مقاله پژوهشی

سنتز نانو ذرات اکسید مس و بررسی خصوصیات باکتری کشی آن بر روی باکتری *آئروموناس هیدرو فیلا*

سیده فاطمه شفیعی[1*]، محمد احمدی[1]، سید رضا شفیعی[2]، مریم شاپوری[1]، حسین ورشویی[1]، فرشید آذری[3]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سواد کوه، گروه منابع طبیعی، سواد کوه، ایران.
۲- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر، قائمشهر، ایران.
۳- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سوادکوه، سوادکوه، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۰۷/۰۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: CuO یکی از مهمترین اکسیدهای فلزی واسطه است که دارای خصوصیات منحصر به فردی می‌باشد، در مصارف فناورانه مختلفی نظیر ابر رساناها، حسگرهای گازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اخیراً، CuO به عنوان یک عامل ضد میکروبی بر علیه گونه‌های باکتریایی متعددی استفاده شده است. در تحقیق حاضر نانو ذرات CuO را سنتز نموده و فعالیت ضد میکروبی آن مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها: نانو ذرات مس دارای اندازه تقریباً یکنواخت ۶-۵ nm مورد سنتز قرار گرفت. تکنیک مورد استفاده فاقد حلال‌های سمی آلی و آمین‌ها بوده و براساس واکنش ساده سولفات مس و آب دیونیزه انجام پذیرفته است. همچنین اثرات باکتری کشی نانو ذرات اکسید مس بر روی باکتری (ATCC 7966T Aeromonas hydrophila) مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) به وسیله‌ی روش نفوذ چاهی و محیط کشت مایع برای همه‌ی محیط‌های کشت حاوی *آئروموناس هیدروفیلا* تعیین شد.

نتایج: طیف XRD تشکیل نانو ذرات CuO تک فاز را مورد تأیید قرار می‌دهد. حداقل اندازه کریستال نانو ذرات CuO، ۶-۵ nm مشاهده شده، نتایج میکروسکوپ عبور الکترون، نتایج حاصل از طیف سنجی پرتو X- را تأیید می‌کند. نانو ذرات CuO اثرات بازدارندگی را بر علیه باکتری گرم منفی نشان داده‌اند.

نتیجه‌گیری: مطاله اخیر اثبات می‌کند که نانو ذرات اکسید مس دارای توانایی بالقوه‌ای به عنوان یک عامل ضد میکروبی بر علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* می‌باشد.

کلمات کلیدی: **نانو ذرات، *آئروموناس هیدروفیلا*، اکسید مس، فعالیت ضد میکروبی**

مقدمه

آئروموناده‌ای متحرک[1]، بسیاری از مهره داران، از جمله قورباغه‌ها، سوسمارها و انسان را آلوده می‌کنند. گزارش‌های مربوط به عفونت دستگاه گوارش و عمومی در انسان در حال افزایش است، اما همه جایی بودن این باکتری‌ها به همراه مواجه‌ی مکرر انسان با این عوامل بیماری‌زا نشان می‌دهد که ممکن است خطر عفونت مشترک بین ماهی و انسان نسبتاً پایین باشد. آئروموناس‌های متحرک عامل سپتی سمی هموراژیک در ماهیان آب شیرین از جمله آزاد ماهیان پرورشی عبارتند از: *آئروموناس هیدروفیلا*[2]، *آئروموناس کاویا*[3] و *آئروموناس ورونی بیوار سوربریا*[4] می‌باشد. از جمله مشخصات این ارگانیسم‌ها عبارتند از: ارگانیسم‌های بی هوازی اختیاری، گرم منفی، متحرک به واسطه‌ی تنها تاژک قطبی، میله‌ای با انتهای گرد تا کوکوئیدی، به صورت تک، دوتایی و یا زنجیره‌های کوتاه که در گسترش‌های رنگ آمیزی دیده می‌شود (۱). این باور که نانو تکنولوژی عصر دیگری از علوم

* **نویسنده مسئول: سیده فاطمه شفیعی**، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سواد کوه، گروه منابع طبیعی، سواد کوه، ایران. تلفن: ۰۹۳۷۰۰۱۶۰۴۹
Email: f.shaffiey@yahoo.in

1 - Motile aeromonad infection
2- *Aeromonas hydrophila*
3 - *A.caviae*
4 - *A. veronii bivar sorberia*

است و تلفیقی از مهندسی و زیست شناسی، شیمی، پزشکی و فیزیک می‌باشد را عموم دانشمندان پذیرفته‌اند (۲). بررسی‌ها نشان داده است که هر چه اندازه نانو ذرات کوچکتر باشد، خصوصیات و فعالیت‌های جدید و متفاوت‌تری از خود نشان می‌دهند. این ویژگی‌ها باعث شده است که امروزه سرعت استفاده از نانو مواد بسیار سریع گسترش یابد (۵-۳). تغییرات ضد میکروبی که از رشد باکتری‌های بیماری‌زا ممانعت می‌کنند، یک هدف مطلوب محسوب می‌شود. عوامل ایجاد کننده عفونت‌ها می‌توانند متعدد باشند. تشکیل کلنی، رشد سلول باکتری و تشکیل ماتریکس‌های بیوفیلمی فشرده میکروبی، باکتری‌ها را در مقابل سیستم دفاعی میزبان مقاوم می‌کند؛ که نانو ذرات از تشکیل این عوامل دفاعی میکروب در برابر سیستم ایمنی میزبان جلوگیری می‌کنند. نانو مواد اکسید فلزی، دارای فعالیت سلول کشی گسترده‌ای هستند که علیه باکتری، قارچ و ویروس فعالیت دارند. اکسید مس (CuO) به واسطه‌ی خواص قابل توجه یکی از مهمترین اکسیدهای فلزات واسطه می‌باشد. اکسید مس به عنوان یک عامل ضد میکروبی بر روی گونه‌های مختلف باکتریایی مورد استفاده قرار گرفته است (۹-۶). اگر چه تنها مطالعات اندکی درباره خواص ضد میکروبی اکسید مس(CuO) گزارش شده با این حال، این گزارشات نشان داده‌اند که نانو ذرات اکسید مس توانایی بالقوه‌ای به عنوان یک عامل ضد باکتریایی دارند (۱۰).

مواد و روش‌ها

مواد و سوش باکتری مورد بررسی:

برای این مطالعه سوش باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* ATCC 7966T استفاده گردید. جهت رشد محیط‌های کشت آگار مغذی (E. Merck Co; Darmstadt Germany) و پپتون واتر (E. Merck Co; Darmstadt Germany) مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه نانو ذرات:

روش سنتز: محلول آبی سولفات مس (۰/۱M) بوسیله‌ی آب دیونیزه تهیه گردید. سپس محلول غلیظ سود تا حد اشباع به محلول سولفات مس افزوده شد تا pH محلول به ۷ رسید. در این حالت مقدار رسوب تشکیل شده مجدداً شروع به حل شدن کرد که با افزایش pH به ۸ رسوب کاملاً آبی رنگ هیدروکسید مس $Cu(OH)_2$ تشکیل شد. دراین هنگام رسوب به دست آمده صاف گردید و برای از بین بردن ناخالصی‌ها ۴ مرتبه بوسیله‌ی آب دیونیزه مورد شستشو قرار گرفت. در ادامه رسوب $Cu(OH)_2$ حاصل به مدت ۱ ساعت در آون با دمای ۴۰۰°C قرار گرفت. و نهایتاً رسوب سیاه رنگ اکسید مس (CuO) تشکیل شد.

بررسی خصوصیات اکسید مس:

نانو ذرات CuO سنتز شده بوسیله‌ی روش پراش پرتو– X (XRD)، اسپکتروسکوپی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)، میکروسکوپ اسکن الکترونی (SEM) و میکروسکوپ عبور الکترون (TEM) مورد بررسی قرار گرفت. خاصیت کریستالی، ساختار و اندازه کریستال نانو ذرات CuO به وسیله تکنیک XRD با استفاده از Rigaku-Miniflex X-ray diffractometer (Rigaku Corporation, Tokyo, Japan) با تابش Cu-Kα (λ=0.15406 nm) در گستره 2θ از° 20 تا °80 تعیین شد. آنالیز SEM به وسیله‌ی سیستم (JEOL JSM5600) از شرکت (JEOL Ltd, Yokyo, Japan) صورت گرفت. طیف FTIR نمونه‌های به دست آمده بوسیله‌ی اسپکتروفتومتر FTIR (Perkin Elmer) از شرکت (Perkin Elmer Inc, Walthan, MA) به دست آمد. آنالیز TEM به وسیله میکروسکوپ عبور الکترون 200KVEOL (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) انجام شد.

بررسی غلظت بحرانی و تأثیر گذاری نانو ذرات:

روش‌های مختلفی برای تعیین حساسیت باکتری‌ها به نانو ذرات و آنتی بیوتیک‌ها وجود دارد، در این مطالعه از روش نفوذ چاهی[1] (ایجاد چاهک در پلیت) استفاده گردید (۱۱). در ابتدا باکتری (Aeromonas hydrophila ATCC 7966T) در محیط پپتون واتر کشت داده شد و با استفاده از محلول نیم مک فارلند و دستگاه اسپکتروفتومتر .UV/Vis محلول حاوی تعلیق باکتریایی به غلظت $1/5\times10^8$ cfu/ml در محیط پپتون واتر تهیه گردید. سپس، ۱۰۰µl از این تعلیق باکتریایی بر روی ۳ عدد پلیت محیط کشت نوترینت آگار آماده شده عاری از آلودگی تزریق شد و پس از پخش تعلیق باکتریایی به تمام سطح محیط کشت، محیط‌های کشت به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه به حال خود گذاشته شدند تا

[1] - Well diffiusion

باکتری‌ها جذب محیط کشت نوترینت آگار شوند. در ادامه ۴ چاهک به قطر ۸ mm درون محیط‌های کشت پانچ شدند. چاهک‌های ایجاد شده به وسیله‌ی ۱ml از نوترینت آگار مایع به منظور جلوگیری از نشت از انتهای پلیت نشت گیری شدند. در هر سه محیط کشت ۲ چاهک از ۴ چاهک، یکی به عنوان کنترل منفی و دیگری به عنوان کنترل مثبت قرار گرفت، که چاهک کنترل مثبت حاوی ۱۰۰µl محلول تتراسایکلین با غلظت ۷mg/L و چاهک کنترل منفی حاوی ۱۰۰µl آب مقطر بوده است. در دو چاهک باقیمانده از سه محیط کشت، در محیط کشت A درون چاهک یک ۱۰۰µl از محلول نانو ذرات ۲۰ درصد (۶۰ µg/ml) و چاهک دو ۱۰۰µl نانو ذرات ۴۰ درصد (۱۲۰ µg/ml) تزریق شد. در محیط کشت B نیز درون چاهک یک ۱۰۰µl محلول نانو ذرات ۶۰ درصد (۱۸۰ µg/ml) و در چاهک دو ۱۰۰µl از محلول نانو ذرات ۸۰ درصد (۲۴۰ µg/ml) تزریق گردید. در انتها در محیط کشت C در هر دو چاهک باقی مانده، ۱۰۰µl از محلول نانو ذرات ۱۰۰ درصد (۳۰۰ µg/ml) تزریق شد و هر سه محیط کشت (A, B, C) به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای C° ۲۴- ۲۲ قرار داده شدند تا مرحله‌ی انکوباسیون سپری شود. پس از گذشت ۲۴ ساعت، اندازه منطقه ممانعت از رشد، قطر هاله عدم رشد، به وسیله خط کش بر حسب میلی متر مورد بررسی قرار گرفت و میزان حساسیت باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* نسبت به غلظت‌های متفاوت نانو ذرات اکسید مس تعیین گردید. تمام مراحل فوق ۳ مرتبه تکرار شد و انحراف استاندارد نتایج مورد ارزیابی قرار گرفت ($P<۰/۰۴$).

بررسی سینتیک کشندگی نانو ذرات:

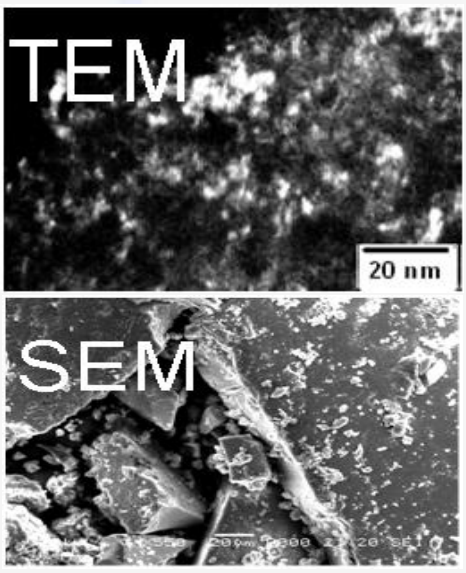
حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) بر اساس محیط‌های کشت مایع حاوی غلظت‌های متفاوت نانو ذرات اکسید مس به صورت ۰ – ۳۰۰ µg/ml مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور لوله‌های آزمایش استریل، هر کدام حاوی ۵۰ ml محلول پپتون واتر حاوی تعلیق باکتری با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu/ml تهیه شد. سپس مقادیر تعلیق کلوئیدی نانو ذرات اکسید مس با نسبت‌های ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰ و ۳۰۰ به لوله‌های آزمایش افزوده شد. به منظور جلوگیری از تجمع نانو ذرات و یکنواختی، ظروف حاوی محلول‌ها به وسیله‌ی شیکر یکنواخت شدند. در ادامه لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و در طی مدت انکوباسیون مراحل شیک کردن هر دو ساعت تکرار گردید. میزان کاهش غلظت باکتری (باکتری کشی) به صورت بررسی کاهش جذب در ۶۰۰ nm با استفاده از اسپکتروفتومتر (Thermo, M5, Germany) تعیین شد. آزمایش‌ها همچنین شامل یک کنترل مثبت (لوله حاوی نانو ذرات و محیط پپتون واتر) و کنترل منفی (لوله حاوی باکتری و محیط پپتون واتر) بوده است. کنترل منفی رشد باکتری و افزایش میزان جذب را در عدم حضور نانو ذرات نشان می‌دهد. مقادیر جذب برای کنترل مثبت از طریق مقادیر تجربی استخراج شدند. روند ذکر شده در بالا ۳ مرتبه تکرار گردید و انحراف استاندارد مقادیر مورد محاسبه قرار گرفت.

بررسی اثر اختلاط نانو ذرات اکسید مس و آنتی بیوتیک تتراسایکلین:

به منظور بررسی اثر اختلاط نانو ذرات اکسید مس و آنتی بیوتیک تتراسایکلین و خواص ضد میکروبی آن‌ها با نسبت‌های حجمی ۵۰ :۵۰ تهیه گردید که مطابق روش نفوذ چاهی میزان بازداری آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

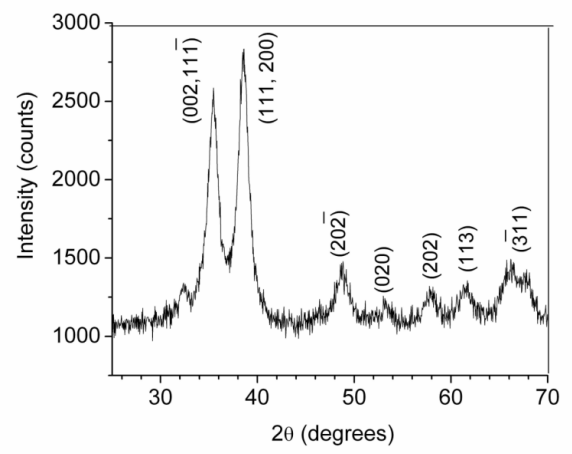
نتایج

به منظور بررسی مورفولوژی و قطر نانو ذرات و نسبت سطح به حجم این نانو ذرات تصاویر SEM و TEM این نانوذرات در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل ۱: تصاویر SEM و TEM نانو ذرات اکسید مس

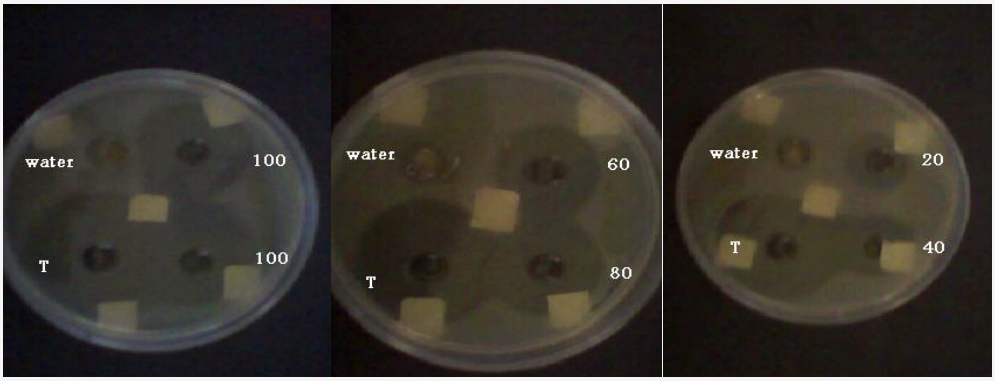
از روی تصاویر گرفته شده اثبات شد که نانو ذرات اکسید مس دارای قطر تقریبی ۶-۵ نانومتر می‌باشد. همچنین به منظور بررسی خلوص نانو ذرات تولید شده طیف پراش پرتو–X (XRD) مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۲: طیف پراش پرتو –X (XRD) نانو ذرات CuO

با افزایش درصد نانو ذرات و در پی آن غلظت آن‌ها، ناحیه بازداری گسترده تر شده و خاصیت ضد باکتریایی افزایش می‌یابد. در گستره ۸۰ تا ۱۰۰ درصد حجمی و درصد بازداری ثابت شده و نزدیک به ناحیه بازداری ایجاد شده توسط آنتی بیوتیک تتراساکلین می‌باشد، که بیانگر توانایی بسیار بالای نانو ذرات CuO برای باکتری کشی در برابر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* می‌باشد. از آنجایی که MIC با مقایسه ناحیه ممانعت با معیارهای MIC در جدول استاندارد تعیین می‌شود (۱۲)، و اندازه‌ی ناحیه ممانعت رشد تحت تاثیر فاکتورهایی نظیر میزان انتشار آنتی بیوتیک و میزان رشد ارگانسیم واقع می‌شود در خصوص آنتی بیوتیک تتراسایکلین که جز آنتی بیوتیک‌های گزینشی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* می‌باشد ناحیه ممانعت ۱۰mm شد، که با توجه به مقادیر گزارش شده این باکتری جز گونه‌های مقاوم طبقه بندی می‌شود. نواحی بازداری باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در غلظت‌های مختلف نانو ذرات CuO در شکل ۳ ارائه شده است. مقادیر حداقل غلظت بازداری (MIC) و باکتری کشی (MBC) نانو ذرات اکسید مس در جدول ۱ ارائه شده است.

همان طور که از مقادیر مشاهده می‌گردد در غلظت ۲۴۰µg/ml از نانو ذرات اکسید مس، میزان غلظت باکتریایی تا ۹۹/۹۹ درصد کاهش یافته است. قطر ناحیه بازداری، ممانعت از رشد، حاصل از ادغام نانو ذرات اکسید مس و آنتی بیوتیک تتراسایکلین ۱۲ میلی متر به دست آمد که افزایش قابل توجهی را در مقدار ناحیه بازداری از خود نشان می‌دهد که این بیانگر افزایش قدرت ضد باکتریایی ادغام نانو ذرات اکسید مس و آنتی بیوتیک تتراسایکلین می‌باشد.



شکل ۳: نواحی بازداری باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در غلظت‌های مختلف نانو ذرات CuO

بحث و نتیجه گیری

یکی از مهمترین زمینه‌های کاربرد نانو تکنولوژی که مزایای زیادی را برای بشریت در آینده فراهم می‌آورد در زمینه داروها می‌باشد (۱۳). همچنین توسعه‌های نانوتکنولوژیک علاقه زیادی را در زمینه میکروبیولوژی ایجاد کرده است، خصوصاً سنتز

جدول ۱: مقادیر حداقل غلظت بازداری (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) نانو ذرات CuO برای باکتری *آئرومونواس هیدروفیلا*

غلظت MBC (Log CFu/ml)	ناحیه بازداری MIC (mm)	غلظت نانو ذرات CuO (µg/ml)
۶/۷±۰/۰	۰	کنترل منفی (فاقد نانو ذرات CuO)
۶/۱±۰/۰	۳	۶۰
۴/۳±۰/۰	۵	۱۲۰
۲/۸±۰/۰	۶	۱۸۰
۱/۲±۰/۰	۸	۲۴۰
NCD	۸	۳۰۰

NCD: سلول باکتری قابل کشت یافت نشد.

داروها در ابعاد نانو با خواص فیزیکی و شیمیایی وابسته به هم که رویکرد مهمی برای مقابله با میکروب‌های عفونت زا می‌باشد (۱۴). درسال‌های اخیر، بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داده‌اند که برخی از داروها در فرم نانومتری دارای فعالیت ضد باکتریایی مؤثرتری هستند (۱۵). یون و همکاران (۱۶) اثرات ضد باکتریایی اکسید مس و نقره را برای *اشریشیاکلی* و *باسیلوس سابتیلیس* گزارش کردند، که نانو ذرات اکسید مس فعالیت ضدباکتریایی بیشتری در مقایسه با نانو ذرات نقره از خود نشان دادند. نانو ذرات اکسید مس و نقره نشانده شده روی مواد مناسب مختلف از قبیل کربن، فوم پلی اورتان، پلیمرها نیز به طور مؤثری برای کاربردهای ضد باکتریایی مناسب می‌باشند (۲۰-۱۷). امیر اعظم و همکاران در سال ۲۰۱۲ در تحقیقات خود بر روی نانو ذرات اکسید مس نشان دادند که نانو ذرات اکسید مس فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی را هم در مورد باکتری‌های گرم مثبت (*بی . ساب تیلیس و اس . آئورئوس*[1]) و هم باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیا کلی و پی . آئروگینوسا*[2]) از خود نشان می‌دهد. خواص ممانعت از رشد باکتری مشاهده شده در این مطالعه به اندازه نانو ذرات وابسته بودند. در این آزمایش‌ها، نانو ذرات اکسید فلزی خصوصاً مورد بررسی قرار گرفتند که مشاهده شد این دسته از مواد دارای پتانسیل بالقوه‌ای برای استفاده در کاربردهای ضد میکروبی می‌باشند. در این تحقیق، بر روی نانو ذرات اکسید مس (CuO) تمرکز گردید و خواص ضد میکروبی آن به عنوان یک داروی جایگزین جدید مورد بررسی قرارگرفت (۱۱). اطلاعات اندکی در مورد فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات CuO در دسترس است. CuO از ترکیبات نقره ارزانتر است و به آسانی با پلیمرها مخلوط می‌گردد و از لحاظ فیزیکی و شیمیایی نسبتاً پایداراست (۲۱). نانو ذرات به شدت یونی اکسید فلزی نظیر CuO، دارای پتانسیل لازم برای کاربرد به عنوان عوامل ضد میکروبی می‌باشند و می‌توانند با ناحیه سطحی بسیار وسیع و مورفولوژی‌های کریستالی مختلفی تهیه شوند (۲۲). روپارلیا و همکاران غلظت یون‌های آزاد شده برای ۱۰mg نانو ذرات مس معلق در ۱۰۰ml محیط نوترینت و آب مقطر را مورد بررسی قرار دادند (۲۳). آن‌ها دریافتند که غلظت یون های Cu^{2+} آزاد شده در محیط نوترینت بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون $17mgl^{-1}$ بود، در حالی که در آب مقطر تحت شرایط مشابه بعد از دوره ۲۴ ساعته غلظت یون‌های آزاد شده mgl^{-1} ۰/۵ بود. این نتایج نشان می‌دهد که محیط نوترینت می‌تواند آزاد شدن

[1] - *S. Aureus*
[2] - *P . aeruginosa*

یون‌های Cu^{2+} را تسهیل نماید. رهایش قابل توجه یون‌های Cu^{2+}در محیط نوترینت احتمالاً می‌تواند ناشی از برهمکنش یون‌های کلرید محیط با لایه اکسید سطح نانو ذرات باشد (۱۰). بر این اساس، اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات اکسید مس مشاهده شده در این تحقیق نیز ممکن است به واسطه‌ی رهایش یون‌های Cu^{2+} در محلول ایجاد شده باشد. حضور نانو ذرات در تعلیق می‌تواند رهایش پیوسته یون‌ها را به درون محیط نوترینت تضمین نماید. به علاوه حضور اتم‌های اکسیژن در ساختار نانو ذرات در پی رهایش یون‌های Cu^{2+} می‌تواند با تشکیل گونه‌های پر اکسید همراه باشد که این فاکتور نیز می‌تواند نقش مؤثری در فعالیت ضد باکتریایی به واسطه اثرات اکسیدی ایفا نماید.

یون‌های فلزات سنگین دارای اثرات متفاوتی بر روی عملکرد سلول باکتری می‌باشند. برای یون‌های Cu، مکانیزم می‌تواند شامل استرس‌های اکسیدی باشد (۱۰). چرخه ردوکس (اکسیداسیون و احیاء) یون‌های Cu در نتیجه کاهش گلوتاتیون و تأثیر بر گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها سبب تخریب DNA و اکسید شدن لیپیدها می‌شود (۲۴). اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات به غلظت نانو ذرات و غلظت ابتدایی باکتری وابسته است (۲۵). اکسی تتراسایکلین مانند تمامی اعضای گروه تتراسایکلین از طریق اتصال به واحد s۳۰ ریبوزوم و از طریق مهار سنتز پروتئین باکتری اثر می‌کند. بنابراین این دارو طبیعتاً باکتریو استاتیک است (۲۶). کمپلکس‌های تتراسایکلین با یون‌های فلزی در مطالعات بسیاری مورد بررسی قرار گرفته اند (۳۱-۲۷). تتراسایکلین آنتی بیوتیکی با گستره وسیع استفاده است که برای بیش از ۵۰ سال مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در این مطالعه مشاهده گردید که مخلوط نانو ذرات اکسید مس و آنتی بیوتیک تتراسایکلین نواحی ممانعت بزرگتری را در مقایسه با اکسید مس و همچنین آنتی بیوتیک تتراسایکلین به تنهایی ایجاد کرده‌اند که این بیانگر افزایش اثر و قدرت ضد میکروبی مخلوط فوق می‌باشد. دلیل روشنی برای این افزایش فعالیت به طور واضح در نوشتارها بیان نگردیده است، اما گمان بر این است که این حالت به واسطه ادغام اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات و آنتی بیوتیک و افزایش مکانیزم‌های اثر دارو باشد که در برابر باکتری‌های مقاوم به دارو مانع از سازگاری میکروارگانیسم می‌گردد (۳۲).

مکانیسم واکنش بین تتراسایکلین و اکسید مس به درستی روشن نشده است. از این رو، این تحقیق کاربرد این واکنش را مورد مطالعه قرار می‌دهد. با این وجود مشخص شده است که اولین گروه دهنده‌ای که با مس پیوند برقرار می‌کند اتم O3 است، که در pHهای نسبتاً پایین شروع به دپروتونه شدن می‌کند. زمانی که pH افزایش می‌یابد همان طور که گروه OH12 تفکیک می‌شود کیلیت شدن برای سیستم O 10 – O 12 رخ می‌دهد. دپروتونه شدن نهایی لیگاند در گروه C4 دی متیل آمونیوم، با تغییر جدید در وضعیت پیوند در مجموعه دهنده N4 – OH 12 منجر به تشکیل کیلیت می‌گردد (۳۳).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد سواد کوه به سبب در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی تشکر می گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Soltani M. Salmonid diseases. Tehran University Press; 2002. P. 77, 84 [In Persian].
2. Hatchett DW, Josowicz M. Composites of intrinsically conducting polymers as sensing nanomaterials. J Chem Rev. 2008; 108(2): 746-769.
3. Kumar A, Jakhmola A. RNA-mediated fluorescent Q-Pb nanoparticles. Langmuir. 2007; 23: 2915-2918.
4. Aslan K, Geddes CD. Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology. Curr Opn Biotech. 2005; 16(1): 55-62.
5. Sosa I O, Noguez C, Barrera R G. Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes. J Phys Chem. 2003; B107(26): 6269-6275.
6. Horiguchi H. Chemistry of Antimicrobial Agents.

Tokyo, Japan: Sankyo Press; 1980. P. 46.
7. Ojas M, Bhagat M, Gopalakrishnan C, Arunachalam KD. Ultrafine dispersed CuO nanoparticles and their antibacterial activity. Journal of Experimental Nanoscience. 2008; 3(3): 185–193.
8. Li B, Yu S, Hwang JY, Shi S. Antibacterial vermiculite nano-material. Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering. 2002; 1(1): 61–68.
9. Condorelli GG, Costanzo IL, Fragala IL, Giuffrida S, Ventimiglia G. A single photochemical route for the formation of both copper nanoparticles and patterned nanostructured films. J Mater Chem. 2003; 13(10): 2409–2411.
10. Cioffi N, Torsi L, Ditaranto N, Tantillo G, Ghibelli L, Sabbatini L. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. Chem Mater. 2005; 17(21): 5255-5262.
11. Azam A, Ahmed A, Oves M, Khan MS, Memic M. Size dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and –negative bacterial strains. International Journal of Nanomedicine. 2012; 7(1): 3527-3535.
12. Malekzadeh F, Shahamat M. General microbiology. 3rd ed. Tehran University Press; 2008. P. 239 [In Persian].
13. Jezowska-Bojczuk M, Lambs L, Kozlowski H, Berthon G. Metal ion-tetracycline interactions in biological fluids. 10. Structural investigations on copper (II) complexes of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, 4- (dedi-methylamino) tetracycline, and 6-desoxy -6- demethyltetra-cycline and discussion of their binding modes. Inorg. Chem. 1993; 32(4): 428-437.
14. Neuberger T, Schopf B, Hofmann H, Hofmann M, Von Rechenberg B. Superparramagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. Magn. Mater. 2005; 293(1): 483-496.
15. Webb GF, DAgata EM, Magal P, Ruan S. A model of antibiotic-resistant bacterial epidemics in hospitals. Proc. Natl Acad. Sci. USA.2005; 102(37): 13343-13348.
16. Raffi M, Hussain F, Bahtti TM, Akhter JI, Hameed A, Hassan MM. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against E. coli ATCC- 15224. J. Mater. Sci. Technol.2008; 24(2): 192-196.
17. Yoon K, Byeon JH, Park J, Hwang J. Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. Sci Total Environ. 2007; 373(2-3): 572–575.
18. Siva Kumar V, Nagaraja BM, Shashikala V, Padmasri AH, Madhavendra SS, Raju BD, et al. Highly efficient Ag/C catalyst prepared by electro-chemical deposition method in controlling microorganisms in water. J Mol. Catal. A Chem. 2004; 223(1): 313–319.
19. Li Z, Lee D, Sheng X, Cohen RE, Rubner MF. Two-level antibacterial coating with both release-killing and contact-killing capabilities. Langmuir. 2006; 22(24): 9820–9823.
20. Esteban-Cubillo A, Pecharroman C, Aguilar E, Santaren J, Moya JS. Antibacterial activity of copper monodispersed nanoparticles into sepiolite. J Mater Sci. 2006; 41(16): 5208–5212.
21. Xu JF, JiW, Shen ZX, Tang SH, Ye XR, Jia DZ, Xin XQ. Preparation and characterization of CuO nanocrystals. J Solid State Chem. 1999; 147(2): 516-519.
22. Stoimenov PK. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. Langmuir. 2002; 18(17): 6679-6686.
23. Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomater. 2008; 4(3): 707–716.
24. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Radic Biol Med. 1995; 18(2): 321-336.
25. Colaizzi JL, Knevel AM, Martin AN. Biophysical Study of the Mode of Action of the Tetracycline Antibiotics. J. Pharm. Sci. 1965; 54(10): 1425-1436.
26. Hahn, H. (Hrsg.), Antibiotics, Bd. 5, Springer Verlag, Berlin; 1979. P. 304-328.
27. Menachery MD, Cava MP. Amino derivatives of Anhydrotetracycline. Can. J. Chem. 1984; 62(4): 2583-2585.
28. Dürckheimer W. Tetracycline: Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Angew. Chemie. 1975; 87(21): 751-784.
29. CD Römpp Chemie Lexikon, Version 1.0, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 1995.
30. Saber M. Iran generic drugs and drugs classification. 7th ed. Tehran University Press; 2008. P. 155 [In Persian].
31. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antimicrobial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticles: A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. Appl Environ Microbial 2007; 73(6):1712–1720.
32. Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aueruse and Escherichia coli. Nanomed. Nanotecnol. Biol. Med. 2007; 3(2): 168-171.
33. Jain P, Pradeep T. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. Biotechnol Bioeng. 2005; 90(1): 59–63.

Original Article

Synthesis of Copper Oxide (CuO) Nanoparticles and Surveying Its Bactericidal Properties against *Aeromonas Hydrophila* Bacteria

Shaffiey S.F[1*], Ahmadi M[1], Shaffiey S.R[2], Shapoori M[1], Varshoie H[1], Azari F[3]

1- Department of Natural Science, Savadkooh Branch, Islamic Azad University, Savadkooh, Iran.
2- Young Researchers Club, Islamic Azad University, Qaemshahr Branch, Qaemshahr, Iran.
3- Young Researchers Club, Islamic Azad University, Savadkooh Branch, Savadkooh, Iran.

Received: 25 Sep 2014 Accepted: 05 Feb 2015

Abstract

Background & Objective: CuO is one of the most important transition metal oxides due to its exclusive properties. It is used in various technological applications such as superconductors and gas sensors. Recently, it has been used as an antimicrobial agent against various bacterial species. In this study, we synthesized CuO nanoparticles and evaluated their antibacterial property.

Materials & Methods: Single crystalline nanoparticles of copper oxide having almost uniform particle size of 5-6 nm have been synthesized. The used technique is free from toxic solvents and amines, and it is based on a simple reaction of copper sulfate and De-ionized water (DI). In addition, their bactericidal effects against *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T bacteria were investigated. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined with well diffusion method and liquid culture for all of the Aeromonas hydrophila culture medias.

Results: XRD(X Ray Diffraction) spectra confirmed the formation of single phase CuO nanoparticles. A minimum crystallite size of 5-6 nm was observed in the case of CuO nanoparticles. Transmission electron microscopy results corroborate well with XRD results. CuO nanoparticles exhibited inhibitory effects against Gram-negative bacteria.

Conclusion: The present study confirms that copper oxide nanoparticles have great ability as an antimicrobial agent against *Aeromonas hydrophila*.

Keywords: **Nanoparticles, *Aeromonas hydrophila*, Copper oxide, Antimicrobial activity**

[*]**Corresponding author: Seyedeh Fatemeh Shaffiey**, Department of Natural Science, Islamic Azad University, Savadkooh Branch, Savadkooh, Iran.
Tel:+989370016049
Email: f.shaffiey@yahoo.in