

تولید زیستی نانوذرات اکساید جست با استفاده از باکتری ساکروتروف

Microbacterium sp. و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن

پوهنمل بشیر احمد عاصم دیپارتمنت بیولوژی پوهنهی تعلیم و تربیه موسسه تحصیلات عالی غور

Email: bashirahmadaseem@ghru.edu.af

پوهنیار محمدعارف احساس دیپارتمنت بیولوژی پوهنهی تعلیم و تربیه موسسه تحصیلات عالی غور

Email: Arif_ahsas@ghr.edu.af

چکیده

در سال‌های اخیر فناوری نانو به دلیل تأثیر گسترده روی تمامی عرصه‌های علم و زندگی از جمله زیست‌شناسی و زیست‌پزشکی، 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. نانوذرات اغلب به روش‌های مختلف فیزیکی و کیمیاوی تولید می‌شوند، با این حال بیشتر این روش‌ها نیازمند صرف انرژی زیاد و همراه با تولید محصولات جانبی سمی و خاصیت آلوده کننده هستند. از این رو کشف و توسعه روش‌های سازگار با محیط زیست مانند سنتز بیولوژیکی نانوذرات توسط باکتری‌ها مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه استحصال نانوذرات اکساید جست به وسیله استفاده از سوپرناتانت کشت میکروبی سویه مقاوم به سرمای *Microbacterium sp.*OSNP13 انجام شد. نانوذرات تولید شده با استفاده از تجزیه‌های ساختاری UV-Vis، DLS و XRD مشخصه‌یابی شدند. نتایج نشان داد که اوسط اندازه نانوذرات اکساید جست تولید شده 59/16 نانومتر می‌باشد. در ادامه فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات تولید شده مورد ارزیابی قرار داده شد. مقادیر MIC نانوذرات اکساید جست برای دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* برابر با 500 میکروگرام / میلی‌لیتر محاسبه شد. نانوذرات اکساید جست تولید شده در این تحقیق خواص ضد میکروبی مناسبی از خود نشان داده‌اند و می‌توانند کاندید مناسبی برای استفاده به‌عنوان عوامل ضد میکروبی باشند.

کلمات کلیدی: *Microbacterium sp.* ساکروتروف، نانوذره اکساید جست، فعالیت آنتی باکتریال، حداقل غلظت

مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی

Biosynthesis of ZnO nanoparticles by psychrotrophic *Microbacterium* sp. and evaluation of its antibacterial activities

Teaching Assistant. Bashir Ahmad Aseem, Department of Biology, faculty of Education, Ghor
Institute of Higher Education

Email: bashirahmadaseem@ghru.edu.af

Teaching Assistant. Mohamad Arif Ahsas , Department of Biology, faculty of Education, Ghor
Institute of Higher Education

Email: Arif_ahsas@ghr.edu.af

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

نانوتکنولوژی محدوده‌ای از تکنولوژی است که در این محدوده انسان می‌تواند انواع ترکیبات، آلیاژها، وسایل و ابزارها و به طور 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 به موجب 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 با قابلیت افزایش یافته بوده‌اند (Hu و همکاران، 2010؛ Li و همکاران، 2015). برای پاسخگویی به تقاضای روزافزون برای تهیه عوامل ضد باکتریای کارا، چندین نانومواد تولید شده است. با این حال، بسیاری از نانومواد ضد میکروبی که تاکنون گزارش شده‌اند با نگرانی در مورد مسمومیت، آلودگی محیط‌زیست، ناسازگاری بیولوژیکی و روش سنتز پیچیده همراه هستند (Musee و همکاران، 2011). در نتیجه همچنان یک چالش برای تولید نانومواد 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 بلند 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 آنرا به یک افزودنی مناسب برای منسوجات و سطوحی که در تماس با بدن انسان است تبدیل کرده است (Liu و همکاران، 2014). نانوذرات 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، 2012). فعالیت‌های ضد میکروبی نانوذرات اکساید جست نسبت به میکروذرات به دلیل افزایش سطح نانوذرات بهبود یافته است و هرچه اندازه ذرات کوچک‌تر باشد خاصیت ضد میکروبی افزایش می‌یابد (Padmavathy و Vijayarghavan، 2008). به‌طور کلی، اکساید جست توانایی باکتری را کاهش می‌دهد؛ با این حال تاکنون مکانیسم فعالیت ضد میکروبی آن به خوبی 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، 2008). با این حال گونه‌های تعامل کننده‌ای اکسیژن تولید شده روی سطح ذرات، انتشار آیون جست (Zn^{+})، اختلال در غشاء و پروسه‌های غشایی و همچنین نانوذرات درونی می‌توانند از دلایل احتمالی آسیب سلولی باشد (Hajipour و همکاران، 2012). با توجه به مکانیسم‌های مقاومت فلزی کارآمد و پتانسیل بالای میکروارگانیزم‌های ساکروتروف در سنتز نانوذرات و مطالعات بسیار اندکی که در خصوص سنتز نانوذرات فلزی با این میکروارگانیزم‌ها انجام شده است، بنابراین در تحقیق حاضر توانایی سوبه‌های 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 نانوذرات اکساید جست و بررسی خواص ذاتی آن به عنوان عوامل ضد باکتریایی مورد توجه قرار گرفته است.

2- مواد و روش‌ها

2-1 سویه‌های مورد بررسی

در این پژوهش در گام اول تعداد 44 سویه مقاوم به سرما جداسازی شده از ارتفاعات زاگرس واقع در استان لرستان و برخی سویه‌های *Streptomyces* جداسازی شده از دریای عمان خالص‌سازی شدند. سپس توانایی آنها در تولید نانوذرات اکساید جست مورد بررسی قرار گرفت.

2-2 تعیین حداکثر غلظت کشندگی (MTC)

ابتدا محیط کشت جامد (TSB) را به مقدار 200 ml با غلظت‌های مختلف (2/5، 5، 10، 25 و 50 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 24 ساعت در درجه‌حرارت $30^\circ C$ 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 μL از سوسپانسیون سویه‌های مورد بررسی (کشت 24 ساعته) با کدورتی معادل 0/5 مک‌فارلند روی هر کدام از تقسیمات پلیت‌ها تلقیح شد. تمامی پلیت‌ها به مدت 48 ساعت در درجه‌حرارت $20^\circ C$ و $30^\circ C$ گرمخانه‌گذاری شدند. غلظت بالایی از فلز که باکتری نتواند در آن رشد کند به عنوان MTC معرفی گردید و بدین ترتیب سویه‌های مقاوم و کارآمد در احیاء کاتیون‌های جست (Zn^{+}) شناسایی شدند (Shakya و همکاران، 2012).

2-3 استحصال، مشخصه‌یابی نانوذرات اکساید جست و شناسایی مالیکولی سویه تولیدکننده

هر یک از سویه‌های منتخب در 400 میلی لیتر محیط کشت مایع TSB تلقیح و به مدت 48 ساعت در شیکر انکوباتور $20^\circ C$ با دور 150 rpm گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از رشد و تکثیر سلول‌ها، روشناور حاصل^۲ به وسیله سانتریفیوژ با سرعت 10000 rpm به مدت 15 دقیقه جداسازی شد. روشناور حاصل با نمک‌های نایتрат و سولفات جست با غلظت 0/01 مولار به نسبت 1:1 اضافه شد. تمامی نمونه‌ها در اتوکلاو با حرارت $121^\circ C$ به مدت 15 دقیقه قرار داده شد و پس از 24 ساعت گرمخانه‌گذاری در درجه‌حرارت اتاق، نانوذرات تولید شده با سانتریفیوژ جدا گردید و پس از سه بار شست‌وشو با آب دیونیزه و اتانول در درجه‌حرارت $80^\circ C$ خشک گردید. به منظور حذف عوامل زیستی موجود بر روی سطح نانوذرات، نانوذرات تولید شده به مدت 4 ساعت در کوره $470^\circ C$ قرار داده شد (Ghanbari و همکاران، 2018). سپس سویه‌ای با بیشترین میزان تشکیل رسوب و تغییر رنگ سوپرناتانت، جهت خالص‌سازی و مشخصه‌یابی نانوذرات اکساید جست سنتز شده انتخاب گردید. نانوذرات خالص شده جهت اندازه‌گیری جذب نوری توسط اسپکتروفوتومتر UV-vis در دامنه 400-200 نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. همچنین مقداری از رسوب بدست‌آمده جهت آنالیز انکسار اشعه‌های ایکس^۳ (XRD)

¹ Maximum Tolerance Concentration

² Supernatant

³ X-Ray Diffraction(XRD)

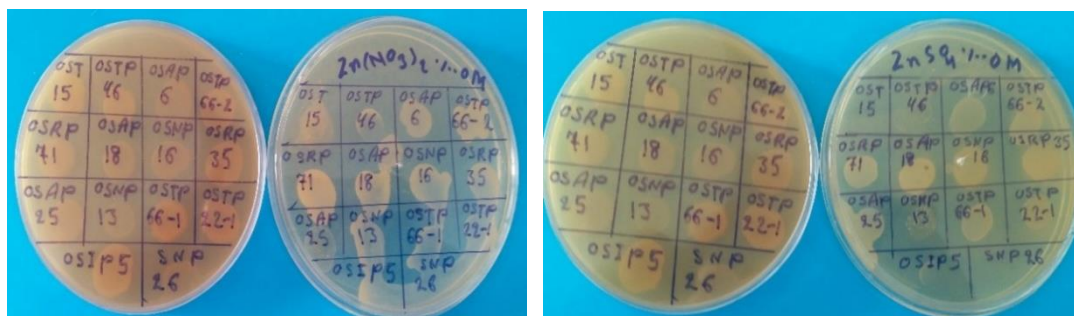
و پراکندگی نور دینامیکی¹ (DLS) استفاده شد. شناسایی مالیکولی سویه منتخب با تکثیر و توالی‌یابی ژن 16srRNA انجام شد.

2-4 سنجش فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات

برای مطالعه ضدباکتریایی نانوذرات اکساید جست، استوک 2000 میکروگرم / میلی‌لیتر از نانوذرات در سیترات آمونیوم به نسبت 2 به 1 و گلیسرول 40% پراکنده شد. باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* در محیط استریل MHB تلقیح و در درجه حرارت 37 °C به مدت 18 ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. در نهایت با استفاده از سرم فیزیولوژی (0.9% سودیم کلوراید) کدورت باکتری‌ها در نیم مک فارلند (جذب 0.08-0.13 در طول موج 630 نانومتر) تنظیم شد که در این حالت تعداد باکتری‌ها برابر با $1/5 \times 10^8$ CFU/ml است. فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات در غلظت‌های مختلف (4000 تا 125 میکروگرم / میلی‌لیتر) با استفاده از روش میکرودایلوشن² مورد استفاده قرار گرفت (Andrews و همکاران، 2001).

3- نتایج و بحث

میزان مقاومت 44 سویه مقاوم به سرما و *Streptomyces* به دو نمک سولفات جست و نیترات جست در غلظت‌های (2/5، 5، 10، 25 و 50 میلی‌مولار) مورد ارزیابی قرار داده شد. نتایج نشان داد تمام سویه‌ها توانایی مقاومت در غلظت‌های بالاتر از 5 میلی‌مولار را دارند. با توجه به نتایج اولیه کشت، دو سویه مقاوم به سرما و دو سویه *Streptomyces* انتخاب گردید. همچنین با در نظر داشت نتایج تست MTC میزان مقاومت این سویه‌ها به نمک سولفات جست بیشتر از نیترات جست بود و لذا از غلظت‌های 10 میلی‌مولار در لیتر سولفات جست برای تولید نانوذرات استفاده شد (شکل 1).

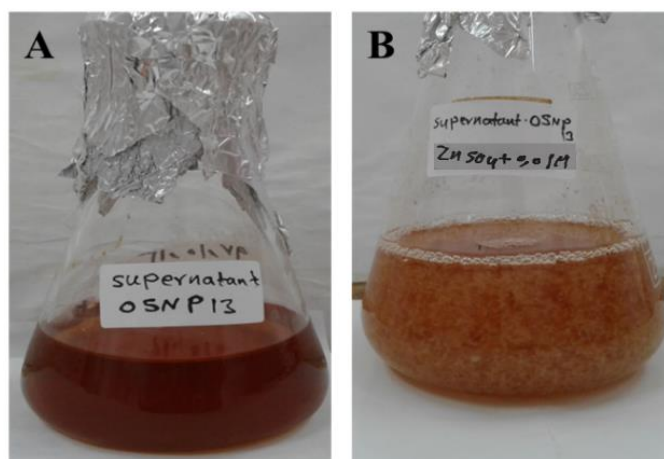


شکل 1: میزان مقاومت برخی از سویه‌ها به غلظت 5 میلی‌مولار نمک سولفات جست و نیترات جست.

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 حرارت‌دهی در اتوکلاو برای خالص‌سازی و تجزیه نانوذرات اکساید جست انتخاب شد (شکل 2).

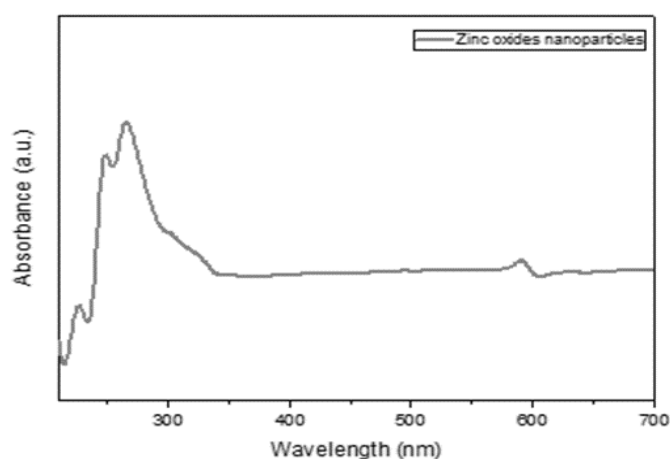
¹ Dynamic Light Scattering

² Micro dilution



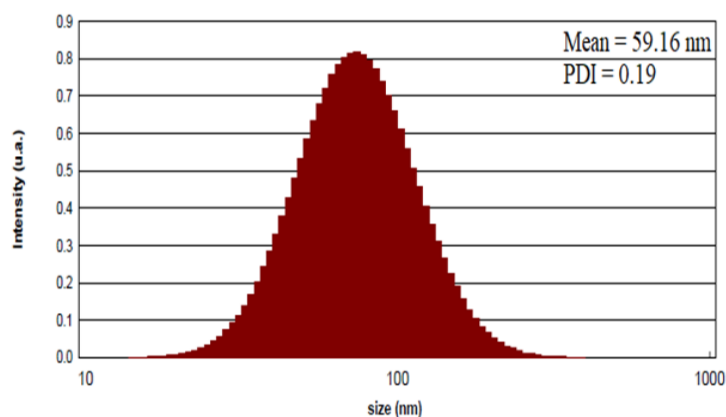
شکل 2: تولید نانوذرات اکساید جست با روش سوپرناتانت (روشناور) کشت میکروبی به همراه حرارت اتوکلاو. A و B به ترتیب، سوپرناتانت سویه OSNP13، سوپرناتانت پس از افزودن نمک سولفات جست و قرار گیری در اتوکلاو.

در این روش تولید نانوذرات به دلیل اینکه در شرایط اتوکلاو یا فشار و درجه حرارت بالا اعمال می گردد، یون های فلزی موجود در نمک های استفاده شده بیشتر در تماس گروه های عاملی و متابولیت های ثانویه موجود در سوپرناتانت کشت میکروبی قرار می گیرند و واکنش تولید نانوذرات یا هسته زایی با سرعت بیشتری انجام می شود. در بسیاری از مطالعات نقش با اهمیت آنزیم های وابسته به NADH در این انتقالات الکترونی ضمن تولید زیستی نانوذرات اشاره شده است. بنابراین گزارشی مبنی بر تولید نانوذرات اکساید جست توسط سویه های مقاوم به سرما با این روش موجود نمی باشد. قنبری و همکاران (2017)، با استفاده از سوپرناتانت *Aspergillus fumigatus* در شرایط اتوکلاو موفق به تولید نانوذرات نقره شدند. نتایج طیف سنجی UV-vis در شکل (3)، یک پیک مشخص بین 200 تا 400 نانومتر با حداکثر جذب در 269 نانومتر را نشان می دهد که بیانگر وجود نانوذرات اکساید جست در محلول تعامل است و ناشی از ویژگی رزونانس پلاسمون سطحی این نانوذرات می باشد.



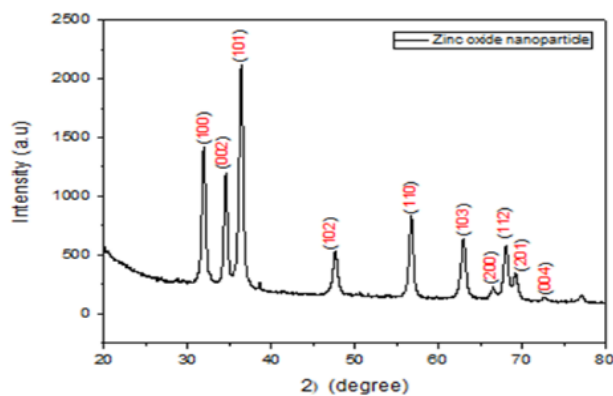
شکل 3: نمودار طیف سنجی UV-vis برای نانوذرات اکساید جست

پیک مشاهده شده برای نانوذرات اکساید جست با مطالعات Fooladsaz و همکاران در سال 2012 و Patil و همکاران در سال 2016 همخوانی دارد. نتایج حاصل از نمودار توزیع اندازه نانوذرات نشان داد که نانوذرات اکساید جست استحصال شده توسط *Microbacterium sp.* OSNP13 دارای اندازه متوسط 59/16 نانومتر می باشد. همانطور که در شکل (4) مشخص است، منحنی توزیع اندازه نانوذرات تقریباً زنگوله ای شکل است که نشان دهنده توزیع نسبت یکنواخت نانوذرات اکساید جست استحصال شده است. شاخص پراکندگی نانوذرات (PDI)، 0/19 ثبت گردید که بیانگر یکنواختی بالای محلول کلوئیدی نانوذرات استحصال شده در این مطالعه می باشد.



شکل 4: الگوی توزیع اندازه نانوذرات اکساید جست سنتز شده.

بر اساس منابع معتبر گزارش شده است که یک نمونه کلوئید یکنواخت نانوذرات که مونودیسپرسیته ذرات در آن بالا می باشد، دارای PDI بین 0/01 تا 0/7 است. نمونه های غیر یکنواخت و پلی دیسپرس PDI بالاتر از 0/7 تا 1 دارند که نمایانگر یک نمونه نامناسب است (Honary و همکاران، 2013). در مطالعه Ghorbani و همکاران در سال 2015، با توجه به نتایج حاصل از تکنیک DLS، متوسط اندازه ی نانوذرات اکساید جست تولید شده با روش هم رسوبی را 30 نانومتر گزارش کردند. این تفاوت در اوسط اندازه نانوذرات با مطالعه حاضر به دلیل روش تولید متفاوت نانوذرات در این دو پژوهش می باشد. به منظور تعیین نوع شبکه و اثبات ساختار بلوری نانوذرات اکساید جست از آنالیز XRD در زاویه 2 θ و محدوده اسکن 20 تا 80 درجه استفاده شد که دارای پیک های مشخصی در سطوح 100، 002، 101، 102، 110، 103، 200، 112، 201، 004 می باشد که نشان دهنده ساختار مونوکلینیکی نانوذرات اکساید جست بوده و با الگوی استاندارد¹ 043-0002 کاملاً مطابقت دارد (شکل 5) (Shatnawi و همکاران، 2016).



شکل 5: آنالیز انکسار اشعه ایکس نانوذرات اکساید جست.

¹ JCPDS File

الگوی مشاهده شده برای نانوذرات اکساید جست در مطالعات Raoufi و همکاران در سال 2013 و Anvekar و همکاران در سال 2017 با الگوی مشاهده شده در این مطالعه کاملاً تطابق دارد. طبق محاسبات انجام شده بر اساس معادله دبای-شرر، برای نانوذرات اکساید جست در زاویه 36/21 با صفحه کریستالی 101، اوسط اندازه نانوبلورکها 19/25 نانومتر محاسبه شد. نتایج این بخش با نتایج آنالیز DLS همخوانی دارد و نشان دهنده اندازه کوچکتر نانوذرات اکساید جست تولید شده می‌باشد. طی مطالعات مختلف انجام شده، نانوذرات اکساید فلزی از جمله اکساید جست فعالیت ضد میکروبی خوبی را از خود نشان می‌دهند که عمدتاً به اندازه کوچکی که این نانوذرات دارند بستگی دارد. نانوذرات اکساید فلزی به سطح باکتری یا ناحیه هسته‌ای باکتریایی متصل شده و اثرات ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند. نانوذرات اکساید فلزی با عملکردهای مختلف مانند تولید گونه‌های فعال اکسیجن (ROS) به دیواره سلولی آسیب می‌رسانند. این نانوذرات به دیواره سلولی نفوذ کرده و موجب آسیب ساختاری به دیواره سلولی و مرگ سلول می‌شوند. طی تخریب دیواره، محتوای سلولی به خارج ترشح می‌شود که با بیان جن‌های استرس اکسیداتیو همراه بوده که در نتیجه سبب مهار رشد سلولی و مرگ سلولی می‌شوند (Sirelkhatim و همکاران، 2015).

در خصوص شناسایی مالیکولی سویه تولید کننده نانوذرات اکساید جست نیز به دنبال تعیین توالی جن 16SrRNA و مطابقت نتایج حاصل با پایگاه‌های اطلاعاتی EZTaxon و NCBI، سویه *Microbacterium* sp. OSNP13 با 100% شباهت متعلق به جنس *Microbacterium* می‌باشد. در ادامه فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات 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 پاتوجن‌های گرم منفی و مثبت در محدوده غلظت‌های 4000 تا 125 میکروگرم / میلی‌لیتر با روش برات میکروداپلوشن مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر (MIC¹) و (MBC²) نانوذرات اکساید جست برای دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* به ترتیب 500 و 1000 میکروگرم / میلی‌لیتر محاسبه شد (جدول 1).

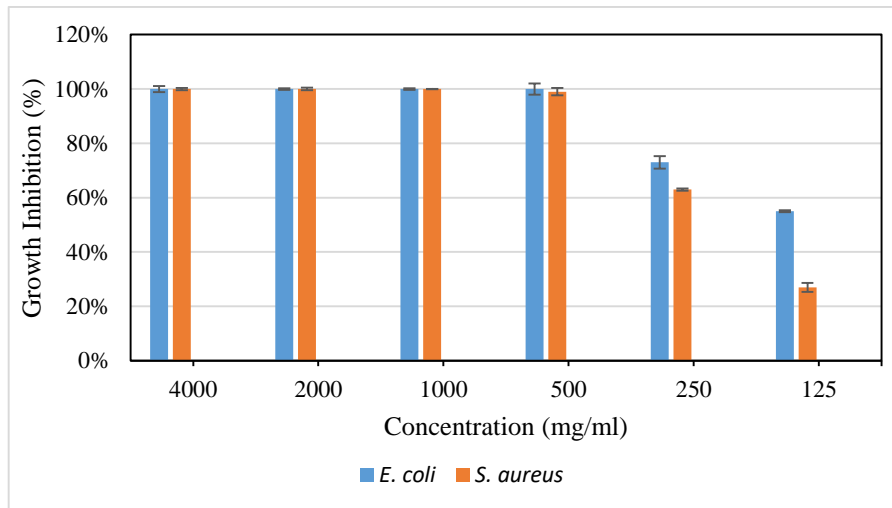
جدول 1: مقادیر MIC و MBC نانوذرات اکساید جست.

نانوذرات	باکتری	MIC(μg/ml)	MBC(μg/ml)
ZnO NPs	<i>E. coli</i>	500	1000
	<i>S. aureus</i>	500	1000

شکل (6) درصد مهار رشد باکتری‌های پاتوژن را توسط نانوذرات اکساید جست نشان می‌دهد. هر چند در غلظت‌های بالاتر اثر مهارکنندگی رشد اختلاف معنی‌داری را بین دو سویه پاتوژن نشان نداد، ولی در غلظت‌های 125 اثر مهارکنندگی نانوذره اکساید جست روی باکتری *E. coli* به صورت معنی‌داری بیشتر بود.

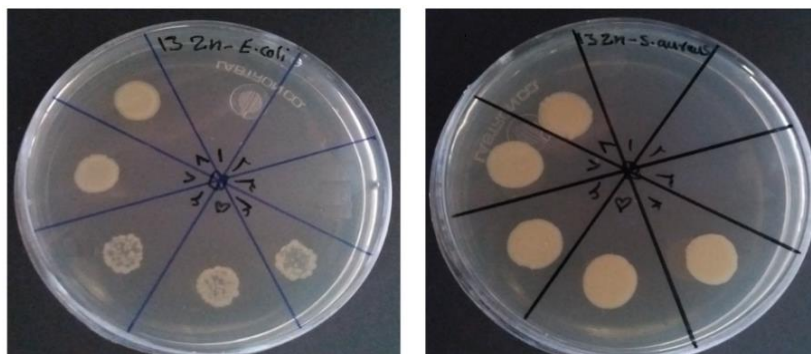
¹ Minimum Inhibitory Concentration

² Minimum Bactericidal Concentration



شکل 6: 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 7).



شکل 6: نتایج آزمون MBC برای نانوذرات اکساید جست پس از 18 ساعت گرمخانه‌گذاری

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

Şahin و همکاران در سال 2017، مقدار MIC نانوذرات اکساید جست تولید شده در مطالعات خود را بر روی باکتری *E. coli* ATCC 25922 برابر با 512 میکروگرم/ میلی لیتر گزارش کردند که از مقادیر محاسبه شده برای نانوذرات این تحقیق بیشتر بوده است. Siddique و همکاران نیز در سال 2013، مقادیر MIC نانوذرات اکساید جست را برای دو باکتری *E. coli* و *S. aureus* به ترتیب 21 و 8 میلی مولار گزارش دادند (هر میلی مولار معادل 72 میکروگرم/ میلی لیتر بوده است) که در مقایسه با نتایج حاصل از این تحقیق نانوذرات تولید شده خواص ضد میکروبی کمتری از خود نشان داده اند. البته در مقام مقایسه نانوذرات مورد استفاده در این تحقیق اثر مهارکنندگی و کشندگی مناسب را نسبت مطالعات گذشته از خود نشان داده است.

4- نتیجه گیری

در این تحقیق از توانایی باکتری‌های مقاوم به سرما در سنتز زیستی نانوذرات اکساید جست استفاده گردید. تولید نانوذرات اکساید جست توسط سویه منتخب *Microbacterium* sp.OSNP13 با استفاده از روش سوپرناتانت کشت میکروبی به همراه حرارت‌دهی در شرایط اتوکلاو مورد ارزیابی قرار داده شد. ساختار و مشخصات نانوذرات تولید شده با استفاده از آنالیزهای UV-Vis، XRD و DLS مشخصه‌یابی شدند. نتایج مشخصه‌یابی نشان دهنده صحت تولید این نانوذرات بوده است. با توجه به آنالیز DLS، اوسط اندازه نانوذرات اکساید جست تولید شده 59/16 نانومتر می‌باشد. همچنین شاخص پراکندگی (PDI) برای نانوذرات اکساید جست در pH فیزیولوژی 0/19 محاسبه گردید که نشان دهنده یکنواختی نسبتاً مناسب این نانوذرات می‌باشد. اندازه نانوبلورک‌ها نیز با استفاده از معادله دبای - شرر محاسبه گردید و معادل 19/25 نانومتر بدست آمد. نتایج این بخش با نتایج آنالیز DLS همخوانی دارد و نشان دهنده اندازه کوچکتر نانوذرات اکساید جست تولید شده می‌باشد.

اثر ضد میکروبی نانوذرات اکساید جست بر روی دو باکتری *S. aureus* و *E. coli* مورد بررسی قرار گرفت. MIC نانوذرات اکساید جست برای دو باکتری *S. aureus* و *E. coli* برابر با 500 میکروگرم/ میلی لیتر محاسبه شد. همچنین مقدار MBC نانوذرات اکساید جست برای دو باکتری *S. aureus* و *E. coli* 1000 میکروگرم/ میلی لیتر محاسبه شد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، مشخص شد سویه *Microbacterium* sp.OSNP13 توانایی بالایی در تولید نانوذرات اکساید جست داشته و می‌تواند به عنوان یک سامانه زیستی برای تولید نانوذرات از آن بهره برد. نانوذرات تولید شده در این تحقیق می‌تواند به عنوان یک عاملی ضد میکروبی مناسب در بسیاری از حوزه‌های مختلف از جمله تجهیزات طبی، سطوح آنتی باکتریال و غیره مورد استفاده قرار داده شوند.

5-References

1. Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 5-16.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Padmavathy, N., & Vijayaraghavan, R. (2008). Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Science and technology of advanced materials*.
14. 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.
15. Raoufi, D. (2013). Synthesis and microstructural properties of ZnO nanoparticles prepared by precipitation method. *Renewable Energy*, 50, 932-937.

- 16 . 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.
17. 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.
18. 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.
- 19 . 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).
20. 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.
21. Zhang, L., Ding, Y., Povey, M., & York, D. (2008). ZnO nanofluids—A potential antibacterial agent. *Progress in Natural Science*, *18*(8), 939-944.