه‌های جدیدی از باکتری‌های مقاوم به سرما جداسازی شده از ارتفاعات زاگرس واقع در استان لرستان و برخی سویه‌های *Streptomyces* جداسازی شده از دریای عمان جهت سنتز و تعیین ساختار نانو ذرات اکساید جست و بررسی خواص ذاتی آن به عنوان عوامل ضد باکتریایی موردتوجه قرار گرفته است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ سویه‌های موردبررسی

در این پژوهش در گام اول تعداد ۴۴ سویه مقاوم به سرما جداسازی شده از ارتفاعات زاگرس واقع در استان لرستان و برخی سویه‌های *Streptomyces* جداسازی شده از دریای عمان خالص سازی شدند. سپس توانایی آن‌ها در تولید نانو ذرات اکساید جست موردبررسی قرار گرفت.

۲-۲ تعیین حداکثر غلظت کشندگی^۷ (MTC)

ابتدا محیط کشت جامد (TSB) را به مقدار ۲۰۰ ml با غلظت‌های مختلف (۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار / لیتر) از نمک‌های $Zn(NO_3)_2 \cdot 5H_2O$ ، $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ در ارلن‌های جداگانه تهیه گردید. سپس محتویات هر کدام از ارلن‌ها درون پلیت‌های میکروبی استریل منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت $30^{\circ}C$ قرار داده شدند. در ادامه تمام پلیت‌ها به قسمت‌های مختلف تقسیم‌بندی گردید و پلیت‌های فاقد نمک (جست) به عنوان شاهد برای رشد باکتری‌ها در نظر گرفته شد، سپس $5 \mu L$ از سوسپانسیون سویه‌های موردبررسی (کشت 24

⁷ Maximum Tolerance Concentration

ساعته) با کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند روی هر کدام از تقسیمات پلیت‌ها تلقیح شد. تمامی پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در درجه حرارت 20°C و 30°C گرمخانه گذاری شدند. غلظت بالایی از فلز که باکتری نتواند در آن رشد کند به‌عنوان MTC معرفی گردید و بدین ترتیب سویه‌های مقاوم و کارآمد در احیاء کاتیون‌های جست (Zn^{+}) شناسایی شدند (Shakya و همکاران، ۲۰۱۲).

۲-۳ استحصال، مشخصه یابی نانو ذرات اکساید جست و شناسایی مالیکولی سویه تولیدکننده

هر یک از سویه‌های منتخب در ۴۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع TSB تلقیح و به مدت 48 ساعت در شیکر انکوباتور 20°C با دور ۱۵۰ rpm گرمخانه گذاری شدند. بعد از رشد و تکثیر سلول‌ها، روشناور حاصل^۸ به‌وسیله سنتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد. روشناور حاصل بانمک‌های نایترا و سولفات جست با غلظت ۰/۰۱ مولر به نسبت 1:1 اضافه شد. تمامی نمونه‌ها در اتوکلاو با حرارت 121°C به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در درجه حرارت اتاق، نانو ذرات تولیدشده با سنتریفیوژ جدا گردید و پس از سه بار شست‌وشو با آب دیونیزه و اتانول در درجه حرارت 80°C خشک گردید. به‌منظور حذف عوامل زیستی موجود بر روی سطح نانو ذرات، نانو ذرات تولیدشده به مدت 4 ساعت در کوره 470°C قرار داده شد (Ghanbari و همکاران، ۲۰۱۸). سپس سویه‌ای با بیشترین میزان تشکیل رسوب و تغییر رنگ سوپرناتانت، جهت خالص‌سازی و مشخصه یابی نانو ذرات اکساید جست سنتز شده انتخاب گردید. نانو ذرات خالص‌شده جهت اندازه‌گیری جذب نوری توسط اسپکتروفوتومتری UV-vis در دامنه ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مقداری از رسوب به‌دست‌آمده جهت آنالیز انکسار اشعه‌های ایکس^۹ (XRD) و پراکندگی نور دینامیکی^{۱۰} (DLS) استفاده شد. شناسایی مالیکولی سویه منتخب با تکثیر و توالی یابی ژن 16srRNA انجام شد.

^۸Supernatant

^۹ X-Ray Diffraction(XRD)

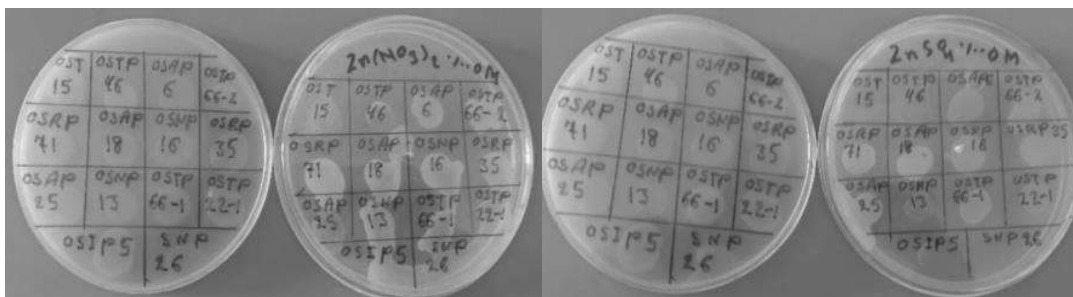
^{۱۰} Dynamic Light Scattering

۲-۴ سنجش فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات

برای مطالعه ضد باکتریایی نانو ذرات اکساید جست، استوک 2000 میکروگرم / میلی لیتر از نانو ذرات در سیترات آمونیوم به نسبت ۲ به ۱ و گلیسرول ۴۰٪ پراکنده شد. باکتری-های *E. coli* و *S. aureus* در محیط استریل MHB تلقیح و در درجه حرارت °C ۳۷ به مدت 18 ساعت گرمخانه گذاری گردید. درنهایت با استفاده از سرم فیزیولوژی (۰٫۹٪ سودیم کلراید) کدورت باکتری ها در نیم مک فارلند (جذب ۰٫۰۸-۰٫۱۳ در طول موج ۶۳۰ نانومتر) تنظیم شد که در این حالت تعداد باکتری ها برابر با $10^8 \times 1/5$ CFU/ml است. فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات در غلظت های مختلف (۴۰۰۰ تا ۱۲۵ میکروگرم/ میلی لیتر) با استفاده از روش میکرودایلوشن^{۱۱} مورد استفاده قرار گرفت (Andrews و همکاران، ۲۰۰۱).

۳-نتایج و بحث

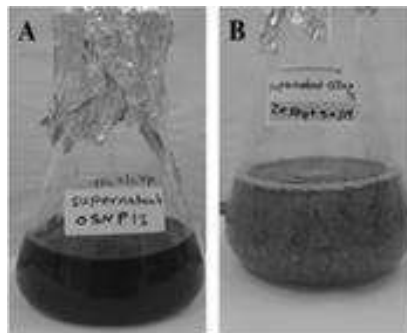
میزان مقاومت ۴۴ سویه مقاوم به سرما و *Streptomyces* به دو نمک سولفات جست و نیترات جست در غلظت های (۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی مولر) مورد ارزیابی قرار داده شد. نتایج نشان داد تمام سویه ها توانایی مقاومت در غلظت های بالاتر از ۵ میلی مولر را دارند. با توجه به نتایج اولیه کشت، دوسویه مقاوم به سرما و دوسویه *Streptomyces* انتخاب گردید. همچنین با در نظر داشت نتایج تست MTC میزان مقاومت این سویه ها به نمک سولفات جست بیشتر از نیترات جست بود و لذا از غلظت های 10 میلی مولر در لیتر سولفات جست برای تولید نانو ذرات استفاده شد (شکل ۱).



شکل 1: میزان مقاومت برخی از سویه ها به غلظت ۵ میلی مولر نمک سولفات جست و نیترات جست.

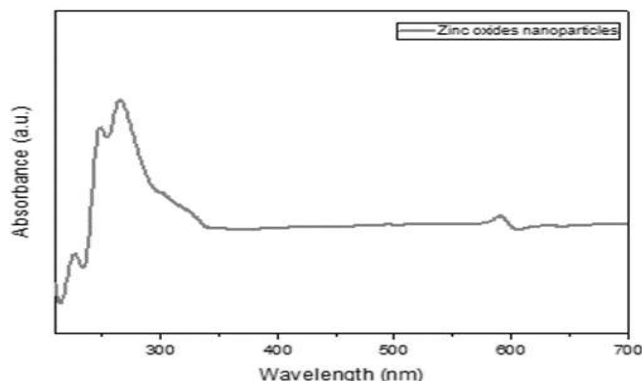
¹¹ Micro dilution

در ادامه سویه‌های *Streptomyces* به دلیل رشد کند از ادامه آنالیز حذف شدند. از این تعداد، سویه OSNP13 با بیشترین میزان تشکیل رسوب و تغییر رنگ سوپرناتانت به همراه حرارت دهی در اتوکلاو برای خالص‌سازی و تجزیه ذرات اکساید جست انتخاب شد (شکل ۲).



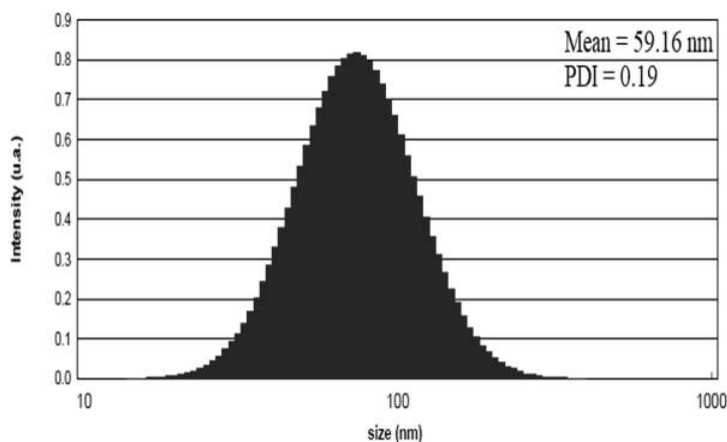
شکل ۲: تولید نانوذرات اکساید جست با روش سوپرناتانت (روشناور) کشت میکروبی به همراه حرارت اتوکلاو. A و B به ترتیب، سوپرناتانت سویه OSNP13، سوپرناتانت پس از افزودن نمک سولفات جست و قرار گیری در اتوکلاو.

در این روش تولید نانو ذرات به دلیل اینکه در شرایط اتوکلاو یا فشار و درجه حرارت بالا اعمال می‌گردد، یون‌های فلزی موجود در نمک‌های استفاده‌شده بیشتر در تماس گروه‌های عاملی و متابولیت‌های ثانویه موجود در سوپرناتانت کشت میکروبی قرار می‌گیرند و واکنش تولید نانو ذرات یا هسته‌زایی با سرعت بیشتری انجام می‌شود. در بسیاری از مطالعات نقش بااهمیت آنزیم‌های وابسته به NADH در این انتقالات الکترونی ضمن تولید زیستی نانو ذرات اشاره‌شده است؛ بنابراین گزارشی مبنی بر تولید نانو ذرات اکساید جست توسط سویه‌های مقاوم به سرما با این روش موجود نمی‌باشد. قنبری و همکاران (۲۰۱۷)، با استفاده از سوپرناتانت *Aspergillus fumigatus* در شرایط اتوکلاو موفق به تولید نانو ذرات نقره شدند. نتایج طیف‌سنجی UV-vis در شکل (3)، یک پیک مشخص بین 200 تا 400 نانومتر با حداکثر جذب در 269 نانومتر را نشان می‌دهد که بیانگر وجود نانو ذرات اکساید جست در محلول تعامل است و ناشی از ویژگی رزونانس پلاسمون سطحی این نانو ذرات می‌باشد.



شکل ۳: نمودار طیف سنجی UV-vis برای

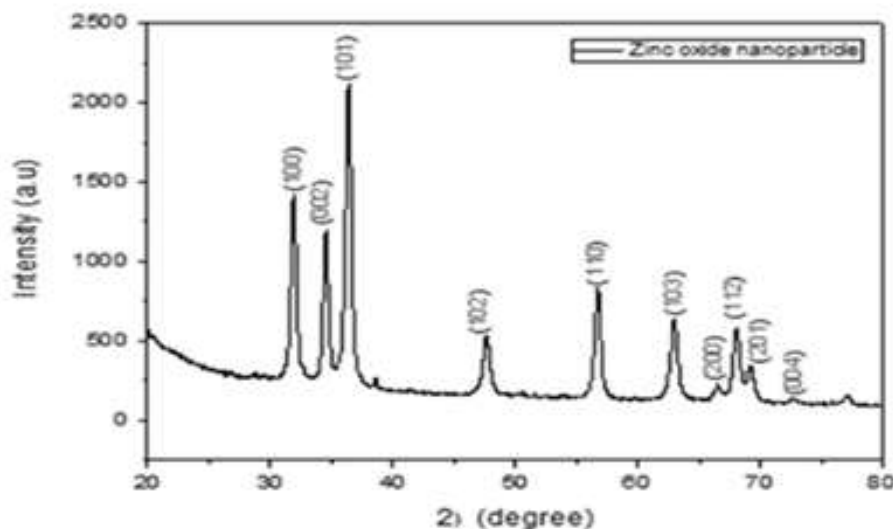
پیک مشاهده شده برای نانو ذرات اکساید جست با مطالعات Fooladsaz و همکاران در سال ۲۰۱۲ و Patil و همکاران در سال ۲۰۱۶ همخوانی دارد. نتایج حاصل از نمودار توزیع اندازه نانو ذرات نشان داد که نانو ذرات اکساید جست استحصال شده توسط *Microbacterium sp.* OSNP13 دارای اندازه متوسط ۵۹/۱۶ نانومتر می باشد. همان طور که در شکل (۴) مشخص است، منحنی توزیع اندازه نانو ذرات تقریباً زنگوله ای شکل است که نشان دهنده توزیع نسبت یکنواخت نانو ذرات اکساید جست استحصال شده است. شاخص پراکندگی نانو ذرات (PDI)، ۰/۱۹ ثبت گردید که بیانگر یکنواختی بالای محلول کلئیدی نانو ذرات استحصال شده در این مطالعه می باشد.



شکل ۴: الگوی توزیع اندازه نانوذرات اکساید جست

بر اساس منابع معتبر گزارش شده است که یک نمونه کلئید یکنواخت نانو ذرات که موندیسپرسیته ذرات در آن بالا می باشد، دارای PDI بین 0/01 تا 0/7 است. نمونه های غیریکنواخت و پلی دیسپرس PDI بالاتر از 0/7 تا 1 دارند که نمایانگر یک نمونه نامناسب است (Honary و همکاران، ۲۰۱۳). در مطالعه Ghorbani و همکاران در سال ۲۰۱۵، با توجه به نتایج حاصل از تکنیک DLS، متوسط اندازه ی نانو ذرات اکساید جست تولیدشده با روش هم رسوبی را ۳۰ نانومتر گزارش کردند. این تفاوت در اوسط اندازه نانو ذرات بامطالعه حاضر به دلیل روش تولید متفاوت نانو ذرات در این دو پژوهش می باشد.

به منظور تعیین نوع شبکه و اثبات ساختار بلوری نانو ذرات اکساید جست از آنالیز XRD در زاویه 2θ و محدوده اسکن ۲۰ تا ۸۰ درجه استفاده شد که دارای پیک های مشخصی در سطوح ۱۰۰، ۰۰۲، ۱۰۱، ۱۰۲، ۱۱۰، ۱۰۳، ۲۰۰، ۱۱۲، ۲۰۱، ۰۰۴ می باشد که نشان دهنده ساختار مونوکلینیکی نانو ذرات اکساید جست بوده و با الگوی استاندارد^{۱۲} 043-0002 کاملاً مطابقت دارد (شکل 5) (Shatnawi و همکاران، ۲۰۱۶).



شکل 5: آنالیز انکسار اشعه ایکس نانوذرات اکساید جست.

¹² JCPDS File

الگوی مشاهده شده برای نانو ذرات اکساید جست در مطالعات Raoufi و همکاران در سال ۲۰۱۳ و Anvekar و همکاران در سال ۲۰۱۷ با الگوی مشاهده شده در این مطالعه کاملاً تطابق دارد. طبق محاسبات انجام شده بر اساس معادله دبای- شرر، برای نانو ذرات اکساید جست در زاویه ۳۶/۲۱ با صفحه کریستالی ۱۰۱، اوسط اندازه نانو بلورکها ۱۹/۲۵ نانومتر محاسبه شد. نتایج این بخش با نتایج آنالیز DLS همخوانی دارد و نشان دهنده اندازه کوچک تر نانو ذرات اکساید جست تولید شده می باشد. طی مطالعات مختلف انجام شده، نانو ذرات اکساید فلزی از جمله اکساید جست فعالیت ضد میکروبی خوبی را از خود نشان می دهند که عمدتاً به اندازه کوچکی که این نانو ذرات دارند بستگی دارد. نانو ذرات اکساید فلزی به سطح باکتری یا ناحیه هسته ای باکتریایی متصل شده و اثرات ضد میکروبی خود را اعمال می کنند. نانو ذرات اکساید فلزی با عملکردهای مختلف مانند تولید گونه های فعال آکسیجن (ROS) به دیواره سلولی آسیب می رسانند. این نانو ذرات به دیواره سلولی نفوذ کرده و موجب آسیب ساختاری به دیواره سلولی و مرگ سلول می شوند. طی تخریب دیواره، محتوای سلولی به خارج ترشح می شود که باین بیان جن های استرس اکسیداتیو همراه بوده که در نتیجه سبب مهار رشد سلولی و مرگ سلولی می شوند (Sirelkhatim و همکاران، ۲۰۱۵).

در خصوص شناسایی مالیکولی سویه تولید کننده نانو ذرات اکساید جست نیز به دنبال تعیین توالی جن 16SrRNA و مطابقت نتایج حاصل با پایگاه های اطلاعاتی EZTaxon و NCBI، سویه *Microbacterium* sp. OSNP13 با ۱۰۰٪ شباهت متعلق به جنس *Microbacterium* می باشد. در ادامه فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات اکساید جست تولید شده توسط سویه *Microbacterium* sp. SNP13 بر روی باکتری گرم منفی *E. coli* و گرم مثبت *S. aureus* به ترتیب به عنوان شاخص پاتوجن های گرم منفی و مثبت در محدوده غلظت های ۱۲۵ تا ۴۰۰۰ میکروگرم / میلی لیتر با روش براث مایکرو دایلوشن مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر $MIC^{۱۳}$ و $MBC^{۱۴}$ نانو ذرات اکساید جست برای دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* به ترتیب ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم / میلی لیتر محاسبه شد (جدول ۱).

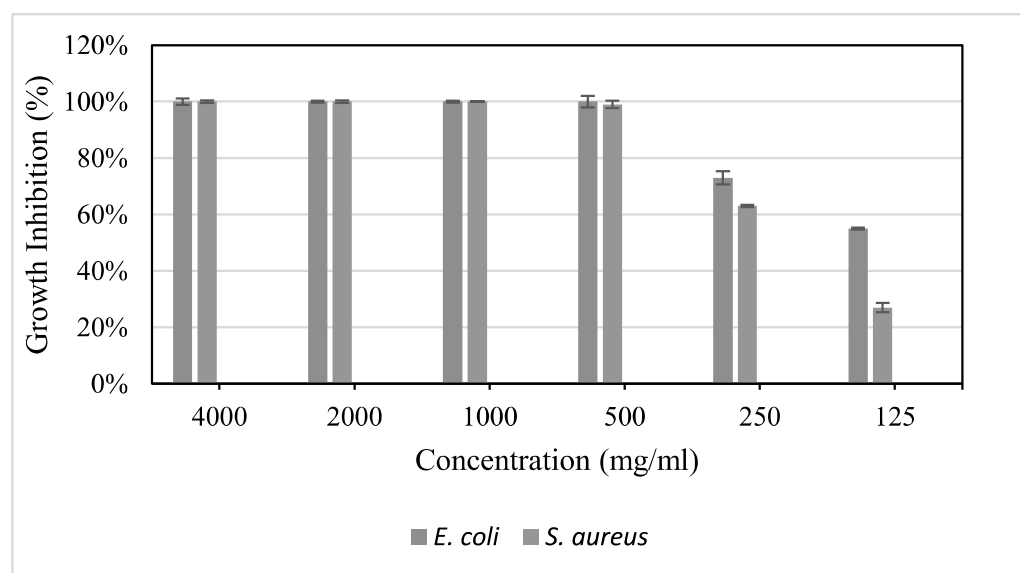
¹³ Minimum Inhibitory Concentration

¹⁴ Minimum Bactericidal Concentration

جدول ۱: مقادیر MIC و MBC نانوذرات اکساید جست

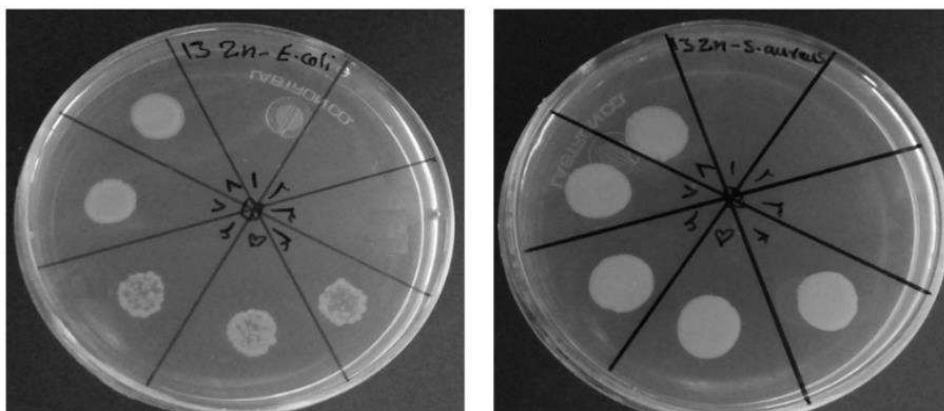
نانوذرات	باکتری	MIC($\mu\text{g/ml}$)	MBC($\mu\text{g/ml}$)
ZnO NPs	<i>E. coli</i>	500	1000
	<i>S. aureus</i>	۵۰۰	1000

شکل (۶) درصد مهار رشد باکتری‌های پاتوژن را توسط نانوذرات اکساید جست نشان می‌دهد. هرچند در غلظت‌های بالاتر اثر مهارکنندگی رشد اختلاف معنی‌داری را بین دوسویه پاتوژن نشان نداد، ولی در غلظت‌های ۱۲۵ اثر مهارکنندگی نانوذره اکساید جست روی باکتری *E. coli* به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود.



شکل ۶: درصد مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا در غلظت‌های مختلف نانوذرات اکساید جست

نتایج نشان داد که غلظت کشندگی نانوذرات بکار برده شده در این تحقیق اثرات یکسان را بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اعمال نموده است (شکل ۷).



شکل 7: نتایج آزمون MBC برای نانوذرات اکساید جست پس از ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری

با توجه به مقادیر MIC و MBC به‌دست‌آمده برای دو باکتری سویه پاتوژن، قدرت مهارکنندگی و کشندگی نانو ذرات اکساید جست بر روی دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* برابر محاسبه شد.

Şahin و همکاران در سال ۲۰۱۷، مقدار MIC نانو ذرات اکساید جست تولیدشده در مطالعات خود را بر روی باکتری *E. coli* ATCC 25922 برابر با ۵۱۲ میکروگرم/ میلی‌لیتر گزارش کردند که از مقادیر محاسبه‌شده برای نانو ذرات این تحقیق بیشتر بوده است. Siddique و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳، مقادیر MIC نانو ذرات اکساید جست را برای دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* به ترتیب ۲۱ و ۸ میلی‌مولر گزارش دادند (هر میلی‌مولر معادل ۷۲ میکروگرم/ میلی‌لیتر بوده است) که در مقایسه با نتایج حاصل از این تحقیق نانو ذرات تولیدشده خواص ضد میکروبی کمتری از خود نشان داده‌اند. البته در مقام مقایسه نانو ذرات مورد استفاده در این تحقیق اثر مهارکنندگی و کشندگی مناسب را نسبت مطالعات گذشته از خود نشان داده است.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق از توانایی باکتری‌های مقاوم به سرما در سنتز زیستی نانو ذرات اکساید جست استفاده گردید. تولید نانو ذرات اکساید جست توسط سویه منتخب *Microbacterium* sp.OSNP13 با استفاده از روش سوپرناتانت کشت میکروبی به همراه حرارت دهی در شرایط اتوکلاو مورد ارزیابی قرار داده شد. ساختار و مشخصات نانو ذرات تولیدشده با استفاده از آنالیزهای

Uv-Vis، XRD و DLS مشخصه یابی شدند. نتایج مشخصه یابی نشان دهنده صحت تولید این نانو ذرات بوده است. با توجه به آنالیز DLS، اوسط اندازه نانو ذرات اکساید جست تولیدشده ۵۹/۱۶ نانومتر می باشد. همچنین شاخص پراکندگی (PDI) برای نانو ذرات اکساید جست در pH فیزیولوژی ۰/۱۹ محاسبه گردید که نشان دهنده یکنواختی نسبتاً مناسب این نانو ذرات می باشد. اندازه نانو بلورک ها نیز با استفاده از معادله دبای- شرر محاسبه گردید و معادل ۱۹/۲۵ نانومتر به دست آمد. نتایج این بخش با نتایج آنالیز DLS همخوانی دارد و نشان دهنده اندازه کوچک تر نانو ذرات اکساید جست تولیدشده می باشد.

اثر ضد میکروبی نانو ذرات اکساید جست بر روی دو باکتری *S. aureus* و *E. coli* مورد بررسی قرار گرفت. MIC نانو ذرات اکساید جست برای دو باکتری *S. aureus* و *E. coli* برابر با ۵۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر محاسبه شد. همچنین مقدار MBC نانو ذرات اکساید جست برای دو باکتری *S. aureus* و *E. coli* ۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر محاسبه شد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، مشخص شد سویه *Microbacterium* sp.OSNP13 توانایی بالایی در تولید نانو ذرات اکساید جست داشته و می تواند به عنوان یک سامانه زیستی برای تولید نانو ذرات از آن بهره برد. نانو ذرات تولیدشده در این تحقیق می تواند به عنوان یک عاملی ضد میکروبی مناسب در بسیاری از حوزه های مختلف از جمله تجهیزات طبی، سطوح انتی باکتریال و غیره مورد استفاده قرار داده شوند.

منابع

- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 5-16.
- Anvekar, T. S., Chari, V. R., & Kadam, H. (2017). Green synthesis of ZnO nanoparticles, its characterization and application. *Material Science Research India*, 14(2), 153-7.
- Azam, A., Ahmed, A. S., Oves, M., Khan, M. S., Habib, S. S., & Memic, A. (2012). Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International journal of nanomedicine*, 6003-6009.
- Fooladsaz, K., Negahdary, M., Rahimi, G., Habibi-Tamijani, A., Parsania, S., Akbari-dastjerdi, H., ... & Asadi, A. (2012). Dopamine determination with a biosensor based on catalase and modified carbon paste electrode with zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(10), 9892-9908.
- Ghanbari, S., Vaghari, H., Sayyar, Z., Adibpour, M., & Jafarizadeh-Malmiri, H. (2018). Autoclave-assisted green synthesis of silver nanoparticles using *A. fumigatus* mycelia extract and the evaluation of their physico-chemical properties and antibacterial activity. *Green Processing and Synthesis*, 7(3), 217-224.
- Ghorbani, H. R., Mehr, F. P., Pazoki, H., & Rahmani, B. M. (2015). Synthesis of ZnO nanoparticles by precipitation method. *Orient. J. Chem*, 31(2), 1219-1221.
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., de Aberasturi, D. J., de Larramendi, I. R., Rojo, T., ... & Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 30(10), 499-511.

- Honary, S., Barabadi, H., Gharaei-Fathabad, E., & Naghibi, F. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles induced by the fungus *Penicillium citrinum*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(1), 7-11.
- Hu, W., Peng, C., Luo, W., Lv, M., Li, X., Li, D., ... & Fan, C. (2010). Graphene-based antibacterial paper. *ACS Nano* 4 (7): 4317–4323.
- Li, Z., Zhang, F., Meng, A., Xie, C., & Xing, J. (2015). ZnO/Ag micro/nanospheres with enhanced photocatalytic and antibacterial properties synthesized by a novel continuous synthesis method. *RSC Advances*, 5(1), 612-620.
- Liu, Q., Zhang, M., Fang, Z. X., & Rong, X. H. (2014). Effects of ZnO nanoparticles and microwave heating on the sterilization and product quality of vacuum-packaged Caixin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2547-2554.
- Musee, N., Thwala, M., & Nota, N. (2011). The antibacterial effects of engineered nanomaterials: implications for wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(5), 1164-1183.
- Padmavathy, N., & Vijayaraghavan, R. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Science and technology of advanced materials*.
- Patil, B. N., & Taranath, T. C. (2016). Limonia acidissima L. leaf mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles: A potent tool against: *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Mycobacteriology*, 5(2), 197-204.
- Raoufi, D. (2013). Synthesis and microstructural properties of ZnO nanoparticles prepared by precipitation method. *Renewable Energy*, 50, 932-937.

- Şahin, E., Musevi, S. J., & Aslani, A. (2017). Antibacterial activity against *Escherichia coli* and characterization of ZnO and ZnO–Al₂O₃ mixed oxide nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S230-S235.
- Shakya, S., Pradhan, B., Smith, L., Shrestha, J., & Tuladhar, S. (2012). Isolation and characterization of aerobic culturable arsenic-resistant bacteria from surfacewater and groundwater of Rautahat District, Nepal. *Journal of Environmental Management*, 95, S250-S255.
- Shatnawi, M., Alsmadi, A. M., Bsoul, I., Salameh, B., Mathai, M., Alnawashi, G., ... & Bawa'aneh, M. S. (2016). Influence of Mn doping on the magnetic and optical properties of ZnO nanocrystalline particles. *Results in Physics*, 6, 1064-1071.
- Siddique, S., Shah, Z. H., Shahid, S., & Yasmin, F. (2013). Preparation, characterization and antibacterial activity of ZnO nanoparticles on broad spectrum of microorganisms. *Acta Chimica Slovenica*, 60(3).
- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., ... & Mohamad, D. (2015). Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-micro letters*, 7, 219-242.
- Zhang, L., Ding, Y., Povey, M., & York, D. (2008). ZnO nanofluids—A potential antibacterial agent. *Progress in Natural Science*, 18(8), 939-944.