

## اثر استفاده از نانوکربن لوله‌ای مغناطیس شده $\text{CNT@Fe}_3\text{O}_4$ بر باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) و یرسینیا روکری (*Yersinia ruckeri*) جدا شده از ماهی

مصطفی علیشیری<sup>۱</sup>، کامران رضایی توابع<sup>۱\*</sup>، حسن نژاد حیدری<sup>۱</sup>، علیرضا میروافقی<sup>۱</sup>، پگاه فرهنگ<sup>۱</sup>

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، کرج.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱

### چکیده

استفاده از نانو مواد امکان اجرای برخی فرایندها با آلودگی کمتر نسبت به روش‌های معمول را فراهم آورده است. از جمله این نانو مواد می‌توان نانوکربن لوله‌ای (CNT) را نام برد که دارای خواص ضد باکتریایی هستند. از طرفی، دو باکتری آئروموناس هیدروفیلا یکی از عوامل ایجاد کننده سپتی سمی هموراژیک و یرسینیا روکری عامل بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی از عوامل مهم بیماری‌زا در صنعت پرورش آبزیان هستند. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر نانوکربن‌های لوله‌ای مغناطیس شده ( $\text{CNT@Fe}_3\text{O}_4$ ) بر دو باکتری آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری انجام گردید. برای انجام تحقیق، نانو ماده به روش هیدروترمال تهیه گردید و اثر ضدباکتریایی آنها در شرایط *in vitro* بر باکتری‌های مورد مطالعه تعیین گردید. نانو کربن لوله‌ای مغناطیسی سنتز شده به وسیله تکنیک‌های اسپکتروسکوپی و میکروسکوپی شامل طیف بینی پراش اشعه ایکس، مغناطیس سنج نمونه لرزان و میکروسکوپ الکترونی رویشی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون حداقل غلظت کشندگی (MBC) نشان داد که OD کدورت ایجاد شده برای باکتری آئروموناس هیدروفیلا در گروه شاهد برابر ۱/۴۲ است. اما در تیمارهای نانولوله‌های کربنی با غلظت ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ mg میلی گرم این مقدار به ترتیب برابر ۰/۱۷، ۰/۱۴، ۰/۰۸ و ۰ بود. همچنین OD کدورت ایجاد شده برای باکتری یرسینیا روکری در گروه شاهد برابر ۰/۹۴ اندازه گیری شد. اما در تیمارهای نانولوله‌های کربنی با غلظت ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ mg میلی گرم این مقدار به ترتیب برابر ۰/۲۴۵، ۰/۱۹۴، ۰/۱۱ و ۰/۰۹ بود. نتایج آزمون حداقل غلظت کشندگی برای هر دو باکتری نتایج یکسانی را نشان داد. در نهایت پس از جمع‌بندی و مقایسه نتایج پژوهش با سایر پژوهش‌ها می‌توان نتیجه گرفت استفاده از نانوکربن‌های لوله‌ای مغناطیسی شده در سیستم فیلتراسیون مخازن نگهداری آبزیان می‌تواند تاثیر بالقوه‌ای در کاهش بارباکتریایی داشته باشد.

**واژگان کلیدی:** نانوکربن لوله‌ای مغناطیسی،  $\text{CNT@Fe}_3\text{O}_4$ ، آئروموناس هیدروفیلا، یرسینیا روکری

## ۱. مقدمه

بسیاری از محققان بر این باورند که فناوری نانو روش مؤثرتر، کاراتر و قوی تر برای تصفیه آب ارائه خواهد کرد. طرفداران این نظر معتقدند که استفاده از نانو مواد امکان اجرا فرایندهای ساخت و تولید با آلودگی کمتر نسبت به روش های معمول را فراهم آورده است. اما این نگرانی وجود دارد که اندازه کوچک و فعالیت بالای این مواد سمیت آنها را افزایش دهد. اندازه کوچک آنها به معنای دشواری نگهداری آنها و آسانی نفوذ این مواد به درون طبیعت است (Wang et al. 2009). بنابراین با اینکه برخی از نانوذرات کارایی زیادی در تصفیه آب دارند، عدم قابلیت جداسازی پس از استفاده در فرایند تصفیه آب، مهمترین مشکل استفاده از آنها است. بنابراین، استفاده از تکنیکی جهت جداسازی و استفاده بهینه از آنها ضروری به نظر می رسد (Mohseni Bandpei et al., 2015). از جمله این نانوذرات می توان نانوکربن لوله ای را نام برد که دارای خواص ضد باکتریایی اند. نانوکربن های لوله ای (CNTها) که به نام باکی تیوب نیز شناخته می شوند، آلوتروپ هایی از کربن هستند که دارای ساختار استوانه ای و به دو شکل نانوکربن لوله ای تک دیواره (SWNT<sup>1</sup>) یا نانوکربن لوله ای چنددیواره (MWNT<sup>2</sup>) وجود دارند (Le et al. 2005). محققان بر این باورند که نانوکربن لوله ای در مقایسه با فناوری های دیگری که در تصفیه آب و فاضلاب به کار می روند، دارای مزایای زیادی هستند. یکی از این مزایا قابلیت استفاده مجدد این مواد است. اما با وجود نویدبخش بودن این مواد در کاربردهای تجاری و صنعتی، مطالعاتی در زمینه بررسی اثر سمیت آنها انجام شده است که نشان می دهند رهایش این نانوذرات برای محیط زیست خطرناک است (Nanotechnology innovation council Reports). این نگرانی با استفاده از تکنیک هایی از جمله: تکنیک ها مغناطیسی کردن این نانوذرات به منظور جداسازی با

استفاده از یک آهنربا خارجی قابل حل است (Mohseni Bandpei et al., 2015).

از جمله باکتری های بیماری زا در صنعت پرورش آبزیان دو باکتری آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری اند. آئروموناس هیدروفیلا باکتری گرم منفی، هتروتروف، میله ای، متحرک و فرصت طلب است و به طور عمده در مناطقی با آب و هوای گرم یافت می شود. این باکتری در آب های شیرین و لب شور و در محیط های هوایی و غیرهوازی قادر به زندگی است (Adanir and Turutoglu, 2007). یرسینیا راکری عامل یرسینیوزیس (سپتی سمی یرسینیایی) بیماری دهان قرمز آنتروباکتریایی یکی از بیماری های حاد با زیان های اقتصادی بالا در صنعت پرورش آبزیان است.

تا کنون انواع متعددی از داروهای ضدباکتریایی جهت استفاده و کنترل بیماری های عفونی آبزیان مورد استفاده قرار گرفته اند. اما استفاده بی رویه از این مواد باعث ایجاد مقاومت در بسیاری از سویه های باکتریایی نسبت به آنها شده است (Kang et al. 2011). لذا، با توجه به گسترش مقاومت باکتریایی به انواع مواد ضدباکتریایی مانند آنتی بیوتیک ها و انباشت این مواد در محیط زیست استفاده از شیوه های کارآمد که بتواند بر مهار باکتریایی موثر واقع شود ضروری به نظر می رسد. در این پژوهش اثر نانوکربن لوله ای به منظور کنترل دو باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) و یرسینیا روکری (*Yersinia ruckeri*) که عامل بیماری زا در ماهیان پرورشی هستند در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲. مواد و روش ها

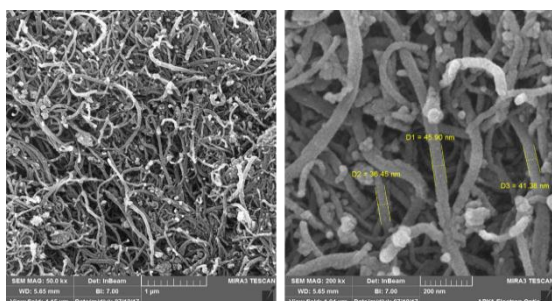
در این تحقیق دو گونه باکتریایی آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری از آزمایشگاه گروه شیلات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه گردید که از گونه های ماهیان بیمار جداسازی شده بودند. همچنین

<sup>1</sup> single-walled carbon nanotube

<sup>2</sup> multi-walled carbon nanotube

اکسید آهن روی نانوکربن‌های لوله‌ای چند دیواره، mg ۸۱۰ از نانوکربن‌های لوله‌ای فعال شده همراه با ۴۰ mg میلی گرم از محلول اتیلن گلیکول با تری‌سدیم سترات (g ۰/۱۵)، سدیم استات (g ۳/۶)، پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (g ۱) به مدت ۳ ساعت تحت امواج فراصوتی هم‌زده شد. مخلوط حاصل سپس به یک اتوکلاو انتقال داده شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای °C ۲۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و در انتها نانوکربن‌های لوله‌ای مغناطیسی سنتز شده با اتانول شسته و خشک گردید.

تصویر (الف و ب) به ترتیب نانوکربن‌های لوله‌ای و نانوکربن‌های لوله‌ای مغناطیسی شده را که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی رومیزی (SEM) تصویربرداری شده‌اند نشان می‌دهد. نانوکربن‌های لوله‌ای در حالت طبیعی ۳۸ nm و بعد از مغناطیسی شدن ۴۰ nm متر قطر دارند.



شکل ۱ (ب)- تصویر نانوکربن‌های لوله‌ای مغناطیسی شده

بررسی قرار گرفت، که برای این منظور مقدار لازم از هر نمونه به آزمایشگاه بیم گستر تابان ارسال شد. در این آزمایشگاه جهت تعیین الگوی پراش اشعه ایکس و تعیین خلوص نانوذرات تولیدی از دستگاه پراش اشعه ایکس مدل (Philips PW1730) ساخت کشور هلند، خواص

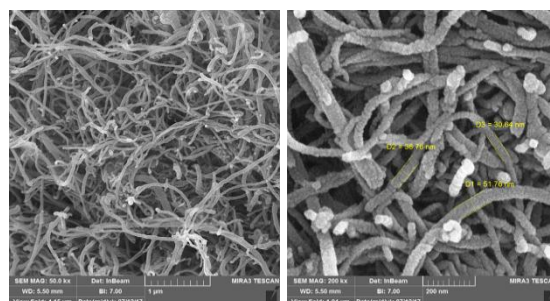
محیط کشت TSA و TSB از کمپانی (Quelab, Canada) و تمامی مواد مورد استفاده جهت سنتز نانومواد از نمایندگی شرکت مرک آلمان در ایران خریداری شد.

## ۱.۲. آماده‌سازی نانوکربن لوله‌ای مغناطیسی مورد نیاز

### ۱.۱.۲. تهیه و سنتز نانوکربن لوله‌ای مغناطیسی

#### (CNT@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

نانوکربن‌های لوله‌ای مغناطیسی (Mag CNTs) به روش هیدروترمال تهیه گردیدند. طبق این روش، نانوکربن‌های لوله‌ای چند دیواره (۱g)، با قطر ۱۰ تا ۱۰۰ nm در ۱۰۰ ml اسید نیتریک غلیظ پراکنده و به مدت ۷ ساعت در دمای °C ۱۰۰ روی شیکر مجهز به همزن قرار داده شد. این کار سبب افزایش تخلخل و فعال شدن کربن نانولوله چند جداره خواهد شد. جهت از بین بردن حالت اسیدی، نانوکربن‌های لوله‌ای چندین مرحله با آب شسته شدند و در دمای °C ۵۰ درجه سانتیگراد تحت خلأ خشک گردیدند. در مرحله بعد جهت نشان دادن نانوذرات



شکل ۱ (الف)- تصویر نانوکربن‌های لوله‌ای

## ۲.۱.۲. آنالیز نانوذرات

ترکیبات سنتز شده به وسیله تکنیک‌های اسپکتروسکوپی و میکروسکوپی شامل طیف بینی پراش اشعه ایکس<sup>۱</sup> (XRD)، مغناطیس‌سنج نمونه لرزان<sup>۲</sup> (VSM) و میکروسکوپ الکترونی رومیزی<sup>۳</sup> (SEM) مورد

<sup>۱</sup> X-ray Diffraction

<sup>۲</sup> Vibrating Sample Magnetometer

<sup>۳</sup> Scanning Electron Microscopy

۰/۰۸۸) قرار گیرد، در این شرایط عدد جذب غلظت باکتریایی حدوداً  $10^8 \times 1/8$  CFU/ml خواهد بود.

### ۲.۲.۲. آزمون حداقل غلظت کشندگی (MBC<sup>۲</sup>)

در این آزمون از لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت TSB استفاده شد. بدین صورت که مقدار ۱ ml میلی لیتر از غلظت باکتریایی از  $10^8 \times 1/8$  CFU/ml به صورت مجزا برای هر دو گونه باکتری درون لوله‌های آزمایش (با ۳ تکرار) با ۱۰ ml میلی لیتر محیط کشت TSB اضافه شد و برای تعیین خاصیت ضدباکتری نانولوله‌های کربن مغناطیسی غلظت‌های مختلف ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ mg از نانولوله‌های کربنی مغناطیسی درون هر لوله آزمایش ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $25^\circ\text{C}$  در انکوباتور تکان‌دهنده قرار داده شد تا خاصیت آنتی باکتریایی نانولوله‌های کربنی مغناطیسی مشخص شود. بعد از ۲۴ ساعت از هر یک از لوله‌های آزمایش نمونه برداری و  $\text{OD}^3$  هر کدام از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری تعیین گردید. جهت مقایسه کدورت ایجاد شده در هر نمونه مقدار OD مربوط به محیط کشت TSB از مقدار OD هر نمونه کم شد تا کدورت مربوط به باکتری‌ها بدست آید.

### ۳.۲.۲. آزمون منطقه مهار رشد (MIC<sup>۴</sup>)

در این آزمون ۱ ml میلی لیتر از سرم فیزیولوژی با بارباکتریایی  $10^8 \times 1/8$  CFU/ml از هر دو گونه باکتریایی به صورت مجزا (با ۳ تکرار) در پلیت‌های حاوی محیط کشت TSA کشت داده شد و مقدار ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ mg از نانولوله‌های کربنی مغناطیسی به آرامی روی ژل محیط کشت گذاشته و ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  نگهداری شد. بعد از رشد باکتری قطر هاله عدم رشد با استفاده از نرم‌افزار ImageJ در مقادیر مختلف نانولوله‌های

مغناطیسی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه مغناطیس سنج لرزشی مدل (VSM, MDK Co. Ltd, Iran) محصول شرکت مغناطیس دقیق کویر و نیز مورفولوژی سطح جذب، شکل و اندازه نانوذرات مغناطیسی به وسیله میکروسکوپ الکترونی رویشی مدل (Tescan mira 3) محصول کشور جمهوری چک، استفاده شد.

### ۲.۲. بررسی خاصیت ضدباکتریایی

#### ۱.۲.۲. روش کشت و تعیین غلظت باکتری‌ها

به منظور آماده‌سازی محیط کشت جهت کشت هر دو گونه باکتریایی به صورت جداگانه ابتدا ۸ گرم از محیط کشت<sup>۱</sup> TSB درون ارلن حاوی ۲۰۰ ml میلی لیتر آب مقطر ریخته و اتوکلاو (۱۵ دقیقه در  $121^\circ\text{C}$ ) شد. پس از آماده شدن محیط کشت جهت تلقیح، باکتری‌های یرسینا روکری و آئروموناس هیدروفیلا جداگانه در محیط کشت TSB کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور تکان‌دهنده در دمای  $37^\circ\text{C}$  سانتیگراد هم زده شد تا غلظت باکتریایی افزایش یابد. بعد از طی این مدت زمان، محتوی ارلن را به لوله‌های فالكون ۱۵ ml میلی لیتر ریخته و به منظور جداسازی و ته نشین کردن باکتری‌ها از محیط کشت، لوله‌های فالكون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت RPM ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از آن برای جداسازی کامل محیط کشت از باکتری، محیط کشت با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد جایگزین و دوباره به مدت ۵ دقیقه با سرعت RPM ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد برای بدست آوردن غلظت مشخصی از بار باکتریایی یرسینا روکری، ۱۰۰ ml میلی لیتر از سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد در ارلن استریل ریخته شد و باکتری ته نشین شده در لوله‌های فالكون به آن اضافه گردید تا در طول موج ۶۰۰ nm (OD600nm) عدد جذب بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ (در این آزمایش

<sup>۱</sup> Tryptic Soy Broth

<sup>۲</sup> Minimum Bactericidal Concentration

<sup>۳</sup> Optical density

<sup>۴</sup> Minimum Inhibitory Concentration

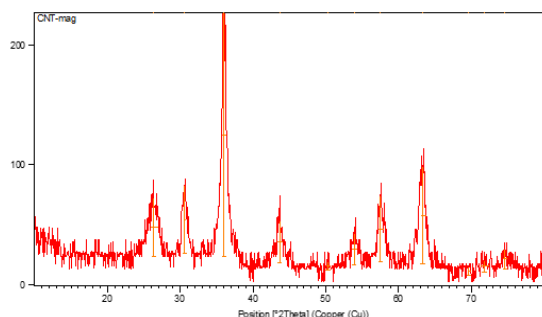
### ۳. نتایج

#### ۱.۳. آنالیزهای تاییدکننده مغناطیسی شدن

##### نانولوله‌های کربن

##### ۱.۱.۳. آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD)

ساختار کریستالی نانولوله‌های کربن به وسیله الگوی پراش پرتو ایکس مورد بررسی قرار گرفت. طبق نمودار (شکل ۲. الف) در الگوی پراش پرتو ایکس نانولوله‌های کربن پیام‌های شاخصی ( $2\theta = 26^\circ, 43^\circ, 53/1^\circ$ ) وجود دارد که مربوط به ساختارهای کریستالی است. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است الگوی پراش پرتو ایکس دقیقاً با ساختار کریستالی استاندارد جهانی مطابقت داشته و ساختار کریستالی بدون ناخالصی است.



شکل ۲ (ب) - نمودار الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نانولوله‌های کربنی مغناطیسی (CNT@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

فاز مغناطیسی را نشان می‌دهند.

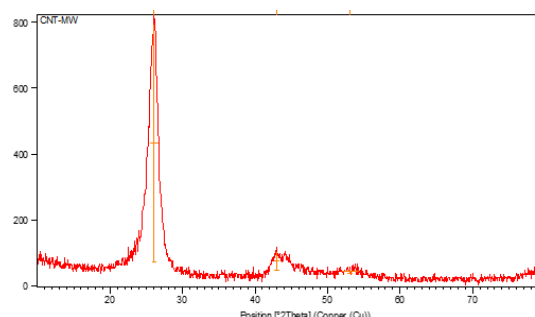
##### ۲.۱.۳. آنالیز پس ماند مغناطیسی (VSM<sup>۱</sup>)

اندازه‌گیری پس ماند مغناطیسی در یک میدان مغناطیسی اعمالی در دمای اتاق و با وسعت میدان از ۱۰۰۰۰- تا ۱۰۰۰۰+ اورستد برای پیدا کردن خواص مغناطیسی نانولوله‌های کربن مغناطیسی انجام گرفت. همان‌طور که در نمودار (شکل ۲) نشان داده شده است

کربن مغناطیسی اندازه‌گیری و باهم مقایسه گردید. با این نرم افزار می‌توان با استفاده از یک شاخص معین طولی در تصویر قطر هاله عدم رشد را اندازه‌گیری کرد.

##### ۳.۲. تجزیه و تحلیل آماری

جهت انجام آنالیزهای آماری از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و دانکن براساس شاخص‌های مورد بررسی بر اساس اختلاف معنی‌دار در سطح خطای ۵٪ بین تیمارها استفاده شد. همچنین از نرم‌افزار SPSS-24 جهت آنالیز داده‌ها و Excel-2013 جهت رسم نمودار استفاده شد. در کلیه نمودارها و جداول حروف لاتین غیرمشترک در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است ( $P < 0.05$ ). همچنین کلیه آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام و داده‌ها به صورت میانگین گزارش شد.



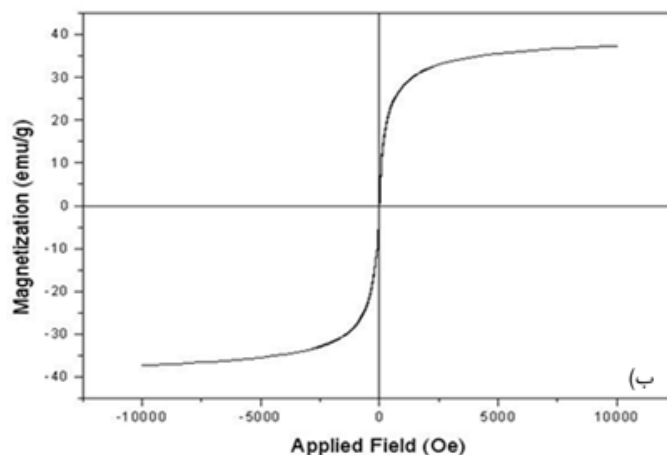
شکل ۲ (الف) - نمودار الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نانولوله‌های کربنی (CNT)

همان‌طور که در نمودار (شکل ۲. ب) دیده می‌شود الگوی پراش پرتو ایکس نانولوله‌های کربن مغناطیسی نیز مورد بررسی قرار گرفت. پیک‌های ناحیه  $2\theta = 26/36^\circ, 30/60^\circ, 35/97^\circ, 43/68^\circ, 43/33^\circ, 50/93^\circ, 53/93^\circ, 57/52^\circ, 63/33^\circ, 69/68^\circ, 71/72^\circ, 74/60^\circ$  به ترتیب به صفحات کریستالی ۱۷، ۴۸، ۵۷، ۲۰۲، ۳۵، ۷، ۲۵، ۵۴، ۸۱، ۷، ۱۰ و ۱۷ مربوط‌اند که کاملاً با الگوی استاندارد آن منطبق و تشکیل

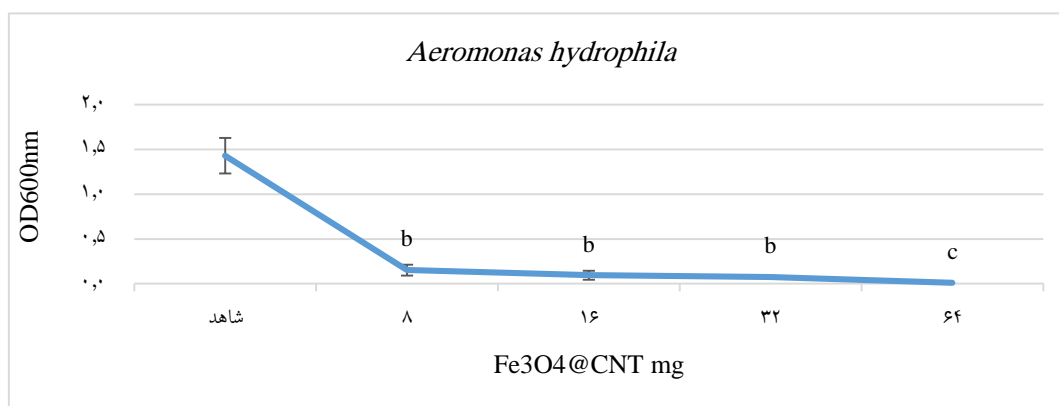
<sup>۱</sup> Vibrating Sample Magnetometer

پارامغناطیسی‌اند و مقدار اشباع‌شدگی مغناطیسی برای این نانوذرات ۳۷ emu/g است.

حلقه پس‌ماند به‌طور کامل برگشت‌پذیر است که نشان‌دهنده این موضوع است که نانوذرات دارای خاصیت سوپر



شکل ۳- نمودار آنالیز پس‌ماند مغناطیسی نانولوله‌های کربنی مغناطیسی شده (CNT@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)



شکل ۴- میزان بازدارندگی رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تحت تاثیر مقادیر مختلف CNT@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

برابر ۰/۱۷، ۰/۱۴، ۰/۰۸ و ۰ است که طبق آنالیز، گروه شاهد با ۴ تیمار دیگر دارای اختلاف معنی‌دار بود. اما بین تیمارها با غلظت ۸، ۱۶ و ۳۲ mg اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد در حالی که OD تیمار ۶۴ mg برابر صفر و با تمامی تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار دارد.

بر اساس نتایج به‌دست آمده طبق نمودار (۴) OD کدورت ایجاد شده برای باکتری *یرسینا* روکری در گروه شاهد برابر ۰/۹۴ بود. اما در تیمارهای نانولوله‌های کربنی

### ۲.۳. تایید فعالیت آنتی باکتریایی نانولوله‌های

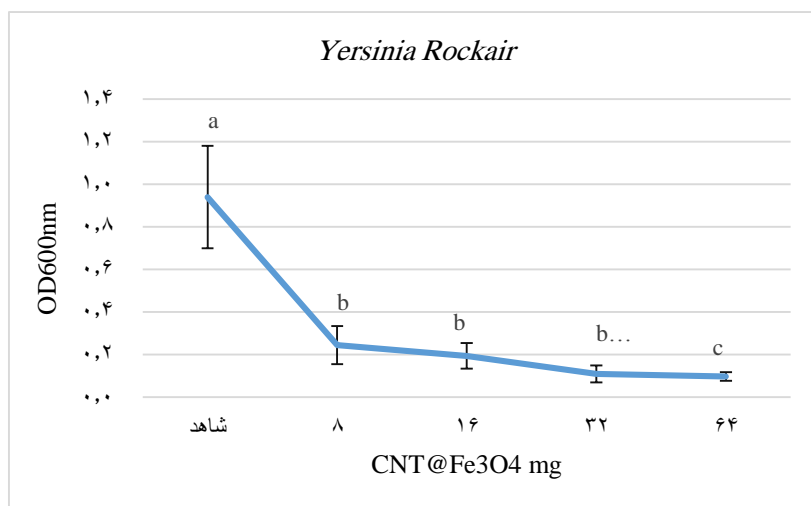
#### کربن مغناطیسی

#### ۱.۲.۳. آزمون حداقل غلظت کشندگی

بر اساس نتایج به‌دست آمده طبق نمودار (۳) OD کدورت ایجاد شده برای باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در گروه شاهد برابر ۱/۴۲ است. اما در تیمارهای نانولوله‌های کربنی با غلظت ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ mg این مقدار به ترتیب

با تیمارهای ۸ و ۱۶ mg و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار دارد ولی فاقد اختلاف معنی‌دار با تیمار ۳۲ mg است. همچنین اختلاف معنی‌داری بین این تیمار با دو تیمار ۸ و ۱۶ mg میلی گرم مشاهده نشد (شکل ۵).

با غلظت ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ mg این مقدار به ترتیب برابر ۰/۲۴۵، ۰/۱۹۴، ۰/۱۱ و ۰/۰۹ بود که طبق آنالیز، گروه شاهد با ۴ تیمار دیگر دارای اختلاف معنی‌دار است. اما بین تیمارها با غلظت ۸، ۱۶ و ۳۲ mg اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد در حالی که OD تیمار ۶۴ mg برابر ۰/۰۹ و



شکل ۵- نمودار میزان بازدارندگی رشد باکتری یرسینا روکری تحت تاثیر مقادیر مختلف CNT@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

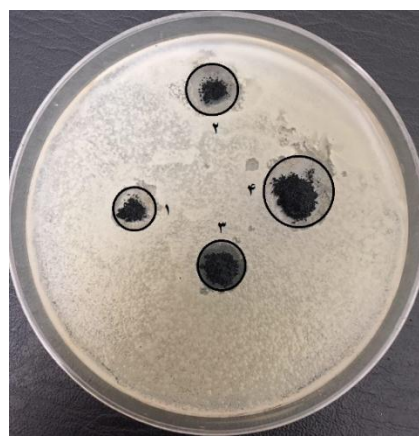
نرم افزار Image J اندازه‌گیری شد قطر هاله عدم رشد برای باکتری یرسینا روکری و برای مقادیر ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ mg به صورت میانگین طبق نمودار شکل های ۶ و ۷ بدست آمد.

### ۲.۲.۳. آزمون منطقه مهار رشد

براساس نتایج بدست آمده طبق تصویر (شکل ۶-الف) برای باکتری یرسینا روکری و تصویر (شکل ۶-ب) برای باکتری آئروموناس هیدروفیلا منطقه عدم رشد (توسط

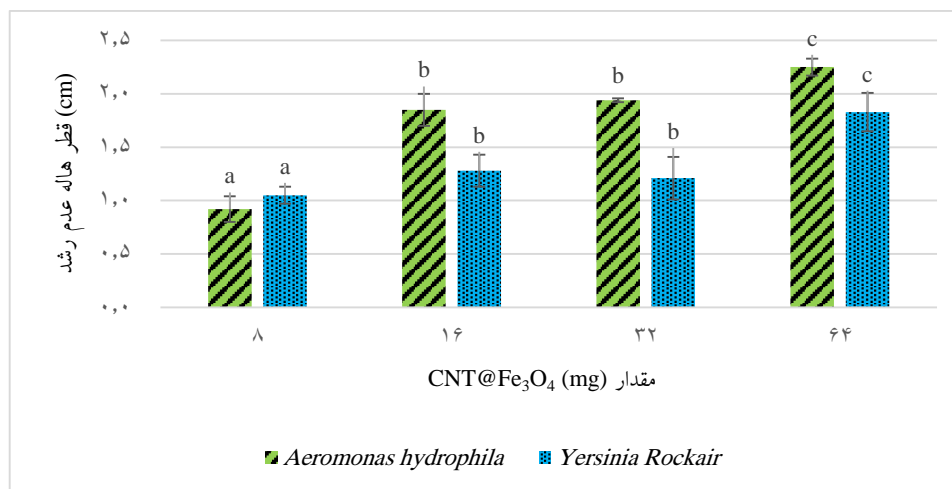


شکل ۶-ب. هاله عدم رشد ترکیب CNT@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> علیه باکتری *Aeromonas hydrophila*



شکل ۶-الف. هاله عدم رشد ترکیب CNT@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> علیه باکتری *Yersinia Rockair*





شکل ۷- نمودار قطر هاله عدم رشد باکتری *A. Hydrophila* و *Y. rockair* بر حسب (mm) برای وزن‌های مختلف.

نانومواد و سلول زنده‌اند (Shanthi et al., 2016). در این پژوهش هر دو باکتری مورد آزمایش گرم منفی بود، تفاوت باکتری‌های گرم منفی و مثبت در ساختار غشا و تفاوت در ضخامت لایه پپتیدوگلیکان آن‌ها است. باکتری‌های گرم مثبت دارای پپتیدوگلیکان چند لایه و ضخیم هستند اما باکتری‌های گرم منفی لایه پپتیدوگلیکان کمتری دارند اما غشا خارجی آن‌ها دارای لیپولی ساکارید است که نفوذپذیری کمتری نسبت به عوامل ضد میکروبی دارد (Kim et al., 2007). به همین خاطر و با توجه اثر قوی نانوکربن‌های مغناطیسی شده روی باکتری‌های گرم منفی مورد مطالعه در پژوهش کنونی، احتمالاً این نانومواد روی باکتری‌های گرم مثبت نیز اثر خواهند داشت. همچنین مطالعات بیشتر نشان داد که نانو لوله‌های کربن هیچ اثر جهش‌زایی روی باکتری‌های *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* نداشتند (Di Sotto et al. 2009). از سوی دیگر، برخی از مطالعات نشان داده‌اند که نانوکربن‌های چند لایه (MWNT) اثرات سمی بیشتری در مقایسه با نانولوله‌های تک لایه (SWNT) برای میکروارگانیسم‌ها دارند (Tiffany et al. 2013). از زئولیت پوشش داده شده با نانوذرات پلیمر

بدین صورت براساس نمودارها، قطر هاله عدم رشد برای هر دو باکتری در مقدار ۸ تا ۶۴ میلی گرم افزایش نشان می‌دهد و اختلاف معنی‌داری بین تیمارها به جز تیمار ۱۶ و ۳۲ میلی گرم وجود دارد.

#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

تحقیق و پژوهش‌های متعدد مکانیسم‌های احتمالی واکنش و فعل و انفعال‌های نانو مواد با ماکرو مولکول‌های بیولوژیکی را بررسی کرده و اینطور پیشنهاد می‌کنند که به‌طور کلی نانو مواد یون‌هایی را آزاد می‌کنند که با گروه تیول پروتئین‌های موجود بر سطح سلول باکتری‌ها واکنش می‌دهند. این قبیل پروتئین‌ها از غشاء سلولی باکتری به سمت بیرون برآمدگی داشته و موجب انتقال مواد غذایی از دیواره سلول می‌شوند. نانو مواد این پروتئین‌ها را غیرفعال کرده، نفوذپذیری غشاء را کاهش داده و سرانجام باعث مرگ سلولی می‌شوند (Stoimenov et al., 2002). همچنین ایجاد غشا در منافذ سلولی، اختلال در واکنش‌های تنفسی، تشکیل ترکیبات ضدباکتریایی مانند پراکسید هیدروژن، آنیون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدراکسید نیز از مکانیسم‌های احتمالی بین



نتایج آزمون حداقل غلظت کشندگی برای باکتری *Aeromonas hydrophila* در سیستم مدار بسته نگهداری پست لارو میگو آب شیرین استفاده شده است، نتایج این تحقیق نشان داد که این نانوذرات کارایی بالایی در کنترل بار باکتریایی آب دارند (Alishiri et al., 2017). در همین راستا با مغناطیسی کردن پلی اتیلن ایمین به کمک نانوذرات آهن، از آن برای کاهش<sup>۲</sup> (TOC) در فاضلاب خروجی تصفیه خانه استفاده شده است (Lakshmanan et al., 2014). خانی و همکاران (Khani, et al., 2011) نشان دادند که با استفاده از نانوذرات می‌توان رشد باکتری‌های بیماری‌زایی چون اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس را مهار کرد. به منظور مقایسه کارایی نانوذرات نقره مغناطیسی و نانوذرات نقره مغناطیسی اصلاح شده با لایه کربنی (Fe3O4@C@Ag) در گندزدایی پساب فاضلاب شهری پژوهش‌ها نشان می‌دهد که هر دو مورد توانایی حذف باکتری‌های کلیفرم مدفوعی را دارند و با راندمان بیشتری عمل می‌کنند (Zainalzadeh et al., 2015). از ترکیب نانولوله‌های کربنی برای حذف کلیفرم فاضلاب‌های آبی‌ پروری و شهری استفاده شده است و نتایج حاکی از آن دارد که از مجموع هفت فاکتور مورد بررسی، نانوذرات با توانایی بالا قادرند نیترات، فسفات، فلزات سنگین مس و کروم و نیز بار باکتری‌های کلیفرم موجود در هر دو فاضلاب آبی‌ پروری و شهری را کاهش دهند (Nezhadheydari et al., 2017). پژوهش روی خاصیت آنتی باکتریایی نانولوله‌های کربن چند دیواره تاکید بر خاصیت ضد باکتریایی آنها روی باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* دارد و نشان داده شده است که نانولوله‌های کربن چند دیواره به دلیل داشتن گروه عاملی OH فعال، پراکندگی بیشتری در حالت کلوییدی و در نتیجه اثر باکتری کشی بیشتری خواهند داشت (Zuhair et al. 2018).

نتایج آزمون حداقل غلظت کشندگی برای باکتری *Aeromonas hydrophila* در سیستم مدار بسته نگهداری پست لارو میگو آب شیرین استفاده شده است، نتایج این تحقیق نشان داد که این نانوذرات کارایی بالایی در کنترل بار باکتریایی آب دارند (Alishiri et al., 2017). در همین راستا با مغناطیسی کردن پلی اتیلن ایمین به کمک نانوذرات آهن، از آن برای کاهش<sup>۲</sup> (TOC) در فاضلاب خروجی تصفیه خانه استفاده شده است (Lakshmanan et al., 2014). خانی و همکاران (Khani, et al., 2011) نشان دادند که با استفاده از نانوذرات می‌توان رشد باکتری‌های بیماری‌زایی چون اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس را مهار کرد. به منظور مقایسه کارایی نانوذرات نقره مغناطیسی و نانوذرات نقره مغناطیسی اصلاح شده با لایه کربنی (Fe3O4@C@Ag) در گندزدایی پساب فاضلاب شهری پژوهش‌ها نشان می‌دهد که هر دو مورد توانایی حذف باکتری‌های کلیفرم مدفوعی را دارند و با راندمان بیشتری عمل می‌کنند (Zainalzadeh et al., 2015). از ترکیب نانولوله‌های کربنی برای حذف کلیفرم فاضلاب‌های آبی‌ پروری و شهری استفاده شده است و نتایج حاکی از آن دارد که از مجموع هفت فاکتور مورد بررسی، نانوذرات با توانایی بالا قادرند نیترات، فسفات، فلزات سنگین مس و کروم و نیز بار باکتری‌های کلیفرم موجود در هر دو فاضلاب آبی‌ پروری و شهری را کاهش دهند (Nezhadheydari et al., 2017). پژوهش روی خاصیت آنتی باکتریایی نانولوله‌های کربن چند دیواره تاکید بر خاصیت ضد باکتریایی آنها روی باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* دارد و نشان داده شده است که نانولوله‌های کربن چند دیواره به دلیل داشتن گروه عاملی OH فعال، پراکندگی بیشتری در حالت کلوییدی و در نتیجه اثر باکتری کشی بیشتری خواهند داشت (Zuhair et al. 2018).

<sup>1</sup> Polyethylenimin<sup>2</sup> Total Organic Carbon

نیز می‌توان بهره گرفت. از مزایای دیگر این ترکیبات سهولت جداسازی آنها است که به دلیل خاصیت مغناطیسی می‌توانند به سادگی به وسیله آهنربای خارجی از نمونه جداسازی شوند.

افزایش شیوع بیماری‌های عفونی از طریق آب و مصارف مجدد پساب‌ها و همچنین گسترش میکرو ارگانیسم‌های بیماری‌زای مقاوم در برابر عوامل گندزدا، نیاز مستمر برای استفاده از روش‌های نوین گندزدایی است. لذا، از این ترکیبات در تصفیه باکتریایی پساب حاصل از آبی‌پرووری

## ۵. منابع

- Adanir, D.O.R., Turutoglu, H., 2007. Isolation and antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* in a carp (*Cyprinus carpio*) hatchery farm. *Bulletin of the Veterinary, Institute in Pulawy* 51, 361-364.
- Alishiri, M., 2017. Application of modified zeolite with polyethyleneimine Polymer and use against *Aeromonas hydrophila* in water filtration system of tank in freshwater post larve prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) under transportation stress. M.Sc thesis. Fish culture and fisheries group. *University of Tehran Iran*. 101 p (in Persian).
- Banerjee, P., Das, D., Mitra, P., Sinha, M., Dey, S., Chakrabarti, S., 2014. Solar photocatalytic treatment of wastewater with zinc oxide nanoparticles and its ecotoxicological impact on *Channa punctatus*—a freshwater fish. *Journal of Materials and Environmental Science* 5(4), 1206-1213.
- Di Sotto, A. Chiaretti, M. Carru, G.A. Bellucci, S. Mazzanti, G., 2009. Multi-walled carbon nanotubes: Lack of mutagenic activity in the bacterial reverse mutation assay. *Toxicology Letters*. 184, 192–197.
- Kang-ho, A., Sun-Man K., Je, Y., 2011. Multi-Walled Carbon Nanotube (MWCNT) Dispersion and Aerosolization with Hot Water Atomization without Addition of Any Surfactant Saf Health Work. Mar. *Department of Mechanical Engineering, Hanyang University, Ansan, Korea*. 2, 65–69.
- Khani, P H., Zand, AN M., Imani, S., Rezayi, M., Rezaei-Zarchi, S., 2011, Determining the Antibacterial Effect of Zno Nanoparticle against the Pathogenic Bacterium, *Shigella Dysenteriae* (Type 1). *International Journal of Nano Dimension* 1(4): 279-285 (in Persian).
- Kim, JS. Kuk, E., Yu, KN., Kim, J-H., Park, SJ. Lee, H.J., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed-Nanotechnology* 3, 95-101.
- Lakshmanan, R., Sanchez-Dominguez, M., Matutes-Aquino, J. A., Wennmalm, S., & Kuttuva Rajarao, G., 2014. Removal of total organic carbon from sewage wastewater using poly (ethylenimine)-functionalized magnetic nanoparticles. *Langmuir* 30(4), 1036-1044 .
- Le, T., McEvoy, J., Khan E., 2015. The effect of single-walled carbon nanotubes on *Escherichia coli*: multiple indicators of viability. *The Journal of Nanoparticle Research* 17,32 Received.
- Mirhoseni, M., Yazdani, N., Dehghan, A., 2016. Antimicrobial activity of chitosan-zinc oxide nanocomposite, *Razi. Journal of Medical Sciences* 23(47), 113-104 (in Persian).
- Mohseni Bandpei, A., Fattazadeh, M., Rezaei Kalantari, M., Islamic, A., 2015. Determination of the absorption of diazinon from aqueous solutions using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-magnetic carbon nanotubes. *Journal of Environmental Health Engineering* 2(4), 293-28 (in Persian).
- Nanobiotechnology: Relevance in microbiology. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/235566349\\_Nanobiotechnology\\_Relevance\\_in\\_microbiology](https://www.researchgate.net/publication/235566349_Nanobiotechnology_Relevance_in_microbiology) [accessed Feb 08 2019].

- Nanotechnology innovation council Reports, Application of Nanotechnology in Water Treatment. Special Nano Development Headquarters. 158 p (in Persian).
- Nezhadheydari, H., 2017. Investigation of carbon nano- tube (CNT) and nano-zinc oxide (ZnO) application separately and in combination in aquaculture and municipal wastewaters treatment and their interaction effects on the survival rate of daphnia (*Daphnia magna*) zooplankton. M.Sc thesis. Fish culture and fisheries group. *University of Tehran*. Iran. 189 p (in Persian).
- Shanthi, S., Jayaseelan, B.D., Velusamy, P., Vijayakumar, S., Chih, C.T., Vaseeharan, B., 2016. Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dabb1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. *Microbial pathology* 93, 70-7.
- Sinha, R., Karan, R., Sinha, A., Khare, S.K., 2011. Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells. *Bioresource Technology* 102(2), 1516-20.
- Stoimenov, P. K., Klinger, R.L., Marchin, G.L., Klabunde, K. J., 2002. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir* 18, 6679–6686 .
- Tiffany, S., Chan, Y., Nasser, F., Christine, H., Denis, S.T., Himadri, S., Ghafari, P., Hadjout-Rabi, N., Niels, C., Xiaowu T., 2013. Carbon nanotube compared with carbon black: effects on bacterial survival against grazing by ciliates and antimicrobial treatments. *Nanotoxicology* 7(3), 251–258.
- Wang, X., Li, Q., Xie, J., Jin, Z., Wang, J., Li, Y., Jiang, K., Fan, S., 2009. Fabrication of ultralong and electrically uniform singlewalled carbon nanotubes on clean substrates. *Nano Lett* 9,3137-41.
- Zainalzadeh, D., Rezae Kalantari, R., Nabih Zadeh Nodehi, R., Esrrailly, A., 2015. Production and testing of magnetic nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Ag) for disinfection of urban wastewater. *16th National Conference on Environmental Health*. (in Persian).
- Zuhair, S., Wasna'a, M., Ahmed, N., Nadir F., 2018. Synergistic Activity of Multi-Walled Carbon Nanotubes Suspension against Clinical Isolates of Pathogenic Bacteria. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 10(4), 718-722.

