Iranian Journal of Military Medicine
Vol. 13, No. 2, Summer 2011
Pages: 65-70

مجله طب نظامی
دوره ۱۳، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰
صفحات: ۷۰-۶۵

اثر ضدباکتریایی نانوذرات کربنات کلسیم بر *آگروباکتریوم تومفاسیانس*

رمضانعلی عطایی[۱] *PhD*، جلال‌الدین درخشان‌پور[*] *MSc*، علی مهرابی توانا[۲] *PhD*، اکرم عیدی[۳] *PhD*

[*]گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۱]"مرکز تحقیقات فرآورده‌های میکروبی" و "گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی"، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

[۲]"مرکز تحقیقات مدیریت سلامت" و "گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی"، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، تهران، ایران

[۳]گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

اهداف: پیشرفت در علوم و فنّاوری نانو در دهه گذشته، فرصت‌های زیادی برای بررسی اثرات بیولوژیکی ازجمله اثرات ضدباکتریایی نانوذرات ایجاد کرده است. هدف این تحقیق، بررسی اثر نانوذرات کربنات‌کلسیم بر رشد دو نوع باکتری *آگروباکتریوم تومفسیانس* و *استافیلوکوکوس آرئوس* بود.

روش‌ها: فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات کربنات‌کلسیم بر باکتری‌های مذکور، با دو روش رقت‌سازی در محیط آگاردار و رقت‌سازی در محیط مایع مورد بررسی قرار گرفت. به هریک از رقت‌ها ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی حاوی CFU/ml $۱۰^{۶}$ اضافه و گرمخانه‌گذاری شد. در زمان‌های مختلف از هر لوله نمونه‌گیری انجام گرفت و از آن رقت‌های $۱۰^{-۱}$ الی $۱۰^{-۶}$ تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت روی محیط جامد منتقل شده، به‌خوبی در سطح پلیت پخش شد و سپس گرمخانه‌گذاری شد. با شمارش تعداد کلنی‌ها، MIC و MBC آنها تعیین شد.

یافته‌ها: نانوذرات کربنات‌کلسیم اثرات ضدباکتریایی مناسب نشان داد و پس از ۱۶ ساعت جمعیت باکتریایی در معرض را از بین برد. کمترین و بیشترین غلظت MIC نانوذرات کربنات‌کلسیم در محیط جامد به‌ترتیب ۳۲/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر حاصل شد. MIC نانوذرات کربنات‌کلسیم در محیط مایع دوبرابر MIC آن در محیط جامد بود، در حالی که غلظت‌های مختلف کربنات‌کلسیم معمولی، نه‌تنها اثرات ضدباکتریایی نشان نداد، بلکه باعث تقویت رشد آنها نیز شد.

نتیجه‌گیری: نانوذرات کربنات‌کلسیم به‌عنوان کاندیدای تهیه مواد ضدمیکروبی مورد مصرف در زمینه‌های مختلف پزشکی، صنایع غذایی و کشاورزی پیشنهاد می‌شود و می‌تواند از نظر بهداشتی و اقتصادی حایز اهمیت باشد.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات کربنات‌کلسیم، *آگروباکتریوم تومفسیانس*، *استافیلوکوکوس آرئوس*، ضدمیکروبی

Antibacterial effect of calcium carbonate nanoparticles on A*grobacterium tumefaciens*

Ataee R. A.[1] *PhD*, Derakhshanpour J.* *MSc*, Mehrabi Tavana A.[2] *PhD*, Eydi A.[3] *PhD*

*Department of Biology, Sciences & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[1]"Microbial products Research Center" & "Department of Microbiology, Faculty of Medicine", Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[2]"Health Management Research Center" & "Department of Microbiology, Faculty of Medicine", Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[3]Department of Biology, Sciences & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Aims: Improvements in nanotechnology in the past decayed has created various opportunities for evaluation of biologic effects such as anti-bacterial effects of nanoparticles. The purpose of this study was to evaluate the antibacterial activity of calcium carbonate nanoparticles on two different bacteria including A*grobacterium tumefaciens* and *Staphylococcus aureus*.

Methods: The antibacterial effect of calcium carbonate nanoparticles against mentioned bacteria was evaluated by dilution in agar containing medium and dilution in Broth medium. Each of prepared Broth Media (10 ml) was inoculated with 1 ml of bacterial suspension (10^6 CFU/ml) and incubated. Sampling of culture Media was performed in specific intervals and diluted as 10^{-1}, to 10^{-6}. Then 100 µl of each sample was transferred to agar plates and was spread carefully and then incubated. Grown colonies were counted and MIC and MBC was determined.

Results: Calcium carbonate nanoparticles showed very good antibacterial effect and after 16 hours the bacteria were totally diminished. The lowest and highest MIC concentration of these nanoparticles in solid medium was 31.2 and 125 µg/ml respectively. The MIC of calcium carbonate nanoparticles in Broth Medium was two times more than the MIC concentration in solid medium, while different concentrations of ordinary calcium carbonate not only revealed antibacterial effects but also supported the bacterial growth.

Conclusion: Use of calcium carbonate nanoparticles as an anti-microbial agent is recommended in different fields of medicine, food industry and agriculture and can be of importance considering health and economic issues.

Keywords: Calcium Carbonate Nanoparticles, *Agrobacterium tumefaciens*, *Staphylococcus aureus*, Antibacterial

نویسنده مسئول: جلال‌الدین درخشان‌پور. تمام درخواست‌ها باید به نشانی derakhsh41@gmail.com فرستاده شوند.

دریافت مقاله: ۸۹/۱۰/۸ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۱/۲۶

مقدمه

امروزه یکی از اولویت‌های مهم بهداشتی در زمینه پزشکی و کشاورزی، دست‌یابی به عامل شیمیایی ضدعفونی‌کننده بی‌خطر است. زیرا وفور برخی از باکتری‌ها در محیط باعث ایجاد مشکلات بهداشتی شده است. به‌عنوان مثال *آگروباکتریوم تومِفسیانس*، یک باکتری گرم‌منفی، هوازی، بدون اسپور و خاک‌زی است [۱]. این باکتری گاهی ممکن است با عفونت انسان و سایر حیوانات نیز در ارتباط باشد [۲، ۳]. اما به‌طور معمول، عامل ایجاد بیماری سرطان طوقه یا تومور تاجی‌شکل در بیش از ۹۰ گونه گیاهیِ حایز اهمیت اقتصادی، از انواع دانه‌دار و هسته‌دار مانند سیب، گلابی، زردآلو و نیز گیاهان زراعی و زینتی مثل بوته کوکب، داوودی و گل رز است [۴]. *بور* و همکاران، تومور تاجی‌شکل درخت مو را مهم‌ترین بیماری باکتریایی این گیاه در سرتاسر جهان معرفی نمودند که به‌وسیله *آگروباکتریوم تومفسیانس بیووار۳* ایجاد می‌شود [۵]. عامل بیماری‌زایی این باکتری، یک پلاسمید بزرگ القاکننده تومور (پلاسمید Ti) است که ژن‌های بیماری‌زایی روی آن واقع شده‌اند [۶، ۷]. به‌هنگام عفونت گیاه، بخشی از این پلاسمید (T-DNA) به‌سلول‌های گیاه منتقل شده و در DNA آن وارد می‌شود [۶، ۷، ۸، ۹]. پس از بیان ژن‌های T-DNA در سلول‌های گیاهی، تولید بیش از حد اکسین‌ها و سیتوکسین‌ها منجر به رشد بدون کنترل سلول‌های گیاهی و نهایتاً تشکیل تومور در ساقه و ریشه گیاه میزبان می‌شود [۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱]. این باکتری غالباً از طریق نواحی زخمی و آسیب‌دیده وارد گیاه می‌شود [۹]. *بور* و *کاتز* در سال ۱۹۸۴ نشان دادند که عامل بیماری‌زا از طریق قلمه‌های تهیه‌شده از درخت مو نیز منتقل شده و باعث آلودگی گیاهان می‌شود که پس از وقوع یک دوره یخ‌زدگی یا آسیب فیزیکی، علایم بیماری را نشان می‌دهند [۱۲]. هنگامی که از یک گیاه مادر آلوده به‌منظور تهیه تعدادی نهال و قلمه استفاده شود، عامل بیماری‌زا می‌تواند در سطح وسیعی از یک منطقه پخش شود. به این ترتیب سالانه خسارت‌های اقتصادی و اجتماعی فراوانی بر کشاورزان وارد می‌شود [۵، ۶، ۱۳، ۱۴]. علاوه بر این، *آگروباکتریوم تومفسیانس* در برخی عفونت‌های انسانی نیز گزارش شده است [۱۵]. لیکن از بیماری‌زایی آن در انسان، گزارش مستدلی در دست نیست. همچنین *استافیلوکوکوس آرئوس* باکتری کروی، گرم‌مثبت و هوازی است که در تمام محیط‌ها به‌ویژه محیط‌های بیمارستانی به‌وفور یافت می‌شود و مشکلات متعدد بهداشتی را به‌وجود می‌آورد. این امر، ضرورت تداوم ضدعفونی را اجتناب‌ناپذیر می‌نماید. لذا، دست‌یابی به یک ماده مفید ضدعفونی‌کننده برای کنترل رشد این باکتری‌ها می‌تواند از خسارت‌های وارده پیشگیری نماید. بنابراین به‌منظور کنترل آلودگی‌های ناشی از این ارگانیزم‌ها، روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی مختلفی که اثر باکتری‌کشی یا مهارکنندگی دارند، استفاده شده است [۱۶]. علاوه بر این، پیشرفت در علوم و فناوری نانو در دهه گذشته، فرصت‌های زیادی برای بررسی اثرات بیولوژیکی از جمله اثرات ضدباکتریایی نانوذرات ایجاد کرده است [۱۷]. زیرا تحقیقات متعددی تاکید بر اثرات فیزیکوشیمیایی متفاوت مواد در اندازه‌های معمول و ابعاد نانویی خود دارد.

هدف از این تحقیق، بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات کربنات‌کلسیم بر رشد *آگروباکتریوم تومفسیانس* به‌عنوان یک باکتری گرم‌منفی و *استافیلوکوکوس آرئوس* به‌عنوان یک باکتری گرم‌مثبت بود.

روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها: در این تحقیق تجربی، نمونه‌های گیاهی مشکوک به بیماری تومور تاجی‌شکل از باغات و مزارع مناطق مختلف ایران، جمع‌آوری و بخشی از ساقه و ریشه آن توسط قیچی استریل بریده شد و در کیسه نایلونی یا ظرف پلاستیکی به آزمایشگاه انتقال یافت. آماده‌سازی نمونه‌ها با روش توصیه‌شده توسط *مور* و همکاران انجام شد [۴]. این روش به‌طور خلاصه به این صورت بود که؛ ابتدا سطح نمونه‌های گیاهی به‌دست‌آمده با آب فراوان به‌خوبی شسته شد و نواحی تیره و نکروتیک بافت با اسکالپل استریل برداشته و به‌وسیله موادسفیدکننده خانگی با غلظت ۲٪ به‌مدت چند دقیقه شستشو داده شد. سپس نمونه‌ها با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و نواحی مشکوک به تومور با تیغ جراحی استریل، از آنها جدا شد. ۲ تا ۳ قطعه حاصل از قسمت‌های مختلف گال در ظرف پتری استریل قرار داده شد. سپس قطعات جمع‌آوری‌شده، پس از خردکردن، در داخل هاون چینی استریل له شدند. بافت له‌شده به‌لوله‌های آزمایش حاوی آب مقطر استریل انتقال یافت. لوله‌های محتوی نمونه، ورتکس شده و با لوپ استریل از سوسپانسیون تهیه‌شده از تومورها به‌صورت خطی روی محیط کشت انتخابی، PDA+CaCo3 (0.5%w/v) و ییست‌مانیتول‌آگار کشت داده شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. پس از زمان گرمخانه‌گذاری، کلنی‌های روییده از نظر ماکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. کلنی‌های گرد با سطح یکنواخت، دارای قوام موکوئیدی با رنگ سفید مرواریدی تا کرم‌قهوه‌ای که در محیط PDA+CaCo3 (0.5%w/v) در اطرافشان هاله شفاف ناشی از تشکیل اسید ایجاد نشده بود، انتخاب شدند. به‌منظور دست‌یابی به‌کشت خالص، هر کلنی به‌طور جداگانه چندبار در محیط PDA+CaCo3 (0.5% w/v) کشت داده شد. برای شناسایی باکتری‌های جداشده، هریک از کلنی‌های به‌دست‌آمده کدبندی شدند و آزمایشات مربوط به تعیین هویت آنها شامل مطالعات میکروسکوپی، بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی روی آنها انجام گرفت.

بررسی‌های بیوشیمیایی برای تعیین هویت جدایه‌ها: آزمون‌های بیوشیمیایی شامل؛ آزمون اکسیداز، کاتالاز، تولید اندول، اکسیداسیون قند لاکتوز و تبدیل آن به ۳-کتولاکتوز، تحمل نمک ۲٪ در محیط نوترینت‌گلوکزآگار (NGA)، استفاده یا عدم استفاده از مالونات و سیترات، تغییرات ایجادشده در محیط لیتموس‌میلک، ایجاد

پلیکل (زایده‌ای به رنگ قهوه‌ای در سطح) در محیط فریک‌آمونیوم‌سیترات، تولید یا عدم تولید اسید در محیط PDA+CaCo3 (0.5% w/v) انجام شد. همچنین توانایی رشد در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی: در شرایط *در شیشه*، فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات کربنات‌کلسیم بر آگروباکتریوم‌های جداشده، *آگروباکتریوم تومفسیانس LB4404* و نیز *استافیلوکوکوس‌آرئوس* به‌عنوان کنترل با دو روش رقت‌سازی در محیط آگاردار و رقت‌سازی در محیط مایع مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات کربنات‌کلسیم به‌روش رقت‌سازی در محیط آگاردار:

ویژگی‌های پودر نانوذرات کربنات‌کلسیم دارای کد استاندارد NNS12ca عبارت بود از:

ـ وزن مخصوص خشک (g/cm3): ۲/۴-۲/۵

ـ میانگین اندازه ذرات (نانومتر) $\leq$ ۵۰

حساسیت *آگروباکتریوم تومفسیانس* به نانوذرات کربنات‌کلسیم با استفاده از روش استاندارد تهیه رقت سریال در محیط آگاردار بررسی شد [۱۸، ۱۹]. به این صورت که رقت‌های دوبرابر کم‌شونده از نانوذرات کربنات‌کلسیم با غلظت اولیه ۰/۱٪ (۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌گرم) در محیط TSA (تریپتیک‌سوی‌آگار) تهیه شد. به این ترتیب، غلظت‌های به‌دست‌آمده شامل ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ ۶۲/۵، ۳۱/۲، ۱۵/۶و ۷/۸ میکروگرم بر میلی‌گرم در محیط TSA بود. سپس ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از کشت‌های ۲۴ساعته آگروباکتریوم‌ها که مطابق کدورت ۰/۵ استاندارد مک‌فارلند تنظیم شده بودند، به پلیت‌های حاوی غلظت معین از نانوذرات کربنات‌کلسیم، کربنات‌کلسیم آزمایشگاهی (شرکت مرک؛ آلمان) و پلیت‌های کنترل که فاقد کربنات‌کلیسم بودند، انتقال داده شدند و به‌خوبی با اپلیکاتور شیشه‌ای استریل در سطح محیط پخش شدند. سپس محیط‌های تلقیح‌شده در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. محیط کشت با کمترین غلظت نانوذرات کربنات‌کلسیم که تعداد کلنی کمتر از نمونه تلقیحی در آن قابل مشاهده بود و در غلظت‌های بالاتر از آن هیچ‌گونه رشدی مشاهده نمی‌شد، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد باکتری (MIC) در نظر گرفته شد.

بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات کربنات‌کلسیم به‌روش رقت‌سازی در محیط مایع:

اثر ضدمیکروبی کربنات‌کلسیم نانو با استفاده از روش استاندارد تهیه رقت‌های متوالی در محیط مایع TSB (تریپتیک‌سوی‌براث) بررسی شد [۲۰]. در این روش، غلظت‌های دوبرابر کم‌شونده از کربنات‌کلسیم نانو و کربنات‌کلسیم معمولی تهیه شد. به این صورت که به‌طور جداگانه یک میلی‌لیتر از غلظت اولیه ۰/۱٪ کربنات‌کلسیم نانو و کربنات‌کلسیم معمولی به هر یک از اولین سری ۸تایی لوله‌های آزمایش که حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت TSB استریل بودند، اضافه شد و غلظت‌های متوالی مورد نظر (همانند روش قبل) حاصل شد. در انتها، یک میلی‌لیتر از لوله آخر دور ریخته شد. به هر یک از لوله‌های حاوی غلظت‌های مختلف کربنات‌کلسیم، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی حاوی 10^6 CFU/ml اضافه شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام گرفت. در جریان گرمخانه‌گذاری در زمان‌های ۰، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ ساعت، با برداشتن نمونه‌ای شامل ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از لوله‌های حاوی غلظت‌های مختلف کربنات‌کلسیم و نیز لوله‌های کنترل (یک میلی‌لیتر سوسپانسیون 10^6 CFU/ml) و با استفاده از محیط مایع TSB استریل و با رعایت شرایط آسپتیک، رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}و 10^{-6} تهیه شد. سپس از هر یک از رقت‌های تهیه‌شده، ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط جامد منتقل و با اپلیکاتور شیشه‌ای به‌طور کامل پخش شد. محیط‌های تلقیح‌شده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن با شمارش تعداد کلنی‌های رشدکرده، اثر هر یک از غلظت‌های کربنات‌کلسیم مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که رشد باکتری براساس ایجاد کدورت در محیط‌های کشت مایع به‌صورت چشمی بررسی شد. سپس، از هر یک از محیط‌ها در فاصله زمانی ۰، ۲، ۴، ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۳۶، و ۴۸ ساعت، ۰/۱ میلی‌لیتر به‌محیط‌های آگاردار منتقل و به‌خوبی پخش شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از زمان گرمخانه‌گذاری، تعداد کلنی‌های روییده شمارش شد. حداقل غلظت مهارکننده رشد آگروباکتریوم (MIC)، غلظتی از نانوذرات کربنات‌کلسیم در نظر گرفته شد که در لوله‌های شفاف تعداد کلنی معادل یا کمتر از تعداد ارگانیزم تلقیح‌شده ایجاد کرده بود. حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC) اولین لوله شفاف بعد از لوله MIC بود که هیچ کلنی در آن رشد نکرده بود.

از سویه استاندارد و شناخته‌شده *استافیلوکوک آرئوس ATCC 6538* به‌عنوان کنترل استفاده شد. این ارگانیزم با روش‌های کشت چندقسمتی در یک پلیت و همچنین کشت خطی به طول ۲ سانتی‌متر در محیط کشت مغذی آگاردار حاوی ۶۲ میکروگرم بر میلی‌گرم کربنات‌کلسیم نانو کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد.

نتایج

در محیط کشت نیمه‌اختصاصی، کلنی‌هایی با ظاهر موکوئیدی، سفید مرواریدی تا کرم‌رنگ رشد کردند. تمام کلنی‌ها باسیل گرم‌منفی با آرایش پلی‌مورف بودند. باکتری‌هایی که از نظر بیوشیمیایی با گونه آگروباکتریوم انطباق داشتند، انتخاب و کدبندی شدند. مشخصات گونه‌های باکتریایی جداسازی‌شده در جدول ۱ ارایه شده است.

سوسپانسیون کشت باکتریایی ۱۸ساعته به‌کاررفته، دارای غلظت اولیه معادل 5×10^6 CFU/ml بود.

جدول ۱) ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه‌های *آگروباکتریوم تومفسیانس*

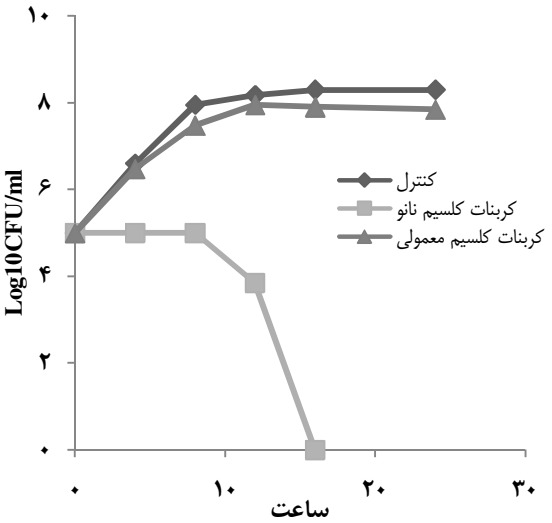
آزمون‌ها← باکتری‌ها↓	هوازی	اکسیداز	۳-کتولاکتوز	فریک آمونیوم سیترات	اسید در PDA-CaCo3	نمک ۲٪	مزو-اریتریتول	مانیتول	سیترات
آگروباکتریوم تومفسیانس ۱	+	+	+	+	-	+	-	+	-
آگروباکتریوم تومفسیانس ۲	+	+	+	+	-	+	-	+	-
آگروباکتریوم تومفسیانس ۳	+	+	+	+	-	+	-	+	-
آگروباکتریوم تومفسیانس ۴	+	+	+	+	-	+	-	+	-
آگروباکتریوم تومفسیانس ۵	+	+	+	+	-	+	-	+	-

جدول ۲) میزان MIC و MBC (میکروگرم بر میلی‌لیتر) نانوذرات کربنات‌کلسیم بر میکروارگانیزم‌ها

روش‌های تهیه رقت← باکتری‌ها↓	در محیط آگاردار		در محیط مایع	
	MIC	MBC	MIC	MBC
***آگروباکتریوم تومفسیانس* بیووار ۱ (شماره ۱)**	۳۱/۲	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵
***آگروباکتریوم تومفسیانس* بیووار ۱ (شماره ۲)**	۳۱/۲	۶۲/۵	۳۱/۲	۶۲/۵
***آگروباکتریوم تومفسیانس* بیووار ۱ (شماره ۳)**	۳۱/۲	۶۲/۵	۳۱/۲	۶۲/۵
***آگروباکتریوم تومفسیانس* بیووار ۱ (شماره ۴)**	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰
***آگروباکتریوم تومفسیانس* بیووار ۱ (شماره ۵)**	۳۱/۲	۶۲/۵	۳۱/۲	۶۲/۵
***آگروباکتریوم تومفسیانس* (LB4404)**	۳۱/۲	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵
استافیلوکوکوس آرئوس	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰
متوسط میانگین	۴۴/۶	۹۸/۲	۶۷	۱۳۴

نتایج بررسی اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف نانوذرات کربنات‌کلسیم و تعیین MIC و MBC آن برای هر یک از ۵ سویه *آگروباکتریوم تومفسیانس* جداشده، *استافیلوکوکوس آرئوس ATCC 6538* و نیز سویه *آگروباکتریوم تومفسیانس LB 4404* با استفاده از روش رقت‌سازی در محیط آگاردار و نیز روش رقت‌سازی در محیط مایع در جدول ۲ نشان داده شده است. MIC نانوذرات کربنات‌کلسیم برای سویه‌های *آگروباکتریوم تومفسیانس بیووار ۱* (شماره ۱) و *آگروباکتریوم تومفسیانس بیووار ۱* (شماره ۴) و نیز برای سویه *آگروباکتریوم تومفسیانس LB4404* در محیط مایع دوبرابر مقدار آن در محیط جامد بود. به همین ترتیب MBC نانوذرات کربنات‌کلسیم در محیط مایع در مورد برخی از سویه‌ها دوبرابر غلظت MBC همان ماده در محیط جامد بود.

به هر حال در هر دو روش، غلظت‌های ۲۵۰-۳۱/۲ میکروگرم بر میلی‌گرم کربنات‌کلسیم نانو، اثرات ممانعت از رشد بر تمامی باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد. در حالی که تمامی باکتری‌های رشددادهشده در محیط‌های کشت جامد و مایع حاوی کربنات‌کلسیم معمولی با غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۵٪ و ۱٪ به‌خوبی رشد کرده و کلنی‌های سفید کرم‌رنگ با قطر ۳-۲ میلی‌متر ایجاد کردند. به همین ترتیب، در مورد سویه استاندارد *استافیلوکوک آرئوس ATCC 6538* (به‌عنوان کنترل)، بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشد.



نمودار ۱) نحوه رشد *آگروباکتریوم تومفسیانس* در محیط دارای کربنات‌کلسیم نانو (۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و همچنین محیط کشت دارای کربنات‌کلسیم معمولی (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و محیط کنترل (محیط عاری از کربنات‌کلسیم) مقایسه شده است.

نانوذرات کربنات‌کلسیم با غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پس از ۱۶ ساعت به‌طور کامل، رشد *آگروباکتریوم تومفسیانس* را متوقف نمود. روند رشد و تکثیر ارگانیزم در محیط کنترل و نیز محیط حاوی ۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر کربنات کلسیم معمولی هیچ‌گونه تاثیری بر رشد باکتری نداشت. در حالی که جمعیت اولیه باکتری در محیط حاوی غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات کربنات‌کلسیم با گذشت زمان رو به کاهش نهاده و بعد از ۱۶ ساعت به صفر رسید (نمودار ۱).

بحث

به‌منظور جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف آگروباکتریوم، غلظت

بالایی از کربنات‌کلسیم در محیط کشت استفاده می‌شد؛ زیرا برای شناسایی و نگهداری این باکتری‌ها مجبور به استفاده از غلظت ۰/۵ تا ۲٪ کربنات کلسیم بودیم [۲۱، ۲۲] که از نظر کمی مقرون به صرفه نیست. تکنولوژی نانو می‌تواند در اشکال نانوذره، ویژگی‌های کمی-کیفی مواد را تغییر دهد و همچنین این تکنولوژی شکل جدیدی از ماده را ایجاد می‌نماید که در غلظت نانوگرم، اثری متفاوت از غلظت همان ماده در محدوده وزنی (گرم) نشان می‌دهد [۲۳]. لذا در این تحقیق از نانوکربنات‌کلسیم استفاده شد، زیرا تصور می‌شد که کاربرد نانوذرات کربنات‌کلسیم در محیط کشت باکتریایی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد. به‌طور تصادفی و با شگفتی مشاهده شد که اشکال نانوذرات کربنات‌کلسیم نه‌تنها باعث تقویت رشد *آگروباکتریوم تومفسیانس* نمی‌شود، بلکه به‌شدت رشد آن را مهار می‌کند. در حقیقت در این پژوهش، اثر کربنات‌کلسیم نانو و کربنات‌کلسیم آزمایشگاهی بر رشد گروهی از باکتری‌های گرم‌منفی و یک باکتری گرم‌مثبت شاخص بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که کربنات‌کلسیم نانو در غلظت‌های بسیار کم دارای اثر ضدباکتریایی روی باکتری‌های مورد آزمایش است، در صورتی که همان باکتری‌ها به‌خوبی در محیط کشت حاوی کربنات‌کلسیم معمولی رشد نمودند. به‌عبارت دیگر برخلاف اثر ضدباکتریایی کربنات‌کلسیم نانو، کربنات‌کلسیم معمولی هیچ‌گونه اثر ضدباکتریایی از خود نشان نداد. بدین ترتیب، پتانسیل ضدمیکروبی کربنات‌کلسیم نانو با اندازه‌گیری MIC و MBC بر آگروباکتریوم‌ها به‌عنوان یک پاتوژن گیاهی تعیین شد. یافته قابل توجه در تحقیق حاضر، این است که اثر ضدباکتریایی نانوذرات کربنات‌کلسیم در محیط جامد بیشتر از اثر این ماده در محیط مایع است. چنانچه در جدول ۲ نشان داده شده است، غلظت MIC در محیط مایع برای هم باکتری‌های گرم‌منفی و هم باکتری گرم‌مثبت به‌نسبت دوبرابر افزایش نشان می‌دهد. به‌علاوه نتایج حاصل، نشان‌دهنده آن است که MIC نانوذرات کربنات‌کلسیم برای باکتری‌های گرم‌منفی کمتر از MIC این ماده برای باکتری گرم‌مثبت است. علت این‌که چرا غلظت MIC نانوذرات کربنات کلسیم در محیط جامد نصف غلظت MIC همین ماده در محیط مایع است، مشخص نیست. اما نکته جالب توجه این است که سایر محققان نیز نشان داده‌اند که نانوذرات فلزی در بسترهای جامد اثر ضدباکتریایی بهتری را نشان می‌دهند که علت آن را ترکیب نانوذره با پلیمرهای موجود در محیط و تشکیل کمپوزیت قلمداد نموده‌اند [۲۴].

علاوه بر این، در سال‌های اخیر در اشکال جامد از قبیل سرامیک، با استفاده از اثرات تشعشعات نوری (فتوشیمیایی) حاصل از ترکیبات نانوذرات اکسید تیتانیوم نیز اثرات ضدمیکروبی مشابهی گزارش شده است [۲۵]. با این حال در این تحقیق، اثرات فتوشیمیایی مورد بررسی قرار نگرفت. با توجه به اهمیت موضوع، انجام تحقیقات بیشتر در دو زمینه اثرات ضدمیکروبی نانوذرات کربنات‌کلسیم در شکل بسترهای جامد و نیز اثرات فتوشیمیایی آن پیشنهاد می‌شود.

هرچند در سال‌های اخیر، اثر ضدباکتریایی نانوی مواد مختلف از قبیل نانوذرات نقره، مس و تیتانیوم در اشکال مختلف گزارش شده است [۲۶، ۲۷]، اما با توجه به بررسی در منابع موجود، تاکنون هیچ تحقیق مستندی مبنی بر کاربرد ضدمیکروبی نانوذرات کربنات‌کلسیم گزارش نشده است و این تحقیق اولین گزارش در این‌باره در ایران و جهان است. از آن‌جا که تهیه نانوذرات کربنات‌کلسیم در مقایسه با نانوذرات فلزی مقرون به صرفه است، مطالعه در زمینه کاربردهای اثرات ضدمیکروبی این ماده در صنایع غذایی، کشاورزی و پزشکی و بهداشتی می‌تواند راه‌گشایی برای کنترل آلودگی‌های باکتریایی باشد.

نتیجه‌گیری

نانوذرات کربنات‌کلسیم، اثر ضدمیکروبی دارد. کمترین MIC آن علیه باکتری‌های گرم‌منفی *آگروباکتریوم تومفسیانس* در محیط جامد، ۳۱/۲ و بیشترین آن ۶۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر است. به همین ترتیب MIC آن علیه *استافیلوکوکوس آرئوس* دوبرابر MIC علیه باکتری‌های گرم‌منفی است. در همه موارد، MBC نانوذرات کربنات‌کلسیم نیز دوبرابر MIC است. از نکات قابل توجه آن است که MIC نانوذرات کربنات‌کلسیم در محیط مایع دوبرابر MIC آن در محیط جامد است. در حالی که غلظت‌های مختلف کربنات‌کلسیم معمولی نه‌تنها اثرات ضدباکتریایی ندارد، بلکه باعث تقویت رشد آنها نیز می‌شود. با توجه به یافته‌های فوق، نانوذرات کربنات‌کلسیم به‌عنوان کاندیدی برای تهیه مواد ضدمیکروبی مورد مصرف در زمینه‌های مختلف پزشکی، صنایع غذایی و کشاورزی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از حمایت و پشتیبانی‌های استاد محترم دکتر *مصطفی قانعی* و همچنین از زحمات آقای مهندس *محمد ایرانمنش* که نسبت به تامین نانوذرات کربنات‌کلسیم در این تحقیق اقدام نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1- Tomlinson AD, Ramey-Hartung B, Day TW, Merritt PM, Fuqua C. Agrobacterium tumefaciens ExoR represses succinoglycan biosynthesis and is required for biofilm formation and motility. Microbiology. 2010;156(9):2670-81.
2- Petrunia IV, Frolova OY, Komarova TV, Kiselev SL, Citovsky V, Dorokhov YL. Agrobacterium tumefaciens-induced bacteraemia does not lead to reporter gene expression in mouse organs. PLoS One. 2008;3(6):e2352.
3- Frankova H, Chury Z, Gaislerova V, Jilkova J, Hejlova N, Mach J. Agrobacterium tumefaciens (Radiobacter) as an infectious agent in an oncological patient. Vnitr Lek. 1999;45(5):298-300.
4- Moore LW. Use of Agrobacterium radiobacter in agricultural ecosystems. Microbiol Sci. 1988;5(3):92-5.
5- Burr TJ, Otten L. Crow gall of grape: Biology and disease management. Ann Rev Phytopathol. 1999;37:53-80.
6- Chilton MD, Currier TC, Farrand SK, Bendich AJ, Gordon

MP, Nester EW. Agrobacterium tumefaciens DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974;71(9):3672-6.
7- Chilton MD, Drummond MH, Merio DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, et al. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell. 1977;11(2):263-71.
8- Ream LW, Gordon MP. Crown Gall disease and prospects for genetic manipulation of plants. Science. 1982;218(4575):854-9.
9- Matthysse AG. Initial interactions of Agrobacterium tumefaciens with plant host cells. Crit Rev Microbiol. 1986;13(3):281-307.
10- Brencic A, Angert ER, Winans SC. Unwounded plants elicit Agrobacterium virgene induction and T-DNA transfer: Transformed plant cells produce opines yet are tumour free. Mol Microbiol. 2005;57(6):1522-31.
11- Ulker B, Li Y, Rosso MG, Logemann E, Somssich IE, Weisshaar B. T-DNA-mediated transfer of Agrobacterium tumefaciens chromosomal DNA into plants. Nat Biotechnol. 2008;26(9):1015-7.
12- Matthysse AG. Initial interactions of Agrobacterium tumefaciens with plant host cells. Crit Rev Microbiol. 1986;13(3):281-307.
13- de Cleene CM. Crown gall: Economic importance and control. Zentralbl Bakteriol Naturwiss. 1979;134(6):551-4.
14- Young JM, Allen C, Coutinho T, Denny T, Elphinstone J, Fegan M, et al. Plant-pathogenic bacteria as biological weapons real threats? Phytopathology. 2008;98(10):1060-5.
15- Mantadakis E, Kondi A, Christidou A, Kalmanti M. Agrobacterium radiobacter bacteraemia in a child with acute lymphoblastic leukemia. World J Pediatr. 2010;6(2):181-4.
16- Mino KH, Grasbon T, Kampik A. Sterilization of phacoemulsification and vitrectomy instruments: Contamination and evaluation. Ophthalmology. 2000;97(10):703-7.
17- Zhao YK, Sung WP, Tsai TT, Wang HJ. Application of nanoscale silver-doped titanium dioxide as photocatalyst for indoor airborne bacteria control: A feasibility study in medical nursing institutions. J Air Waste Manag Assoc. 2010;60(3):337-45.
18- Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of Acinetobacter species. J Antimicrob Chemother. 2010;65(9):1975-83.
19- Li YH, Liu J, Yang LC, Zhang CH, Li G. Antibacterial activity determination of six kinds of natural herbs in Yunnan on normal oral predominant. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2010;28(2):199-202.
20- Zampini IC, Cuello S, Alberto MR, Ordonez RM, Almeida R, Solorzano E, et al. Antimicrobial activity of selected plant species from "the Argentine puna" against sensitive and multi-resistant bacteria. J Ethnopharmacol. 2009;124(3):499-505.
21- Goszcynska T, Serfontin GG, Serfontin S. Interoduction to phytobacteriology. Pretoria South Africa: CABI Publication; 2000.
22- Kampik A. Biotechnology procedures and experimental handbook. New Delhi India: Infinity Science Press LLC; 2007.
23- Vaseashta A, Dimova Malinoveska D. Nanostructured and nanoscals devices sensors and detectors. Sci Tech Adv Mater. 2005;6(3-4):312-8.
24- Raveha A, Zukermana I, Shnecka R, Avnic R, Friedc I. Thermal stability of nanostructure super hard coatings: A review. Surf Coat Technol. 2007;201(13):6136-42.
25- Zan L, Fa W, Peng T, Kui Gong Z. Photocatalysis effect of nanometer Tio2 and Tio2-coated ceramic plate on hepatitis B virus. J Photochem Photobiol. 2007;86(2):165-9.
26- Pelletier DA, Suresh AK, Holton GA, McKeown CK, Wang W, Gu B, et al. Engineered cerium oxide nanoparticles: Effects on bacterial growth and viability. Appl Environ Microbiol. 2010;76(24):7981-9.
27- Nanda A, Saravanan M. Biosynthesis of silver nanoparticles from Staphylococcus aurous and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. Nanomedicine. 2009;5(4):452-6.