مقاله پژوهشی

سنتز و شناسایی نانوکامپوزیت گرافن-نانوذرات ZnO و کاربرد آن برای فعالیت‌های ضد باکتری

سولماز عبداللهی[۱]، افشین پوراحمد[۱*]، لیلا اسدپور[۲]

۱- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۵/۳۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۲/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: بررسی اثر ضد باکتری نانومواد به دلیل افزایش مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها اهمیت پیدا کرده است. مواد ضد باکتری معدنی نسبت به مواد آلی که معمولاً استفاده می‌شوند دارای مزایای متعددی مانند پایداری شیمیایی، مقاومت حرارتی، ایمنی برای کاربر و فعالیت طولانی‌مدت دوره هستند. در این تحقیق، خواص ضد باکتری نانوکامپوزیت گرافن - نانوذرات اکسید روی برای باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) و گرم منفی (*اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا*) موردبررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر، طراحی همگن نانوذرات اکسید روی بر سطح گرافن با روش شیمیایی ساده را نشان می‌دهد. فعالیت ضد باکتری نانوذرات ZnO به روش تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و انتشار از دیسک، در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* موردبررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج XRD، پیک‌های پراش برای هر دو ترکیب را در نانوکامپوزیت نشان می‌دهد. مطالعات D نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید روی سنتز شده دارای ساختار ورتزیت هگزوگونالی است و نشان داد که اکسید گرافن باعث کاهش اندازه ذرات می‌شود. میانگین اندازه نانوذرات اکسید روی با میکروسکوپ الکترونی عبوری حدود ۲۰ nm تخمین زده شد. نانوذرات اکسید روی اثرات ضد باکتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را نشان دادند. افزایش سطح در نانوذرات اکسید روی نسبت به میکروذرات موجب بهبود فعالیت ضد باکتری شده است.

نتیجه‌گیری: نانوکامپوزیت جدید دارای فعالیت ضد باکتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*) و باکتری‌های گرم منفی (*E.Coli*) و (*Pseudomonas aeruginosa*) است.

کلمات کلیدی: اکسید گرافن، نانوذرات ZnO، نانوکامپوزیت، فعالیت ضد باکتریال

مقدمه

نانوتکنولوژی محدوده‌ای از تکنولوژی است که در این محدوده انسان می‌تواند انواع ترکیبات، آلیاژها، وسایل و ابزارها و به‌طورکلی، سیستم‌ها و سازه‌های گوناگون را در مقیاس اتمی و مولکولی و ابعاد نانومتری (یک میلیاردم متر) طراحی کرده و به مرحله ساخت برساند. آنتی‌بیوتیک‌ها در مراقبت‌های بهداشتی به‌طور گسترده‌ای مورداستفاده قرار می‌گیرند که به‌موجب آن پاتوژن‌ها در حال تبدیل‌شدن 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 (۱ و ۲). برای پاسخگویی به تقاضای روزافزون برای تهیه عوامل ضد باکتری کاراتر، چندین نانومواد تولید شده است. بااین‌حال، بسیاری از نانومواد ضد میکروبی که تاکنون گزارش‌شده‌اند با نگرانی در مورد مسمومیت، آلودگی محیط‌زیست، ناسازگاری بیولوژیکی و روش سنتز پیچیده همراه هستند (۳). درنتیجه همچنان یک چالش برای تولید نانومواد ضد باکتری کارآمد، جدید و دوستدار محیط‌زیست وجود دارد. اکسید روی یک

*نویسنده مسئول: **افشین پوراحمد**، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
Email: pourahmad@iaurasht.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-2007-89919

اکسید نیمه‌هادی بلوری با شکاف انرژی مستقیم برابر ۳/۳۷ eV است. ساختار بلوری مهم ZnO نوع ورتزیت آن است ولی به شکل ساختار بلاند روی هم وجود دارد. اکسید روی 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 ZnO و سازگاری آن باپوست انسان آن را به یک افزودنی مناسب برای منسوجات و سطوحی که در تماس با بدن انسان است تبدیل کرده است (۴). نانوذرات ZnO 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 (۵). فعالیت‌های ضد میکروبی نانوذرات ZnO نسبت به میکروذرات به دلیل افزایش سطح نانوذرات بهبود یافته است و هرچه اندازه ذرات کوچک‌تر باشد خاصیت ضد میکروبی افزایش می‌یابد (۶). به‌طورکلی، ZnO توانایی باکتری را کاهش می‌دهد؛ بااین‌حال تاکنون مکانیسم فعالیت ضد میکروبی آن به‌خوبی شناخته نشده است. پیشنهادشده است عامل اصلی فعالیت‌های ضد میکروبی می‌تواند تولید پراکسید هیدروژن باشد. همچنین تجمع ذرات روی سطح باکتری به دلیل نیروی الکترواستاتیکی می‌تواند مکانیسم دیگر اثر ضد میکروبی نانوذره ZnO باشد (۷). بااین‌حال گونه‌های واکنشگر اکسیژن تولیدشده روی سطح ذرات، انتشار یون روی، اختلال در غشا و فرآیندهای غشایی و همچنین نانوذرات درونی می‌توانند از دلایل احتمالی آسیب سلولی باشد (۸). گرافن ورقه‌ای دوبعدی از اتم‌های کربن در یک پیکربندی شش‌ضلعی است که اتم‌ها با هیبرید sp^2 به هم متصل شده‌اند. در یک صفحه گرافن، هر اتم کربن با ۳ اتم کربن دیگر پیوند داده است و این سه پیوند در یک صفحه قرار دارند و زوایای بین آن‌ها با یکدیگر مساوی و برابر با ۱۲۰° است. گرافن به دلیل ساختار خود، در زمینه‌های زیادی ویژگی‌های بسیار منحصربه‌فردی را نشان می‌دهد. در این تحقیق اکسید روی در ماتریس گرافن سنتز گردید. نانوکامپوزیت گرافن - نانوذرات اکسید روی پس از سنتز و شناسایی برای بررسی اثر ضد میکروبی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

سنتز اکسید گرافن

اکسید گرافن از پودر گرافیت خالص از طریق روش Staudenmaier تهیه گردید. ۱ گرم پودر گرافیت را به همراه ml ۱۷ اسیدسولفوریک و ml ۹ اسید نیتریک دود کننده درون یک بالن ته صاف ریخته و در حمام آب یخ گذاشته تا خوب مخلوط گردد. ۱۱ گرم پتاسیم کلرات را به‌تدریج در طی ۱۵ دقیقه به مخلوط اضافه کرده و اجازه داده شد تا محلول حاصل در دمای اتاق به مدت ۹۶ ساعت هم زده شود. سپس مقداری آب تقطیرشده را به محتویات بالن اضافه کرده و سوسپانسیون حاصل صاف گردید. در مرحله‌ی بعد ماده صاف‌شده با ml ۱۰۰۰ هیدروکلریک اسید ۵٪، متانول، دی اتیل اتر به ترتیب شستشو داده تا pH محلول زیر صافی به حالت خنثی برسد. پس از خشک شدن ماده صاف‌شده (اکسید گرافیت) مقداری از آن به مدت یک ساعت در حمام التراسونیک باقدرت ۲۴۰ وات قرار داده شد تا اکسید گرافن به دست آمد.

سنتز نانوکامپوزت گرافن – نانوذرات اکسید روی

۲۱/۹۴۹ گرم استات روی را به همراه آب مقطر درون یک بشر ۱۵۰ میلی‌لیتری ریخته و توسط همزن شیشه‌ای هم زده تا استات روی کاملاً در آب مقطر حل گردید. در ادامه، ۰/۰۲۵ گرم اکسید گرافن و ml ۱۰۰ آب مقطر در بالن ml ۲۵۰ ریخته و برای نیم ساعت تحت التراسونیک قرار داده شد. سپس استات روی به آن اضافه شد و به مدت ۵ ساعت رفلاکس گردید. در مرحله بعد ماده به‌وسیله سانتریفوژ صاف‌شده و چند بار با آب مقطر شستشو داده شد. سپس بعد از خشک شدن ماده صاف‌شده سه ساعت در خلأ 10^{-3} مگاپاسکال در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و به این روش نانوکامپوزیت گرافن-اکسید روی تهیه گردید.

تعیین حساسیت میکروبی به روش انتشار از دیسک

تهیه محیط کشت آگار مولر هینتون

۳۴ گرم از پودر محیط کشت آگار مولر هینتون در یک لیتر آب مقطر حل و با حرارت دادن شفاف گردید. سپس محیط در اتوکلاو استریل شد و در زیر هود میکروبیولوژی در پلیت‌های استریل ریخته شد و ۲۰-۱۵ دقیقه زمان داده شد تا محیط به حالت‌جامد تبدیل گردد.

تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند

به‌منظور تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید باریم ($BaCl_2$) ۰/۱٪ مولار به همراه ۹۹/۵ میلی‌لیتر از اسیدسولفوریک ۱٪ تهیه شد. سپس در لوله‌آزمایش، ۱۰ میلی لیتر از اسیدی را که تهیه شده بود ریخته و ۵۰ میکرولیتر از آن خارج و ۵۰ میکرولیتر از کلرید باریم به آن اضافه شد. جذب

نوری محلول تهیه شده در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. سپس در لوله خشک و تمیز ریخته در لوله کاملاً مسدود گردید نهایتاً در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

ابتدا در دو لوله‌آزمایش، هرکدام ۴ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته و استریل گردید. سپس کلنی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از نمونه‌های بالینی در لوله‌های جداگانه تلقیح شد تا کدورتی مشابه ۰/۵ مک‌فارلند داشته باشند.

تلقیح سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت

پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، یک سواپ استریل آغشته به سوسپانسیون میکروبی گردید و پس از گرفتن مایع اضافی آن توسط فشار دادن سواپ به دیواره داخلی لوله، سواپ مرطوب در سطح محیط مولر هینتون آگاری که قبلاً به دمای اتاق رسیده بود به‌طور یکنواخت کشت پر داده شد.

قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی

۱۵ دقیقه قبل از شروع این مرحله از آزمایش دیسک‌های آنتی‌بیوتیک متی‌سیلین، ونکومایسین، آموکسی‌سیلین، اریترومایسین، استرپتومایسین، تتراسیکلین، سفکسیم از یخچال خارج گردید تا دمای آن‌ها به دمای اتاق برسد. دیسک های آنتی‌بیوتیک توسط پنس استریل و سرد شده، برداشته و در سطح پلیت قرار داده شدند. با پنس دیسک مختصری فشار داده شد تا کاملاً با سطح محیط کشت تماس یابد. دیسک ها بافاصله ۲۰ میلی‌متر از لبه پلیت و ۲۰ میلی‌متر از دیسک‌های دیگر قرار داده شد سپس کشت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد اندازه گرفته شد.

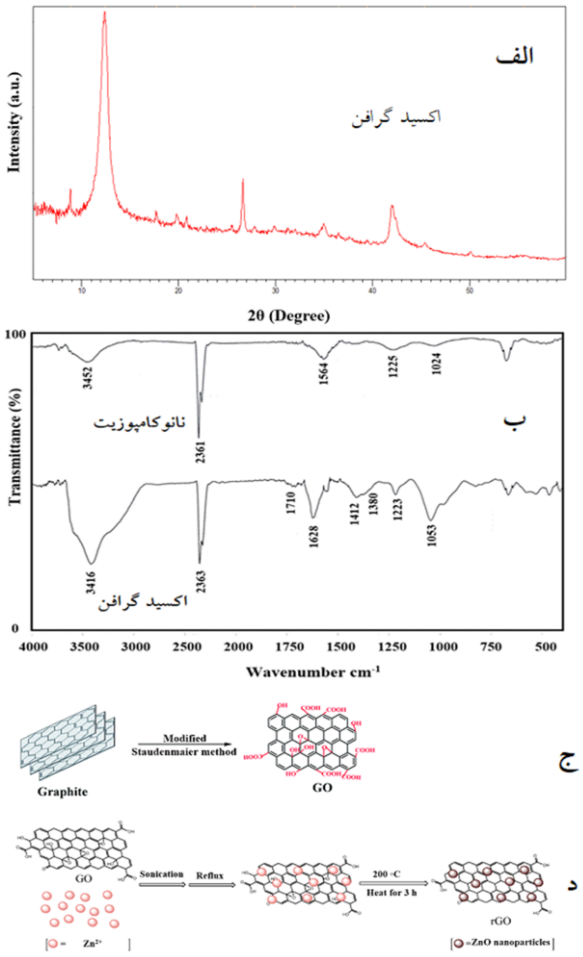
تعیین اثر ضد میکروبی اکسید گرافن و نانوکامپوزیت گرافن-نانوذرات اکسید روی

پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، یک سواب استریل آغشته به سوسپانسیون میکروبی گردید. پس از گرفتن مایع اضافی آن، سواپ مرطوب در سطح محیط مولر هینتون آگاری که قبلاً به دمای اتاق رسید بود پخش گردید. دیسک‌های تهیه‌شده حاوی غلظت‌های مختلف اکسید گرافن و نانوکامپوزیت بر روی این کشت میکروبی گذاشته شدند. سپس پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. درنهایت قطر هاله‌های عدم رشد باکتری در اطراف هر دیسک اندازه‌گیری شد و کم‌ترین غلظت اکسید گرافن و نانوکامپوزیت که منجر به تشکیل هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک گردید به‌عنوان کم‌ترین غلظت مهارکننده رشد باکتری (MIC) در نظر گرفته شد.

نتایج

شناسایی اکسید گرافن و نانوکامپوزیت گرافن-نانوذرات اکسید روی

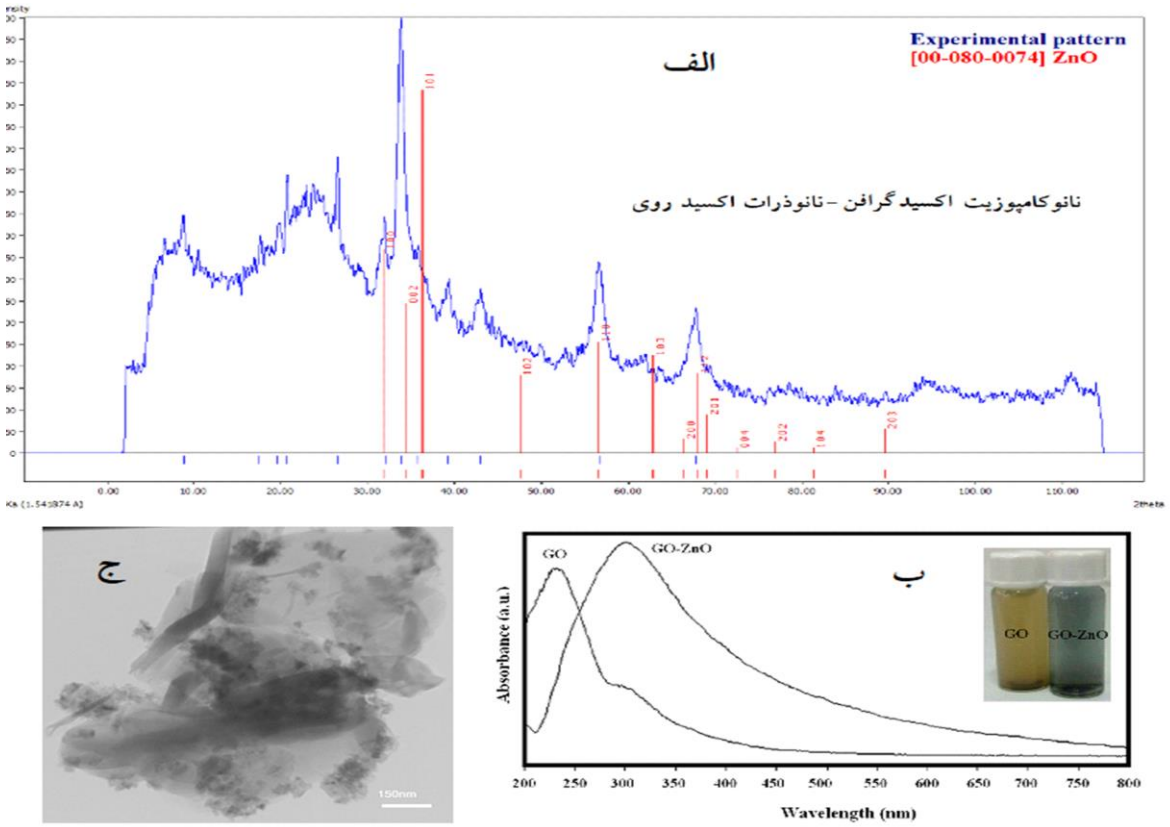
الگوی پراش اشعه ایکس اکسید گرافن، طیف FTIR اکسید گرافن و نانوکامپوزیت، شماتیک تبدیل گرافیت به اکسید گرافن و سنتز نانوذرات ZnO و تبدیل اکسید گرافن به گرافن در شکل ۱ ارائه گردیده است.



شکل۱- الگوی پراش اشعه ایکس اکسید گرافن (الف)، طیف FTIR اکسید گرافن و نانوکامپوزیت (ب)، شماتیک تبدیل گرافیت به اکسید گرافن (ج) و سنتز نانوذرات ZnO و تبدیل اکسید گرافن به گرافن (د)

الگوی پراش اشعه ایکس ترکیب نانوکامپوزیت، طیف جذبی - فرابنفش اکسید گرافن و نانوکامپوزیت و همچنین تصویر TEM نانوکامپوزیت در شکل ۲ ارائه شده است.

طیف *EDX* نانولایه‌های اکسید گرافن و نانوکامپوزیت همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی اکسید گرافن و نانوکامپوزیت در شکل۳ مشاهده می‌گردد.



شکل ۲- الگوی XRD نانو کامپوزیت (الف)، طیف .UV-vis اکسید گرافن و نانوکامپوزیت (ب) و تصویر TEM نانوکامپوزیت

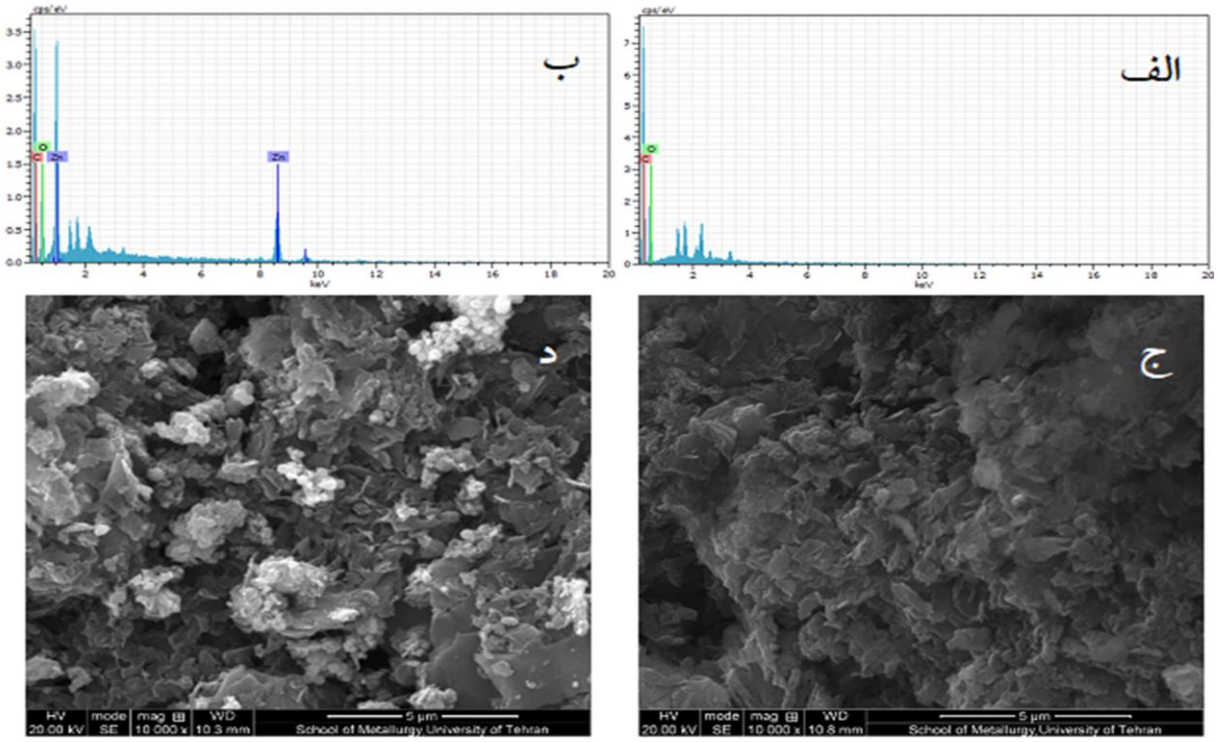
جدول ۱- مقایسه اثر ضد میکروبی ZnO، GO و نانوکامپوزیت در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد

	قطر هاله عدم رشد (mm)		
ماده ضد میکروبی	***استافیلوکوکوس اورئوس***	***اشرشیاکلی***	***سودوموناس ائروژینوزا***
ونکومایسین	۱۲	-	-
متی سیلین	۰	-	-
آموکسی سیلسین	۰	۰	۰
اریترومایسین	۱۶	۱۴	۱۲
سفکسیم	۱۴	۱۵	۱۶
تتراسیکیلین	۰	۰	۰
ZnO (۸۰ µg)	۶	۷	۵
GO (۸۰ µg)	۰	۰	۰
نانوکامپوزیت (۴۵ µg)	۹	۱۱	۹

بررسی اثر ضد میکروبی ZnO، GO و نانوکامپوزیت

اثر ضد باکتری نانوکامپوزیت بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* در شکل ۴ ارائه گردیده است.

اکسایش بر روی ترکیب گرافیت در این الگوی پراش پیک تیز مربوط به گرافیت در ۲θ = ۲۶/۳° بسیار ضعیف است که نشان می‌دهد ترکیب گرافیت به‌خوبی به اکسید گرافن (GO) تبدیل شده است. پیک تیز و با شدت بسیار بالا در ناحیه ۲θ = ۱۲/۴° و پیک ضعیف در ۲θ = ۴۱/۹° به ترتیب مربوط به صفحات (۰۰۲) و (۱۰۰) ترکیب اکسید گرافن در شکل ۱ (الف) ملاحظه می‌گردد (۹). انتقال پیک از ۲θ = ۲۶/۳° در ترکیب گرافیت به پیکی در ۲θ = ۱۲/۴° در ترکیب اکسید گرافن به علت حضور گروه‌های عاملی در لایه‌های گرافیت است که موجب می‌شود فاصله بین لایه‌ها افزایش پیدا کند. فاصله بین لایه‌های ترکیب



شکل ۳- طیف EDX نانولایه‌های اکسید گرافن (الف)، طیف EDX نانوکامپوزیت (ب)، تصاویر SEM اکسید گرافن (ج) و نانوکامپوزیت (د)



شکل ۴- اثر ضد باکتری نانوکامپوزیت بر روی الف) *استافیلوکوکوس اورئوس*، ب) *اشرشیاکلی*، ج) *سودوموناس آئروژینوزا*

برای مقایسه قطر هاله عدم رشد ایجادشده توسط برخی دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک به همراه اکسید روی، اکسید گرافن و نانوکامپوزیت در جدول ۱ مشاهده می‌گردد.

بحث

همان‌طور که در الگوی پراش اشعه ایکس ترکیب اکسید گرافن (GO) در شکل ۱ (الف) مشاهده می‌گردد پس از انجام فرایند

اکسید گرافن ۰/۷۱۳ نانومتر به دست آمد که در مقایسه با گرافیت (۰/۳۳۸ nm) می‌توان نتیجه گرفت که گروه‌های عاملی مبتنی بر اکسیژن بر سطح نانوصفحات گرافیت تشکیل شده است و به همین دلیل فاصله بین صفحات افزایش‌یافته است (۱۰).

طیف FT-IR گرافن اکسید و نانوکامپوزیت در شکل ۱ (ب) نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۱ (ب) ملاحظه می‌شود با انجام فرآیند اکسایش گرافیت پیک‌های ارتعاشی پیوندهای کربن- اکسیژن شامل گروه‌های کربوکسیل، اپوکسی، الکوکسی، کربونیل و هیدروکسیل در اکسید گرافن ظاهر شده است. پیک‌های جذبی در ناحیه $3416\ cm^{-1}$ مربوط به حرکات ارتعاشی کششی گروه O-H، در نواحی $1710\ cm^{-1}$ و ۱۳۸۰ مربوط حرکات ارتعاشی کششی C=O گروه‌های کربوکسیل و کربونیل است. نوار جذبی در ناحیه $1628\ cm^{-1}$ به حرکات ارتعاشی کششی گروه C=C آروماتیک و یا ارتعاشات خمشی گروه هیدروکسیل (O-H) مولکول‌های آب اختصاص دارد. ارتعاشات کششی C-O یا C-O-C اپوکسی و الکوکسی در cm^{-1} ۱۰۵۳ و ارتعاشات کششی C-OH در $1223\ cm^{-1}$ مشاهده می‌گردد. نوار جذبی در ناحیه $1412\ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاشات خمشی C-OH است. پیک مشاهده‌شده در ناحیه $2363\ cm^{-1}$ مربوط به CO_2 هوا است (۱۰).

با مقایسه طیف دو ترکیب اکسید گرافن و نانوکامپوزیت در شکل ۱ (ب) می‌توان مشاهده نمود که تعدادی از پیک‌های جذبی اصلی ترکیب اکسید گرافن در طیف نانوکامپوزیت سنتز شده مشاهده نمی‌گردد، تعدادی از پیک‌های جذبی شدت آن‌ها کاهش‌یافته و یا به انرژی‌های بالاتر و یا پایین‌تر انتقال‌یافته‌اند. پیک‌های جذبی در نواحی $1710\ cm^{-1}$ و ۱۳۸۰ مربوط حرکات ارتعاشی کششی C=O گروه‌های کربوکسیل و کربونیل و نوار جذبی در ناحیه $1412\ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاشات خمشی C-OH کاملاً ناپدید شده است. ارتعاشات کششی C-O یا C-O-C اپوکسی و الکوکسی در $1053\ cm^{-1}$، ارتعاشات کششی C-OH در $1223\ cm^{-1}$ و پیک‌های جذبی در ناحیه $3416\ cm^{-1}$ مربوط به حرکات ارتعاشی کششی گروه O-H به‌شدت کاهش‌یافته‌اند. با توجه به تغییرات مشاهده‌شده در طیف نانوکامپوزیت حذف باندهای ارتعاشی گروه‌های اکسیدی می‌توان نتیجه گرفت که با سنتز نانوذرات اکسید روی در نانولایه‌های اکسید گرافن، ترکیب اکسید گرافن کاهش‌یافته است و به ترکیب گرافن تبدیل‌شده است (۱۱). حضور باند جذبی در ناحیه $1564\ cm^{-1}$ نشان می‌دهد که ساختار اصلی ترکیب کربنی حفظ‌شده است و فقط ترکیب اکسید گرافن به گرافن کاهش‌یافته است (۱۲). تغییرات به وجود آمده در اکسید گرافن در هنگام سنتز نانوذرات اکسید روی را می‌توان در شکل ۱ (ج و د) مشاهده نمود.

الگوی پراش اشعه ایکس ترکیب نانوکامپوزیت در شکل ۲ (الف) ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد پیک تیز و با شدت بسیار بالا ترکیب اکسید گرافن در ناحیه $2\theta = 12/40^\circ$ مربوط به صفحه (۰۰۲) دیگر وجود ندارد و این پیک به‌صورت یک پیک نسبتاً پهن در $2\theta = 24^\circ$ دیده می‌شود. با توجه به مطالب ذکرشده می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب اکسید گرافن در هنگام سنتز نانوذرات اکسید روی کاهش‌یافته و گروه‌های عاملی آن تا حدود زیادی از بین رفته و به ترکیب گرافن تبدیل‌شده است. فاصله بین صفحات اکسید گرافن کاهش‌یافته بر طبق قانون براگ محاسبه شد که ۰/۳۷۱ نانومتر تعیین گردید که دلالت بر کاهش ترکیب GO و حذف تعداد زیادی از گروه‌های عاملی دارد. از طرف دیگر پیک نسبتاً پهن و ضعیف اکسید گرافن کاهش‌یافته در $2\theta = 24^\circ$ این حقیقت را آشکار می‌نماید که ترکیب تولیدشده دارای میزان بالایی از ورقه ورقه شدن است و تعداد بسیار کمی لایه در ورقه‌های ایجادشده وجود دارد (۹ و ۱۳).

از طرف دیگر در الگوی پراش اشعه ایکس ترکیب نانوکامپوزیت سنتز شده در شکل ۲ (الف) به‌خوبی می‌توان الگوی پراش نانوذرات اکسید روی را مشاهده نمود. با مقایسه الگوی پراش اشعه ایکس ترکیب سنتز شده با الگوی پراش استاندارد ZnO که در مراجع مختلف قابل‌بررسی است (۱۴ و ۱۵) و ازجمله الگوی پراش استاندارد (JCPDS Card No. 80-0074) رسم شده در شکل ۲ (الف) (خطوط قرمزرنگ) می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات اکسید روی با ساختار هگزاگونالی ورتزیت سنتز گردیده است. پیک‌های پراش در زوایای ۳۱/۹۰، ۳۳/۹۰، ۳۸۰، ۴۸۰، ۵۶/۹۰، ۶۳۰، ۶۸۰ و ۶۹/۱۰ مربوط به صفحات بلوری (۱۰۰)، (۰۰۲)، (۱۰۱)، (۱۰۲)، (۱۱۰)، (۱۰۳)، (۱۱۲) و (۲۰۱) نانوذرات اکسید روی است. به کمک معادله دبای- شرر اندازه ذرات اکسید روی ۲۲ نانومتر محاسبه گردید.

طیف جذبی - فرابنفش ترکیب اکسید گرافن و نانوکامپوزیت در شکل ۲ (ب) نمایش داده شده است.

در طیف اکسید گرافن یک پیک در طول‌موج ۲۳۲ nm مربوط به انتقالات $\pi \longrightarrow \pi^*$ پیوندهای C=C آروماتیک و یک شانه

طیفی در ۳۰۵-۲۹۵ nm مربوط به انتقالات $n \longrightarrow \pi^*$ پیوند C=O مشاهده می‌گردد (۱۶). پس از سنتز نانوذرات ZnO بر روی صفحات اکسید گرافن، پیک این ترکیب در طول‌موج ۲۳۲ nm با انتقال قرمز به سمت طول‌موج‌های بالاتر منتقل‌شده و شانه طیفی آن نیز ناپدید گردیده است. این موضوع با تغییر رنگ محلول GO از قهوه‌ای روشن به سیاه هماهنگ است و تائید می‌کند که با سنتز نانوذرات، اکسید گرافن به گرافن کاهش‌یافته است (۱۶ و ۱۷).

تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوکامپوزیت در شکل ۲ (ج) ارائه شده است. با توجه به مطالعات صورت گرفته در این خصوص توسط سایر محققین (۱۸)، لایه‌های شفاف و چین‌خورده که در تصویر TEM مشاهده می‌شود مربوط به اکسید گرافن است و نانوذرات اکسید روی با متوسط اندازه ۲۰ نانومتر بر روی این لایه‌ها تشکیل شده‌اند.

نتایج آنالیز عنصری EDX اکسید گرافن در شکل ۳ (الف) ارائه شده است. حضور کربن و اکسیژن در این ترکیب نشان می‌دهد که اکسید گرافن سنتز شده از درصد خلوص بالایی برخوردار است. نتایج آنالیز عنصری EDX نانوکامپوزیت در شکل ۳ (ب) ارائه شده است. حضور کربن، اکسیژن و روی در این ترکیب نشان می‌دهد که ترکیب سنتز شده از درصد خلوص بالایی برخوردار است.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی اکسید گرافن و نانوکامپوزیت در شکل ۳ (ج و د) ارائه شده است. در شکل ۳ (ج) تصویر SEM اکسید گرافن با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰۰ برابر مشاهده می‌گردد که در آن GO به‌صورت ساختارهای لایه‌ای با لبه نازک وجود دارند. تصویر SEM نانوکامپوزیت در شکل ۳ (د) ارائه شده است. در این تصویر با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰۰ برابر مشاهده می‌گردد که ترکیب اکسید گرافن همچنان ساختار لایه‌ای خود را حفظ کرده و در ضمن نانوذرات اکسید روی بر روی این صفحه‌ها تشکیل شده‌اند.

بررسی اثر ضد میکروبی ZnO، GO و نانوکامپوزیت

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های موردمطالعه نشان داد که سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، آموکسی‌سیلین و تتراسیکلین و حساس به ونکومایسین، اریترومایسین و سفکسیم بوده، *اشرشیاکلی* موردمطالعه مقاوم به آموکسی سیلین و تتراسیکلین و حساس به اریترومایسین، سفکسیم و سویه *سودوموناس آئروژیتوزا* مقاوم به آموکسی‌سیلین، تتراسیکلین و حساس به اریتومایسین و سفکسیم بود. GO بر هیچ‌کدام از باکتری‌های موردمطالعه اثر ضد ممانعت کننده رشد نداشت. در بررسی اثر ضد میکروبی نانوکامپوزیت به روش انتشار از دیسک هر سه باکتری، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از نمونه‌های بالینی به این ماده حساس بوده‌اند و در اطراف دیسک به ترتیب هاله عدم رشد باکتری به قطر *mm* ۹، *mm* ۱۱ و *mm* ۹ مشاهده گردید. حداقل غلظت مهارکننده رشد نانوکامپوزیت برای هر سه باکتری ۴۵ میکروگرم بود. نتایج بررسی اثر ضد میکروبی نانوکامپوزیت در شکل ۴ نشان داده شده است. برای مقایسه قطر هاله عدم رشد ایجادشده توسط برخی دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک به همراه اکسید روی، اکسید گرافن و نانوکامپوزیت در جدول ۱ ارائه شده است. نانوذرات اکسید روی در حضور بستر قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تری نسبت به نانوذرات اکسید روی بدون حضور بستر تشکیل داده‌اند که این نشان می‌دهد نانوذرات اکسید روی در حضور ماتریس خاصیت ضد باکتری بهتری نسبت به نانوذرات ZnO بدون حضور ماتریس دارند. این افزایش خصلت ضد باکتری را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که بستر کربنی نانوذرات اکسید روی را پایدار کرده و باعث می‌شود که رهاسازی یون توسط نانوذرات اکسید روی به محیط کشت به‌صورت کنترل‌شده، در مدت‌زمان بیشتر و با سرعت مشخصی آزاد شود و خاصیت ضد باکتری برای مدت‌زمان طولانی‌تری حفظ می‌شود به‌این‌ترتیب باکتری نمی‌تواند باگذشت زمان در برابر نمونه مقاومت پیدا کند و درنتیجه خاصیت ضد باکتری افزایش می‌یابد.

Eshed و همکاران پوششی از نانوذره اکسید روی و اکسید مس بر روی دندان درست کردند و نتایج تحقیق آن‌ها حاکی از آن بود که این پوشش ۹۰ تا ۵۰ درصد تشکیل بیوفیلم را کاهش می‌دهد و مکانیسم این پوشش را نفوذ در باکتری و تولید رادیکال اکسیژن داخل سلولی که موجب افزایش پراکسیداسیون چربی و درنتیجه مرگ سلول می‌شود، بیان کردند (۱۹). Akhil و همکاران فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نانوذره اکسید روی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* MTCC3160 و *سودوموناس آئروژینوزا* MTCC1688 را ارزیابی کردند. نتیجه پژوهش آن بود که این نانوذره، فعالیت ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی خوبی دارد (۲۰). تفاوت MIC در مطالعات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت در روش‌های آماده‌سازی نانوذره، اندازه و شکل نانوذره و

تفاوت در سوش‌های باکتری‌های موردمطالعه باشد (۲۱). حساسیت باکتری‌ها به نانوذرات فقط به ساختار دیواره سلولی مربوط نمی‌شود، بلکه ممکن است به پراکسیداسیون چربی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن نیز مربوط باشد. با توجه به حاصل‌ضرب حلالیت اکسید روی ($۳/۸ \times ۱۰^{-۱۰}$) انتشار یون روی، اختلال در غشا و فرآیندهای غشایی و همچنین با در نظر گرفتن اندازه نانومتری اکسید روی، نانوذرات درونی می‌توانند از دلایل احتمالی آسیب سلولی در باکتری باشد. به‌هرحال مکانیسم های دقیقی که به‌وسیله آن نانومواد رشد میکروبی را مهار می کنند، کاملاً درک نشده است. پژوهش‌های متعدد مکانیسم‌های احتمالی واکنش و فعل‌وانفعال‌های نانومواد با ماکرومولکول‌های بیولوژیکی را این‌طور پیشنهاد می‌کنند که نانومواد یون‌هایی را آزاد می‌کنند که با گروه تیول (-SH) 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. نانومواد این پروتئین ها را غیرفعال کرده، نفوذپذیری غشاء را کاهش داده و سرانجام باعث مرگ سلولی می‌شود (۲۲). نانومواد ممکن است بتوانند چسبندگی میکروبی و تشکیل بیوفیلم را کاهش دهند. نانوذرات اکسید روی باعث تخریب چربی و پروتئین غشای سلولی باکتری می‌شوند و درنتیجه باعث نشت محتویات داخل سلولی و درنهایت مرگ سلول‌های باکتری می‌شوند (۲۳). علاوه بر این، تولید پراکسید هیدروژن و یون Zn^{2+} به‌عنوان مکانیسم کلیدی اثرات ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی پیشنهاد شده است (۲۰).

نتیجه گیری

در این تحقیق، اکسید گرافن به روش استادنمیر سنتز شده و بر روی آن نانوذرات اکسید روی قرار داده شد. بررسی نتایج حاصل از طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز (FTIR)، پراش اشعه ایکس (XRD)، آنالیز عنصری (EDX) و طیف‌سنجی مرئی - فرابنفش (UV-Vis) تشکیل اکسید گرافن و حضور نانوذرات اکسید روی بر روی اکسید گرافن را تائید کرد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داد که اکسید گرافن به‌صورت ساختارهای لایه‌ای با لبه نازک وجود دارند و نانوذرات اکسید روی بر روی این صفحه‌ها تشکیل شده‌اند. همچنین در تصویر TEM لایه‌های شفاف و چین‌خورده مربوط به اکسید گرافن است و نانوذرات اکسید روی با اندازه متوسط ۲۰ نانومتر بر روی این لایه‌ها تشکیل شده‌اند. نانوکامپوزیت سنتز شده برای فعالیت‌های ضد میکروبی مورداستفاده قرار گرفت. در بررسی اثر ضد میکروبی نانوکامپوزیت به روش انتشار از دیسک هر سه باکتری، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از نمونه‌های بالینی به این ماده حساس بوده‌اند و در اطراف دیسک هاله عدم رشد باکتری مشاهده گردید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی و معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت و ستاد ویژه توسعه فناوری نانو معاونت علمی ریاست جمهوری تشکر و قدردانی می‌گردد. کد پژوهشی مربوط به این مقاله ۱۱۷۳۰۳۰۵۹۴۲۰۱ می‌باشد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1. Hu WB, Peng C, Luo WJ, Lv M, Li XM, Li D, et al. Graphene-Based Antibacterial Paper. ACS Nano. 2010; 4(7): 4317-4323.
2. Li Z, Zhang F, Meng A, Xie C, Xing J. ZnO/Ag micro/nanospheres with enhanced photocatalytic and antibacterial properties synthesized by a novel continuous synthesis method. RSC Adv. 2015; 5 (1): 612-620.
3. Musee N, Thwala M, Nota N. The antibacterial effects of engineered nanomaterials: implications for wastewater treatment plants. J Environ Monitor. 2011; 13 (5): 1164-1183.
4. Liu Q, Zhang M, Fang ZX, Rong XH. Effects of ZnO nanoparticles and microwave heating on the sterilization and product quality of vacuum packaged Caixin. J Sci Food Agric. 2014; 94(12): 2547–2554.
5. Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memic A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. Int J Nanomedicine. 2012; 7 (7): 6003–6009.
6. Padmavathy N, Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. Sci. Technol. Adv. Mater. 2008; 9(3): 1-7.
7. Zhang L, Ding Y, Povey M, York D. ZnO nanofluids—A potential antibacterial agent. Prog. Nat. Sci. 2008; 18(8): 939–944.

8. Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, Jimenez de Aberasturi D, Ruiz de Larramendi I, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. Trends Biotechnol. 2012; 30(10): 499–511.
9. Sarhangzadeh K. Application of multi wall carbon nanotube–graphene hybrid for voltammetric determination of naproxen. J. Iran. Chem. Soc. 2015; 12(12): 2133–2140.
10. Li XH, Feng J, Du YP, Bai JT, Fan HM, Zhang HL, et al. One-pot synthesis of CoFe2O4/graphene oxide hybrids and their conversion into FeCo/graphene hybrids for lightweight and highly efficient microwave absorber. J Mater Chem A. 2015; 3 (10): 5535–5546.
11. Ravichandran K, Chidhambaram N, Gobalakrishnan S. Copper and Graphene activated ZnO nanopowders for enhanced photocatalytic and antibacterial activities. J. Phys. Chem. Solids. 2016; 93 (6): 82–90.
12. He P, Wang W, Du L, Dong F, Deng Y, Zhang T. Zeolite A functionalized with copper nanoparticles and graphene oxide for simultaneous electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid. Anal. Chim. Acta. 2012; 739 (1): 25–30.
13. Larciprete R, Fabris S, Sun T, Lacovig P, Baraldi A, Lizzit S. Dual path mechanism in the thermal reduction of graphene oxide. J. Am. Chem. Soc. 2011; 133(43): 17315–17321.
14. Bera S, Pal M, Naskar A, Jana S. Hierarchically structured ZnO-graphene hollow microspheres towards effective reusable adsorbent for organic pollutant via photodegradation process. J. Alloys Compd. 2016; 669 (1):177–186.
15. Men X, Chen H, Chang K, Fang X, Wu CF, Qin W, et al. Three-dimensional free-standing ZnO/graphene composite foam forphotocurrent generation and photocatalytic activity. Appl. Catal. B. 2016; 187 (1): 367–374.
16. S. Ghasemi, S, Rahman Setayesh, A, Habibi-Yangjeh, M.R, Hormozi-Nezhad, M.R, Gholami. Assembly of CeO_2–TiO_2 nanoparticles prepared in room temperature ionic liquid on graphene nanosheets for photocatalytic degradation of pollutants. J. Hazard. Mater. 2012; 199–200 (1): 170–178.
17. Zhou Y, Bao Q, Tang LAL, Zhong Y, Loh KP. Hydrothermal Dehydration for the “Green” Reduction of Exfoliated Graphene Oxide to Graphene and Demonstration of Tunable Optical Limiting Properties. J. Am. Chem. Soc. 2009; 21(13): 2950–2956.
18. Tavakoli F, Salavati-Niasari M, badiei A, Mohandes F. Green synthesis and characterization of graphene nanosheets. Mater. Res. Bull. 2015; 63 (1): 51–57.
19. Eshed M, Lellouche J, Gedanken A, Banin E. A Zn-doped CuO nanocomposite shows enhanced antibiofilm and antibacterial activities against streptococcus mutans compared to nanosized CuO. Adv Funct Mater. 2014; 24(10):1382-90.
20. Akhil K, Jayakumar J, Gayathri G, Khan SS. Effect of various capping agents on photocatalytic, antibacterial and antibiofilm activities of ZnO nanoparticles. J Photoch Photobio B. 2016; 160 (1):32- 42.
21. Yousef JM, Danial EN. In vitro antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of zinc oxide and nano-particle zinc oxide against pathogenic strains. J Health Sci. 2012; 2(4):38-42.
22. Stoimenov P K, Klinger R L, Marchin G L, Klabunde K J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. Langmuir 2002; 18 (17): 6679-6686.
23. Liu Y, He L, Mustapha A, Li H. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7. J Appl Microbiol 2009;107: (4) 1193 –1201.

Original Article

Synthesis and Characterization of Graphene - ZnO NPs Nanocomposite and Its Application for Antibacterial Activities

Abdollahi S[1], Pourahmad A[1]*, Asadpour L[2]

1. Department of Chemistry, Faculty of Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Received: 22 Aug 2017 Accepted: 14 Mar 2018

Abstract

Background & Objective: The investigation of the antibacterial activity of nanomaterials has regained importance due to increasing bacterial resistance to antibiotics. Inorganic antibacterial materials have several advantages over traditionally used organic agents; like chemical stability, thermal resistance, safety to the user, long lasting action period, etc. In this research, antibacterial properties of graphene - zinc oxide nanoparticles nanocomposite was evaluated for gram-positive (*S. aureus*) and gram-negative (*E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria.

Material & Methods: The current study demonstrates homogenous decorating of zinc oxide nanoparticles (NPs) onto graphene oxide (GO) surface via simple chemical method.

Disk diffusion method and MIC were used to evaluate the antibacterial activity of ZnO nanoparticles on *S. aureus*, *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* compared to standard commercial antibiotic disks.

Results: XRD results revealed diffraction peaks for each of the two compounds in the nanocomposite. The XRD studies showed that the synthesized ZnO NPs have hexagonal wurtzite structure. It was found that GO addition induces a decrease in crystallite size. Average size of the ZnO NPs was estimated by transmission electron microscopy around 20 nm. ZnO nanoparticles showed bactericidal effects on Gram-positive and Gram-negative bacteria. The improved antibacterial activity of ZnO nanoparticles compared to its microparticles was related to the surface area enhancement in the nanoparticles.

Conclusions: The novel nanocomposite exhibits excellent antibacterial activity against gram-positive (*S. aureus*) and gram-negative (*E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria.

Keywords: Graphene oxide, ZnO nanoparticles, Nanocomposite, Antibacterial activity

***Corresponding Author: Afshin Pourahmad,** Department of Chemistry, Faculty of Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
Email: pourahmad@iaurasht.ac.ir
https://orcid.org/0000-0003-2007-89919