

اثر ضدباکتریایی نانوذرات کربنات کلسیم بر آگروباکتریوم تومفاسیانس

رضانعلی 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

^۱مرکز تحقیقات فرآورده‌های میکروبی و "گروه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌... (عج)، تهران، ایران

^۲مرکز تحقیقات مدیریت سلامت و "گروه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌... (عج)، تهران، ایران

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

چکیده

اهداف: پیشرفت در علوم و فناوری نانو در دهه گذشته، فرصت‌های زیادی برای بررسی اثرات بیولوژیکی از جمله اثرات ضدباکتریایی نانوذرات ایجاد کرده است. هدف این تحقیق، بررسی اثر نانوذرات کربنات کلسیم بر رشد دو نوع باکتری آگروباکتریوم تومفاسیانس و استافیلوکوکوس آرتوس بود.

روش‌ها: فعالیت ضد میکروبی نانوذرات کربنات کلسیم بر باکتری‌های مذکور، با دو روش رقت‌سازی در محیط آگاردار و رقت‌سازی در محیط مایع مورد بررسی قرار گرفت. به هر یک از رقت‌ها ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی حاوی 10^6 CFU/ml اضافه و گرمخانه‌گذاری شد. در زمان‌های مختلف از هر لوله نمونه‌گیری انجام گرفت و از آن رقت‌های 10^{-1} الی 10^{-6} 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 کربنات کلسیم اثرات ضدباکتریایی مناسب نشان داد و پس از ۱۶ ساعت جمعیت باکتریایی در معرض را از بین برد. کمترین و بیشترین غلظت MIC نانوذرات کربنات کلسیم در محیط جامد به ترتیب ۳۲/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر حاصل شد. MIC نانوذرات کربنات کلسیم در محیط مایع دوبرابر MIC آن در محیط جامد بود، در حالی که غلظت‌های مختلف کربنات کلسیم معمولی، نه تنها اثرات ضدباکتریایی نشان نداد، بلکه باعث تقویت رشد آنها نیز شد.

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

کلیدواژه‌ها: نانوذرات کربنات کلسیم، آگروباکتریوم تومفاسیانس، استافیلوکوکوس آرتوس، ضد میکروبی

Antibacterial effect of calcium carbonate nanoparticles on *Agrobacterium 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

³Department 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 *Agrobacterium 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 μ l 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 μ g/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

مقدمه

ضدباکتریایی نانوذرات ایجاد کرده است [۱۷]. زیرا تحقیقات متعددی تاکید بر اثرات فیزیکیوشیمیایی متفاوت مواد در اندازه‌های معمول و ابعاد نانویی خود دارد. هدف از این تحقیق، بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات کربنات کلسیم بر رشد *آگروباکتریوم تومفسیانس* به عنوان یک باکتری گرم منفی و *استافیلوکوکوس آرنوس* به عنوان یک باکتری گرم مثبت بود.

روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها: در این تحقیق تجربی، نمونه‌های گیاهی مشکوک به بیماری تومور تاجی شکل 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٪ به مدت 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، $PDA+CaCo_3 (0.5\%w/v)$ بیست‌مانیتول‌آگار کشت داده شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 $PDA+CaCo_3 (0.5\%w/v)$ در اطرافشان هاله شفاف ناشی از تشکیل اسید ایجاد نشده بود، انتخاب شدند. به‌منظور دستیابی به کشت خالص، هر کلنی به‌طور جداگانه چندبار در محیط $PDA+CaCo_3 (0.5\% w/v)$ کشت داده شد. برای شناسایی باکتری‌های جداشده، هر یک 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 سترات، تغییرات ایجادشده در محیط لیتوموس‌میلک، ایجاد

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 تومفسیانس*، یک باکتری گرم منفی، 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 تاجی شکل در بیش از ۹۰ گونه گیاهی حایز اهمیت اقتصادی، از انواع دانه‌دار و هسته‌دار مانند سیب، گلابی، زردآلو و نیز گیاهان زراعی و زینتی مثل بوته کوبک، داوودی و گل رز است [۴]. بور و همکاران، تومور تاجی شکل درخت مو را مهم‌ترین بیماری باکتریایی این گیاه در سرتاسر جهان معرفی نمودند که به‌وسیله *آگروباکتریوم تومفسیانس بیووار* ۳ 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) به سلول‌های 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 می‌شود [۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱]. این باکتری غالباً از طریق نواحی زخمی و آسیب‌دیده وارد گیاه می‌شود [۹]. بور و کاتر 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، علائم 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 آرنوس* باکتری کروی، گرم مثبت 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

اثر ضدباکتریایی نانوذرات کربنات کلسیم بر آگروباکتریوم *تومفاسیانس* ۶۷

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 کربنات کلسیم، 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 کربنات کلسیم 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 رشد کرده، اثر هر یک از غلظت‌های کربنات کلسیم 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 به محیط‌های 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 کربنات کلسیم 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 کربنات کلسیم 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 ارائه شده است. سوسپانسیون کشت باکتریایی ۱۸ ساعته به‌کاررفته، دارای غلظت اولیه معادل $10^6 \times 5$ CFU/ml بود.

پلیکل (زایده‌ای به رنگ قهوه‌ای در سطح) در محیط فریک‌آمونیم‌سیترات، تولید یا عدم تولید اسید در محیط $PDA+CaCo_3 (0.5\% w/v)$ انجام شد. همچنین توانایی رشد در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی فعالیت ضد میکروبی: در شرایط در شیشه، فعالیت ضد میکروبی نانوذرات کربنات کلسیم بر آگروباکتریوم‌های جداشده، آگروباکتریوم *تومفاسیانس LB4404* و نیز *استافیلوکوکوس آرئوس* به‌عنوان کنترل با دو روش رقت‌سازی در محیط آگاردار و رقت‌سازی در محیط مایع مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات کربنات کلسیم به‌روش رقت‌سازی در محیط آگاردار:

ویژگی‌های پودر نانوذرات کربنات کلسیم دارای کد استاندارد NNS12ca عبارت بود از:

– وزن مخصوص خشک (g/cm³): ۲/۵–۲/۴

– میانگین اندازه ذرات (نانومتر) ≥ 50

حساسیت آگروباکتریوم *تومفاسیانس* به نانوذرات کربنات کلسیم با استفاده از روش استاندارد تهیه رقت سریال در محیط آگاردار بررسی شد [۱۸، ۱۹]. به این صورت که رقت‌های دوبرابر کم‌شونده از نانوذرات کربنات کلسیم 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، ۱۵/۶ و ۷/۸ میکروگرم بر میلی‌گرم در محیط TSA بود. سپس ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از کشت‌های ۲۴ ساعته آگروباکتریوم‌ها که مطابق کدورت ۰/۵ استاندارد مک‌فارلند تنظیم شده بودند، به پلیت‌های حاوی غلظت معین از نانوذرات کربنات کلسیم، کربنات کلسیم آزمایشگاهی (شرکت مرک؛ آلمان) و پلیت‌های کنترل که فاقد کربنات کلسیم 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 کربنات کلسیم 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.

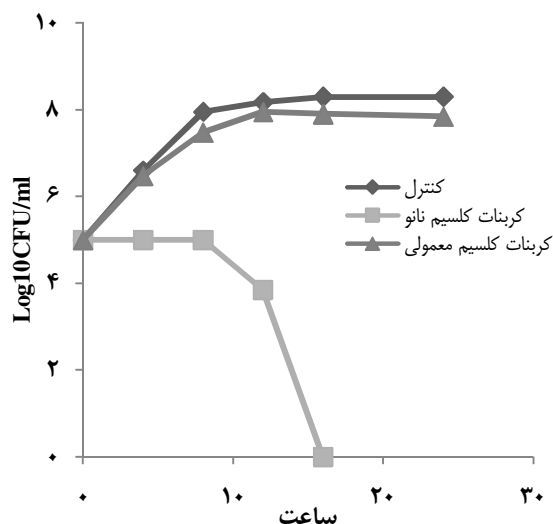
بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات کربنات کلسیم به‌روش رقت‌سازی در محیط مایع:

اثر ضد میکروبی کربنات کلسیم نانو با استفاده از روش استاندارد تهیه رقت‌های متوالی در محیط مایع TSB (تریپتیک‌سوی‌براث) بررسی شد [۲۰]. در این روش، غلظت‌های دوبرابر کم‌شونده از کربنات کلسیم نانو و کربنات کلسیم معمولی تهیه شد. به این صورت که به‌طور جداگانه یک میلی‌لیتر از غلظت اولیه ۰/۱٪ کربنات کلسیم نانو و کربنات کلسیم معمولی به هر یک از اولین سری ۸ تایی لوله‌های آزمایش که حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت TSB استریل بودند،

جدول (۱) ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه‌های آگروباکتریوم تومفسیانس

آزمون‌ها ← باکتری‌ها ↓	هوازی اکسیداز	۳-کتولاکتوز	فریک آمونیوم سیترات	اسید در PDA- CaCO ₃	نمک ۲٪ مزو-اریتریتول مانیتول سیترات
آگروباکتریوم تومفسیانس ۱	+	+	+	-	+
آگروباکتریوم تومفسیانس ۲	+	+	+	-	+
آگروباکتریوم تومفسیانس ۳	+	+	+	-	+
آگروباکتریوم تومفسیانس ۴	+	+	+	-	+
آگروباکتریوم تومفسیانس ۵	+	+	+	-	+

معمولی با غلظت‌های ۱٪، ۰/۵٪ و ۰/۱٪ به خوبی رشد کرده و کلنی‌های سفید کرم‌رنگ با قطر ۲-۳ 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 کربنات کلسیم نانو (۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و همچنین محیط کشت دارای کربنات کلسیم معمولی (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و محیط کنترل (محیط عاری از کربنات کلسیم) مقایسه شده است.

نانوذرات کربنات کلسیم 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 تأثیری بر رشد باکتری نداشت. در حالی که جمعیت اولیه باکتری در محیط حاوی غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات کربنات کلسیم 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

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

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

نتایج بررسی اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف نانوذرات کربنات کلسیم و تعیین MIC و MBC آن برای هر یک از ۵ سویه آگروباکتریوم تومفسیانس جدا شده، 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 کربنات کلسیم برای سویه‌های آگروباکتریوم تومفسیانس بیوواری ۱ (شماره ۱) و آگروباکتریوم تومفسیانس بیوواری 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 کربنات کلسیم 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 کربنات کلسیم نانو، اثرات ممانعت از رشد بر تمامی باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد. در حالی که تمامی باکتری‌های رشد داده شده در محیط‌های کشت جامد و مایع حاوی کربنات کلسیم

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 ضد میکروبی نانوذرات کربنات کلسیم گزارش نشده است و این تحقیق اولین گزارش در این باره در ایران و جهان است. از آن‌جا که تهیه نانوذرات کربنات کلسیم در مقایسه با نانوذرات فلزی مقرون به صرفه است، مطالعه در زمینه کاربردهای اثرات ضد میکروبی این ماده در صنایع غذایی، کشاورزی و پزشکی و بهداشتی می‌تواند راه‌گشایی برای کنترل آلودگی‌های باکتریایی باشد.

نتیجه‌گیری

نانوذرات کربنات کلسیم، اثر ضد میکروبی دارد. کمترین MIC آن علیه باکتری‌های گرم منفی *آگروباکتریوم تومفاسیانس* در محیط جامد، ۳۷/۲ و بیشترین آن ۶۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر است. به همین ترتیب MIC آن علیه *استافیلوکوکوس آرتوس* دوبرابر MIC علیه باکتری‌های گرم منفی است. در همه موارد، MBC نانوذرات کربنات کلسیم نیز دوبرابر MIC است. از نکات قابل توجه آن است که MIC نانوذرات کربنات کلسیم در محیط مایع دوبرابر MIC آن در محیط جامد است. در حالی که غلظت‌های مختلف کربنات کلسیم معمولی نه تنها اثرات ضدباکتریایی ندارد، بلکه باعث تقویت رشد آنها نیز می‌شود. با توجه به یافته‌های فوق، نانوذرات کربنات کلسیم به‌عنوان کاندیدی برای تهیه مواد ضد میکروبی مورد مصرف در زمینه‌های مختلف پزشکی، صنایع غذایی و کشاورزی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از حمایت و پشتیبانی‌های استاد محترم دکتر *مصطفی قانع* و همچنین از زحمات آقای مهندس محمد *ایرانمنش* که نسبت به تامین نانوذرات کربنات کلسیم 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, Hejlava 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

بالایی از کربنات کلسیم 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 نانوکربنات کلسیم استفاده شد، زیرا تصور می‌شد که کاربرد نانوذرات کربنات کلسیم در محیط کشت باکتریایی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد. به‌طور تصادفی و با شگفتی مشاهده شد که اشکال نانوذرات کربنات کلسیم نه تنها باعث تقویت رشد *آگروباکتریوم تومفاسیانس* نمی‌شود، بلکه به‌شدت رشد آن را مهار می‌کند. در حقیقت در این پژوهش، اثر کربنات کلسیم نانو و کربنات کلسیم آزمایشگاهی بر رشد گروهی از باکتری‌های گرم منفی و یک باکتری گرم مثبت شاخص بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که کربنات کلسیم نانو در غلظت‌های بسیار کم دارای اثر ضدباکتریایی روی باکتری‌های مورد آزمایش است، در صورتی که همان باکتری‌ها به‌خوبی در محیط کشت حاوی کربنات کلسیم معمولی رشد نمودند. به‌عبارت دیگر برخلاف اثر ضدباکتریایی کربنات کلسیم نانو، کربنات کلسیم معمولی هیچ‌گونه اثر ضدباکتریایی از خود نشان نداد. بدین ترتیب، پتانسیل ضد میکروبی کربنات کلسیم نانو با اندازه‌گیری MIC و MBC بر *آگروباکتریوم*ها به‌عنوان یک پاتوژن گیاهی تعیین شد. یافته قابل توجه در تحقیق حاضر، این است که اثر ضدباکتریایی نانوذرات کربنات کلسیم 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 گرم منفی و هم باکتری گرم مثبت به‌نسبت دوبرابر افزایش نشان می‌دهد. به‌علاوه نتایج حاصل، نشان‌دهنده آن است که MIC نانوذرات کربنات کلسیم برای باکتری‌های گرم منفی کمتر از MIC این ماده برای باکتری گرم مثبت است. علت این که 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 ضد میکروبی 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 ضد میکروبی نانوذرات کربنات کلسیم در شکل بسترهای جامد و نیز اثرات فتوشیمیایی آن پیشنهاد می‌شود.

- 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- Goszczynska T, Serfontin GG, Serfontin S. Interduction to phyto bacteriology. 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 nanoscale devices sensors and detectors. *Sci Tech Adv Mater.* 2005;6(3-4):312-8.
- 24- Raveha A, Zukerman I, Shnecka R, Avnic R, Friede 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 TiO_2 and TiO_2 -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 aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine.* 2009;5(4):452-6.
- 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 virgine* 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, Weissshaar 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 Bakteriell 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