

سنتر و مطالعه اثر pH بر فعالیت آنتی باکتریال نانوذرات ZnSe روی باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کولی و سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از زیست-آزمون انتشار دیسک*

مقاله پژوهشی

داریوش سوری^(۱) سعید محقق‌نژاد^(۲) مهدی قبولی^(۳)

چکیده در پژوهش حاضر، نانوذرات سلنید روی (ZnSe) به روش آبی در pHهای ۸، ۱۰/۲، ۱۱/۲ و ۱۲/۲ سنتز شده و توسط تابش امواج مایکروویو در مدت زمان‌های تابش صفر و شش دقیقه رشد یافتند. در فرایند سنتز، منابع یون‌های سلنیم و روی تهیه و در حضور تیوگلیکولیک اسید به عنوان عامل پوششی به هم افزوده شدند. خاصیت آنتی باکتریال این نانوذرات با استفاده از زیست-آزمون انتشار دیسک (در محیط کشت جامد مولر-هیتون-آگار) علیه باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کولی و سودوموناس آئروژینوزا در حجم بارگذاری ۱۴۰ میکرولیتر از نانوذرات انجام شده است؛ نتایج نشان دادند که به طور کلی با افزایش زمان تابش از صفر به شش دقیقه منطقه مهار رشد باکتری توسط نانوذرات در باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به باکتری اشریشیا کولی افزایش یافته است؛ بیشترین فعالیت آنتی باکتریال به حالات ۱۱/۲ و pH=۱۰/۲ اختصاص دارد و این نمونه‌ها را می‌توان به عنوان مؤلفه‌های جدیدی در زمینه کاربردهای نانو زیست- فناوری معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی باکتری گرم منفی، نانوذرات ZnSe، تابش مایکروویو، روش انتشار دیسک، خاصیت آنتی باکتریال.

مقدمه

یون‌های آزاد شده از نانو مواد با گروه‌های تیول (SH) پروتئین-های سطحی سلول‌های باکتریایی واکنش دهند. تعدادی از این پروتئین‌های غشای سلول‌های باکتریایی عمل انتقال مواد معدنی از سطح دیواره سلول را به عهده دارند، که نانو مواد با اثر بر روی این پروتئین‌ها باعث غیرفعال شدن و نفوذناپذیری غشا می‌شوند [2]. غیرفعال شدن تراوایی غشا در نهایت باعث مرگ سلول می‌شود [3]. نانوذرات در دنیای فناوری امروزه و در حوزه‌های مختلف نقش‌های کاربردی فراوانی را کسب نموده‌اند. نقاط کوانتومی سلنید روی از جمله مهم‌ترین نقاط کوانتومی نیم‌رسانا است که دارای گاف انرژی پهن و مستقیم ۲/۷۲ الکترون ولت در حالت توده‌ای، و شعاع بوهر ۸ نانومتر در دمای اتاق می‌باشد. علاوه بر این نانوذرات سلنید روی به دلیل سمیت کم‌تر نسبت به نانو ساختارهای کادمیومی، در

فناوری نانو به دلیل قرارگیری در ابعاد و اندازه‌های نانومتری قادر به مطالعه پدیده‌ها، مشخصه‌نگاری، طراحی و مهندسی نانو ابزارها است. هم‌چنین با استفاده از نانو بیوتکنولوژی امکان مطالعه عملی روی نانوذرات مطالعه شده در سیستم‌های بیولوژیکی فراهم شده است و به دلیل اهمیت بالای آن همواره در حال گسترش می‌باشد [1]. مطالعات گسترده‌ای منبئ بر واکنش‌های احتمالی بین نانوذرات با میکروارگانیسم‌های موجودات زنده انجام گرفته است. با جذب نانوذرات به سطح دیواره سلولی میکروارگانیسم، واکنش بین نانوذرات و میکروارگانیسم‌ها صورت می‌گیرد و باعث مرگ سلول‌های میکروارگانیسم می‌گردد. هم‌چنین احتمال داده می‌شود که

* تاریخ دریافت مقاله ۱۳۹۹/۴/۲ و تاریخ پذیرش آن ۱۴۰۰/۷/۳ می‌باشد.

(۱) نویسنده مسئول، استاد، فیزیک ماده چگال، گروه فیزیک، دانشگاه ملایر.

(۲) دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فیزیک، دانشگاه ملایر.

(۳) استادیار، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه ملایر.

سودوموناس آئروژینوزا، مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

روش تجربی

به منظور سنتز نانوذرات سلنید روی به روش آبی، ابتدا با استفاده از واکنش بین پودر سلنیوم و پودر سدیم بوروهیدرید، منبع یون Se تهیه می‌شود و سپس با استفاده از پودر استات روی حل شده در حجم ۱۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه، محلول حاوی منبع یون روی تهیه می‌شود. در این مرحله از تیوگلیکولیک اسید (TGA) به عنوان عامل پوششی و محلول سدیم هیدروکسید به عنوان تنظیم کننده pH استفاده می‌گردد. در نهایت محلول حاوی منبع یون روی (Zn)، قطره قطره به منبع یون سلنیوم (Se) تزریق می‌شود و نانوذرات سلنید روی ساخته می‌شوند. جزئیات بیشتر سنتز نانوذرات در مراجع [۴] و [۵] آمده است.

در مرحله بعد، برای آشکار سازی فعالیت آنتی باکتریال نانوذرات سلنید روی روش انتشار دیسک در آگار انجام می‌شود. در روش انتشار دیسک در آگار، ابتدا برای ایجاد بستر کشت جامد، مقدار ۴/۲ گرم پودر مولر- هیتون براث (MHB) با ۳ گرم پودر آگار در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل می‌شود و محلول حاصل پس از استریل شدن در اتوکلاو به داخل پتری‌دیش‌هایی با اندازه‌های مساوی و به تعداد مورد نیاز در حجم‌های مساوی ریخته می‌شود. تمامی مقادیر طبق پروتکل شرکت سازنده اندازه‌گیری شده‌اند. سپس برای ایجاد نیم مک برای تلقیح پلیت آگار، مقدار ۱/۰۵ گرم پودر MHB را در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل می‌کنند و در ادامه برای تهیه سوسپانسیون میکروبی با استفاده از لوپ یک کولنی از هر سویه میکروبی به ۵ میلی لیتر محیط کشت (MHB + آب مقطر) اضافه می‌گردد. برای ایجاد نیم مک از استاندارد مک فارلاند (Mc Farland) تنظیم شده با دسته‌گاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر و میزان جذب باکتری‌ها در بازه ۰/۱۳-۰/۰۸ استفاده شد. در ادامه سطح حاوی کشت جامد آگار استریل را با سوسپانسیون نیم مک

برچسب‌های زیستی کاربرد ویژه‌ای دارند [۴]. از اصلی‌ترین چالش‌های استفاده از نیم‌رساناهای توده‌ای، هزینه بالای تهیه مواد اولیه و همچنین کارایی پایین آن‌هاست. با توجه به قابلیت تنظیم گاف انرژی در نانوذرات نیم‌رسانا، تاحدودی می‌توان بر این مشکلات غلبه کرد؛ بنابراین روش فراوری این مواد از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. روش‌های مختلفی از جمله روش قوس الکتریکی، سل-ژل، احیای شیمیایی، سونو شیمی، هیدروترمال و... برای سنتز نانوذرات ZnSe وجود دارد [۵]. به تازگی، نانوذرات نیم‌رسانا با استفاده از روش آبی مایکروویو- همراه که یک روش جدید، سریع و کم هزینه، و جزء روش‌های پایین به بالای ترموشیمیایی محسوب می‌شود، سنتز می‌گردد. در این روش با استفاده از گرمادهی مایکروویو امواج الکترومغناطیس به طور مستقیم با مولکول‌های موجود در محلول‌ها جفت می‌شود و منجر به افزایش سرعت انتقال حرارت و رشد نانوذرات می‌شود [6,7].

یک روش معمول مورد استفاده که در بسیاری از آزمایشگاه‌های میکروبیولوژیکی برای تست قابلیت آنتی باکتریال مواد استفاده می‌شود، روش زیست سنجی انتشار دیسک (Disc diffusion) در آگار است که در عین کم هزینه بودن به راحتی می‌تواند در آزمایشگاه‌ها مورد بهره‌برداری قرار گیرد [8]. در خصوص خاصیت آنتی باکتریال نانوذراتی از قبیل ZnS [۹]، ZnO [10] و... گزارش‌هایی وجود دارد، اما در مورد خواص آنتی باکتریال نانوذرات ZnSe گزارش مدونی وجود ندارد. لازم به ذکر است که در کار حاضر نانوذرات سلنید روی به روش آبی در ۱۲/۲ و ۱۱/۲، ۱۰/۲، pH=۸ سنتز و تحت تابش مایکروویو (در زمان‌های مختلف صفر و شش دقیقه) رشد یافته‌اند و سپس با در نظر گرفتن ملاحظات نوری و ساختاری آن‌ها، خواص آنتی باکتریال این نانوذرات به روش انتشار دیسک روی باکتری‌های گرم منفی اشریشیاکولی و

(۱) آمده است. گزارش شده است که افزایش pH و زمان تابش میکروویو روی ساختار کلی بلوری نانوذرات سلنید روی اثری ندارد و صرفاً تغییر اندازه نانوذرات با تغییر شرایط سنتز هر نمونه مشهود است. همچنین با استفاده از رابطه شرر [11] می‌توان اندازه نانوذرات را به دست آورد و باتوجه به داده‌های گزارش شده در جدول (۱) مشاهده می‌شود با افزایش زمان تابش، اندازه نانوذرات بزرگ‌تر می‌شود ولی با افزایش pH نمی‌توان روندی را برای اندازه نانوذرات تعریف کرد.

همچنین طیف جذب الکترومغناطیس در گستره فرابنفش - مرئی برای نانوذرات نیم‌رسانای سلنید روی به منظور مطالعه خواص نوری استفاده شده است. جدول (۱) داده‌های گزارش شده قبلی [۴] را برای گاف انرژی و اندازه نانوذرات با بهره‌گیری از تقریب جرم مؤثر [12] برای نمونه‌های با شرایط سنتز و رشددهی مختلف نشان می‌دهد. باتوجه به جدول (۱)، مشاهده می‌گردد که با افزایش مقدار pH، لبه جذب به سمت طول موج‌های بلندتر جابه‌جا می‌شود. همچنین باتوجه به گزارش‌های موجود [۴]، این روند برای افزایش زمان تابش میکروویو نیز صادق است. نتایج اندازه نانوذرات با بهره‌گیری از داده‌های گاف انرژی توده‌ای سلنید روی و گاف نانوذرات (گزارش شده در جدول ۱)، مؤید روند معکوس آن نسبت به گاف نانوذرات می‌باشد و این اندازه‌ها در مرتبه اندازه‌های گزارش شده از رابطه شرر می‌باشند.

(اشرشیاکولی و سودوموناس آئروژینوزا) با استفاده از سواب کشت چمنی داده می‌شود و سپس دیسک‌های کاغذی حاوی نانوذرات مورد بررسی (با حجم بارگذاری $1 \mu\text{L}$) بر روی سطح محیط کشت جامد آگار قرار داده می‌شود. در بخش آنتی‌باکتریال از نانوذراتی که در ابتدای کار به روش آبی در $12/2$ و $11/2$ ، $10/2$ ، 8 pH سنتز شدند و در داخل میکروویو در زمان‌های 0 و 6 دقیقه رشد یافتند، استفاده می‌شود. لازم به ذکر است هر آزمایش نانوذره 3 بار تکرار می‌شود تا روند منطقی و قابل قبولی از منظر آماری وجود داشته باشد. همچنین پلیت‌ها به مدت 18 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در نهایت میزان اثر pH محلول نانوذرات سلنید روی در زمان تابش‌های مختلف میکروویو صفر و شش دقیقه بر قطر هاله ممانعت از رشد باکتری‌های گرم منفی مشخص گردید.

بحث و نتایج

نتایج مشخصه‌نگاری نوری و ساختاری نانوذرات سلنید

روی

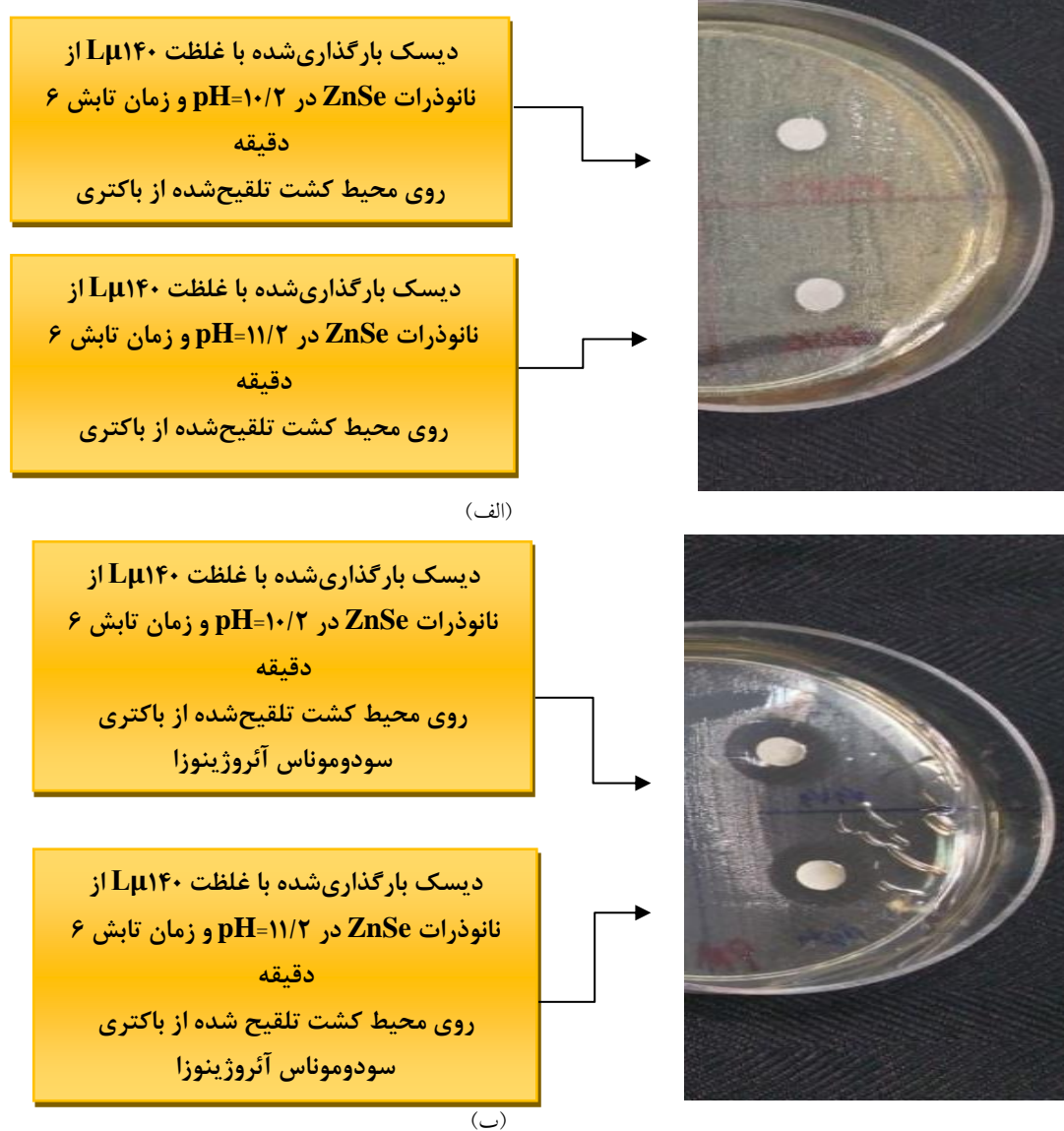
باتوجه به گزارش‌های قبلی [۴] و [5]، اطلاعات کامل اندازه نانوذرات سلنید روی به دست آمده از طیف پراش پرتو ایکس نمونه‌های مورد بررسی در $12/2$ و $11/2$ و $10/2$ و 8 pH و در زمان‌های تابش میکروویو صفر و شش دقیقه در جدول

جدول ۱ نتایج مربوط به ملاحظات نوری و اندازه ذرات نانوبلورهای سلنیدروی سنتز شده در این پژوهش [۴]

نمونه ZnSe	زمان تابش میکروویو صفر دقیقه				زمان تابش میکروویو شش دقیقه			
	pH=8	pH=10/2	pH=11/2	pH=12/2	pH=8	pH=10/2	pH=11/2	pH=12/2
اندازه ذرات از رابطه شرر	1/736	1/496	1/942	1/773	2/048	1/993	2/142	2/180
$E_{gap}^{DASF} (eV)$	3/721	3/655	3/652	3/720	3/577	3/529	3/500	3/488
اندازه نانوذرات (نانومتر) در تقریب جرم مؤثر	1/539	1/591	1/593	1/539	1/651	1/707	1/738	1/751

از رشد باکتری اشرشیاکولی و سودوموناس آئروژینوزا را در اطراف دیسک‌های بارگذاری شده از نانوذرات سلنید روی با حجم ۱۴۰ میکرولیتر در $pH=10/2$ و $pH=11/2$ و زمان تابش ۶ دقیقه دقیقه نشان می‌دهد، که مؤید ایجاد هاله واضح ممانعت از رشد بر روی محیط کشت مولر- هیتون آگار در اطراف دیسک واتمن می‌باشد.

زیست‌آزمون خاصیت آنتی‌باکتریایی نانوذرات سلنید روی علیه باکتری‌های گرم منفی اشرشیا کولی و سودوموناس آئروژینوزا به روش انتشار دیسک قبل از تلقیح باکتری و انجام زیست‌آزمون نانوذرات، تست‌های کنترل مثبت و منفی به ترتیب به منظور اعتبارسنجی صحت عملکرد باکتری و استریل بودن نانوذرات انجام شده است. شکل (۱-الف و ب) به صورت نوعی هاله ممانعت



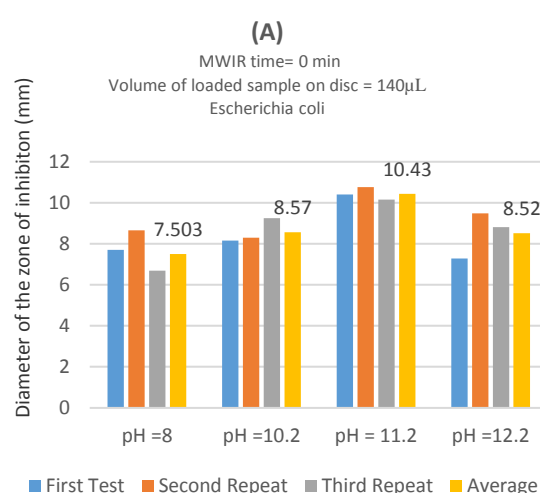
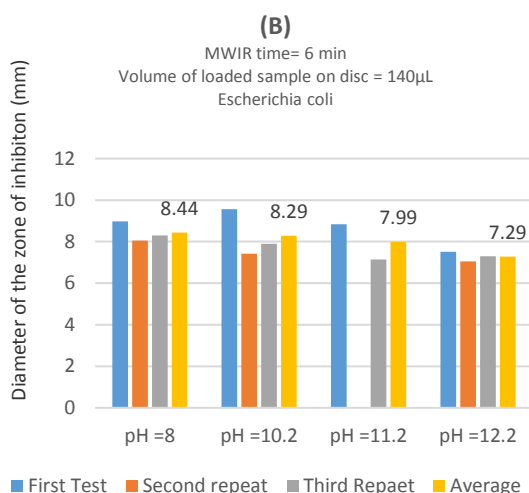
شکل ۱ (الف) تصویر نوعی منطقه مهار رشد باکتری اشرشیاکولی در اطراف دیسک‌های بارگذاری شده با غلظت ۱۴۰ میکرولیتر از حجم نانوذرات سلنید روی با $pH=10/2$ و $pH=11/2$ در زمان تابش ۶ دقیقه، (ب) تصویر نوعی منطقه مهار رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا در اطراف دیسک‌های بارگذاری شده با غلظت ۱۴۰ میکرولیتر از حجم نانوذرات سلنید روی با $pH=10/2$ و $pH=11/2$ در زمان تابش ۶ دقیقه

این در حالی است که با افزایش مقدار pH به ۱۲/۲، این روند ادامه نمی‌یابد. هم‌چنین با افزایش زمان تابش میکروویو از صفر به شش دقیقه، طبق نمودار B-۲ شاهد کاهش مقدار نفوذپذیری نانوذرات با افزایش مقدار pH از ۸ تا ۱۲/۲ می‌باشیم. می‌توان نتیجه گرفت که با رشد نانوذرات و افزایش مقادیر pH، میزان نفوذ پذیری آن‌ها به دیواره سلولی باکتری اشرشیاکولی کاهش یافته‌است.

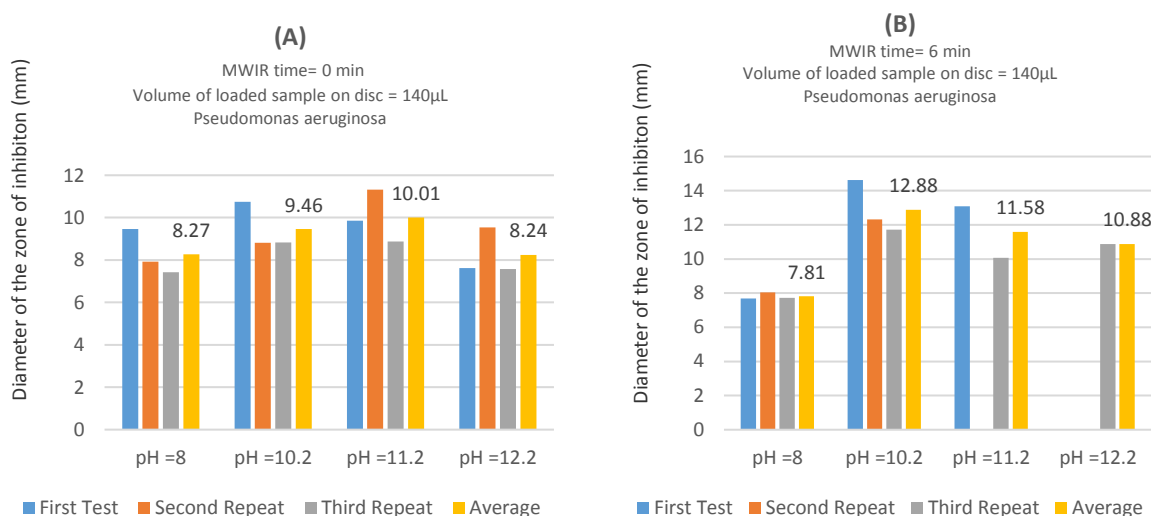
جدول (۲) جزئیات نمونه‌ها، باکتری‌ها و اندازه‌های قطر هاله‌های ممانعت از رشد را نشان می‌دهد. طبق داده‌های این جدول، شکل (۲) نمودار هیستوگرام فعالیت ضد باکتری نانوذرات علیه باکتری اشرشیاکولی را نشان می‌دهد. طبق نمودار A-۲، با افزایش مقدار pH از ۸ تا ۱۱/۲ و در زمان تابش میکروویو صفر دقیقه، خاصیت آنتی باکتریال نانوذرات نیز افزایش می‌یابد و بیشترین هاله ممانعت از رشد باکتری اشرشیاکولی در pH=۱۱/۲ مشاهده می‌گردد.

جدول ۲ شعاع هاله عدم رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس در حضور نانوذرات سلنید روی با غلظت بارگذاری برابر ۱۴۰ میکرولیتر در ۱۲/۲، ۱۱/۲، ۱۰/۲، ۸ pH و زمان‌های تابش میکروویو صفر و شش دقیقه

نمونه ZnSe		شعاع هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون (mm)							
		زمان تابش میکروویو صفر دقیقه				زمان تابش میکروویو شش دقیقه			
		pH=۸	pH=۱۰/۲	pH=۱۱/۲	pH=۱۲/۲	pH=۸	pH=۱۰/۲	pH=۱۱/۲	pH=۱۲/۲
باکتری اشرشیاکولی	تکرار اول	۷/۱۶	۸/۱۶	۱۰/۴۰	۷/۲۹	۸/۹۸	۹/۵۶	۸/۸۴	۷/۵۲
	تکرار دوم	۸/۶۶	۸/۳۰	۱۰/۷۶	۹/۴۸	۸/۰۶	۷/۴۲	-	۷/۰۵
	تکرار سوم	۶/۶۹	۹/۲۵	۱۰/۱۵	۸/۸۱	۸/۳۰	۷/۹۰	۷/۱۵	۷/۳۰
میانگین قطر هاله عدم رشد		۷/۵۰	۸/۵۷	۱۰/۴۳	۸/۵۲	۸/۴۴	۸/۲۹	۷/۹۹	۷/۲۹
باکتری سودوموناس آنروژینوزا	تکرار اول	۹/۴۷	۱۰/۷۴	۹/۸۵	۷/۶۲	۷/۶۸	۱۴/۶۳	۱۳/۰۹	-
	تکرار دوم	۷/۹۲	۸/۸۱	۱۱/۳۲	۹/۵۴	۸/۰۵	۱۲/۳۱	-	-
	تکرار سوم	۷/۴۲	۸/۸۳	۸/۸۷	۷/۵۷	۷/۷۲	۱۱/۷۲	۱۰/۰۷	۱۰/۸۸
میانگین قطر هاله عدم رشد		۸/۲۷	۹/۴۶	۱۰/۰۱	۸/۲۴	۷/۸۱	۱۲/۸۸	۱۱/۵۸	۱۰/۸۸



شکل ۲ نمودار مقایسه‌ای میزان حساسیت آنتی باکتریایی نانوذرات رشد یافته در ۱۲/۲، ۱۱/۲، ۱۰/۲، ۸ pH در حجم بارگذاری نانوذرات ۱۴۰ میکرومتر علیه باکتری اشرشیاکولی، (A) برای زمان تابش میکروویو صفر دقیقه، (B) برای زمان تابش میکروویو شش دقیقه



شکل ۳ نمودار مقایسه‌ای میزان حساسیت آنتی باکتریایی نانوذرات رشد یافته در pH=۸، ۱۰/۲، ۱۱/۲ و ۱۲/۲ در حجم بارگذاری نانوذرات ۱۴۰ میکرومتر علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا، (A) برای زمان تابش میکروویو صفر دقیقه، (B) برای زمان تابش میکروویو شش دقیقه

است [13-16].

نتیجه‌گیری

ارزیابی نتایج زیست‌آزمون انتشار دیسک نانوذرات سلنید روی سنتز شده در pHهای مختلف و در دو زمان تابش میکروویو صفر و شش دقیقه علیه باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکولی، سودوموناس آئروژینوزا حاکی از حساسیت به قطر نانوذرات است. همچنین اثر خواص آنتی باکتریایی نانوذرات بر روی هر دو باکتری مورد بررسی متفاوت بوده و به‌طور کلی خاصیت آنتی باکتریال نانوذرات روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا بیشتر بوده است که این موضوع را می‌توان با توجه به ساختار دیواره سلولی باکتری‌های مورد آزمایش توجیه کرد. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که ویژگی ضد باکتری نانوذرات مطالعه شده، آن‌ها را به‌عنوان گزینه‌های مناسبی در کاربردهای زیستی و پزشکی معرفی می‌کند.

قدردانی

از حمایت‌های دانشگاه ملایر و همچنین از سرکار خانم دکتر حدیث طوافی به پاس در اختیار قرار دادن باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش تشکر و قدردانی می‌گردد.

طبق شکل (A و B)، در زمان تابش میکروویو صفر دقیقه با افزایش مقدار pH از ۸ تا ۱۱/۲، خاصیت آنتی باکتریایی نانوذرات در ممانعت از رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا نیز افزایش یافته است اما این روند با افزایش pH به مقدار ۱۲/۲ دیده نمی‌شود. با افزایش زمان تابش میکروویو از صفر به شش دقیقه، به‌طور کلی خواص آنتی باکتریایی نانوذرات سلنید روی در pH=۱۱/۲ و ۱۲/۲ نسبت به زمان تابش صفر دقیقه افزایش یافته است. می‌توان نتیجه گرفت خواص آنتی باکتریال نانوذرات سلنید روی در غلظت ۱۴۰ میکرولیتر علیه مقاومت باکتری سودوموناس آئروژینوزا عموماً با افزایش اندازه نانوذرات افزایش می‌یابد و بیشترین تأثیر باکتری‌کشی مربوط به pH=۱۰/۲ و زمان تابش ۶ دقیقه با شعاع هاله ۱۲/۸۸ میلی‌متر می‌باشد که به تدریج با افزایش اندازه نانوذرات خاصیت آنتی باکتریایی نانوذرات علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا کاهش یافته است. لازم به ذکر است که انتظار می‌رود با افزایش اندازه نانوذرات و کاهش احتمال نفوذ آن‌ها به دیواره سلولی باکتری‌ها، قطر هاله‌های عدم رشد باکتری کاهش یابد؛ اما باید توجه داشت که رشد باکتری‌ها به pH محیط کشت مولر- هیتون- آگار و شرایط محیطی نیز به شدت وابسته

مراجع

1. Sriram, M. I., Kalishwaralal, K., Barathmanikant, S., Gurunathani, S., "Size-Based Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Bovine Retinal Endothelial Cells", *Nanoscience Methods*, Vol. 1, No. 1, pp. 56-77, (2012).
2. Selvam, S., Gandhi, R. R., Suresh, J., Gowri, S., Ravikumar, S., Sundrarajan, M., "Antibacterial Effect of Novel Synthesized Sulfated β -Cyclodextrin Crosslinked Cotton Fabric and its Improved Antibacterial Activities with ZnO, TiO₂ and Ag Nanoparticles Coating", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 434, No. 1-2, pp. 366-374, (2012).
3. Ghaznavi-Rad, E., Shamsudin, M. N., Sekawi, Z., Khoon, L. Y., Aziz, M. N., Hamat, R. A., Neela, V., "Predominance and Emergence of Clones of Hospital-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Malaysia", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 48, No. 3, pp. 867-872, (2010).
۴. احمدیان، کبری، "اثر pH و زمان تابش بر خواص نوری و ساختاری نانوبلورهای ZnSe سنتز شده به روش تابش مایکروویو"، پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیک حالت جامد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر، (۱۳۹۶).
5. Souri, D., Sarfehjou, M., Khezripour, A. R., "The effect of ambient Temperature on the Optical Properties and Crystalline Quality of ZnSe and ZnSe: Cu NCs Grown by Rapid Microwave Irradiation", *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, Vol. 29, pp. 3411-3422, (2018).
6. Hopfield, J. J., "Theory of the Contribution of Excitons to the Complex Dielectric Constant of Crystals", *Physical Review*, Vol. 112, No. 5, pp.1555-1561, (1958).
7. Jiang, X., Xie, Y., Lu, J., Zhu, L., He, W., Qian, Y., "Simultaneous in Situ Formation of ZnS Nanowires in a Liquid Crystal Template by γ -irradiation", *Chemistry of Materials*, Vol. 13, No. 4, pp. 1213-1218, (2001).
8. Driscoll, A. J., Bhat, N., Karron, R. A., O'Brien, K. L., Murdoch, D. R., "Disk Diffusion Bioassays for the Detection of Antibiotic Activity in Body Fluids: Applications for the Pneumonia Etiology Research for Child Health Project", *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 54, pp.159-164, (2012).
9. Kwamboka, B., Omwoyo, W., Oyaro, N., "Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of ZnS Nanoparticles", *Indian Journal of Nanoscience*, Vol. 4, No. 2, pp. 1-6, (2016).
10. Jafari, A., Ghane, M., Arastoo, S., "Synergistic Antibacterial Effects of Nano Zinc Oxide Combined with Silver Nanocrystals", *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5, pp. 5465-5473, (2011).
11. Edwards, A. J., Klug, H. P., Alexander, L. E., "X-Ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials", *Wiley-Interscience, New York, 2nd Edn.*, pp. 966-983, (1975).
12. Singh, A. K. Viswanath, V. Janu, V. C., "Synthesis, Effect of Capping Agents, Structural, Optical and Photoluminescence Properties of ZnO Nanoparticles", *Journal of Luminescence*, Vol. 129, No. 8, pp.874-878, (2009).
13. Gilbert, R. J., "Bacillus Cereus", In H. Riemann and F. L., Bryan (Eds), "Food-borne Infections and Intoxications", 2nd Ed, Academic Press, New York, pp. 495-514. (1979).
14. Griffiths, M. W., Schraft, H., "Bacillus Cereus Food Poisoning", In Cliver, D.O., Riemann, H.P. (Eds.),

- "Foodborne Diseases", 2nd Ed, Academic Press, New York, NY., pp. 261–270, (2002).
15. Schraft, H., Griffiths, M.W., "Bacillus Cereus Gastroenteritis", In H. Riemann and D.O. Cliver (Eds). "Foodborne Infections and Intoxications", 3rd Ed, Academic Press, New York, NY., pp. 561–582. (2006).
16. Wijnands, L. M., Dufrenne, J. B., Zwietering, M. H., van Leusden, F. M., "Spores from Mesophilic Bacillus Cereus Strains Germinate Better and Grow Faster in Simulated Gastro-Intestinal Conditions than Spores from Psychrotrophic Strains", *International Journal of Food Microbiology* 112, pp.120–128, (2006).

Synthesis and Study of the pH Effect on the Antibacterial Activity of ZnSe Nanoparticles Against the Escherichia Coli and Pseudomonas Aeruginosa Gram-Negative Bacteria by Using Disc-Diffusion Bioassay

Dariush Sour¹ Saeid Mohaghegh Nejad²

Mehdi Ghabooli³

1. Introduction

Zinc Selenide (ZnSe) nanoparticles are II-IV semiconductors owing a direct bulk band gap energy (~2.72 eV) and beneficial in several applications such as lighting technology of LEDs, solar cells, sensors and biological applications. Several preparation methods such as sol-gel, co-precipitation, sonochemical, hydrothermal methods have been introduced to synthesis of ZnSe nanoparticles. Recently, aqueous microwave-assisted method which employs the microwave irradiation (MWIR) as up to down mechanism, is an eco-friendly synthesis method, rapid, and tunable to narrow size distribution. The present work aims to synthesis the ZnSe nanoparticles by aqueous method at pHs of 8, 10.2, 11.2 and 12.2 and investigate their growth by microwave irradiation at the times of 0 and 6 minutes; also, to detect and discuss their antibacterial potential. Antibacterial properties of nanoparticles were investigated by using disc diffusion method (in solid Muller-Hinton-Agar culture) against the Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa gram-negative bacteria in the loading volume of 140 μ L of nanoparticles.

2. Experimental procedure

To synthesis ZnSe NCs by aqueous method, at first, Se ions source is prepared from the reaction between NaBH_4 and Selenium powder. Besides, zinc acetate was dissolved in 150 ml of DI water and solution of Zn ions source is prepared. At this stage, thioglycolic acid (TGA) and NaOH solutions are used as capping agent and pH regulator, respectively. Finally, Zn ions source solution is added (injected) drop by drop to Se ions source, and so the zinc selenide nanoparticles are fabricated. Next, in order to detect the antibacterial activity of ZnSe nanoparticles, Agar disc-diffusion bio-assay is employed. In Agar disc-diffusion method, to provide the solid culture, 4.2 g Mueller-Hinton-

Broth powder (MHB) with 3g of agar powder have been dissolved in 200 ml of DI water; the obtained solution was poured on the same petri-dishes at same volumes. then, petri-dishes containing agar plates are swabbed with a standardized inoculum of the test bacteria of E. coli and P. aureginosa. Then, Wattman filter paper discs feed with the desired volume (140 μ L) of nanomaterial samples (ZnSe nanoparticles fabricated at pH's of 8.0, 10.2, 11.2 and 12.2) as antibacterial candidates, are added on the agar surface. Generally, antibacterial agent can penetrates into the agar and inhibits spread and growth of the test bacteria, resulting to a zone of inhabitation and probably bactericidal effect with an obvious diameter; then the diameters of inhibition zones are measured and discussed. Inoculated petri-dishes were incubated at 37 °C for 18 h. After incubation, the diameter of inhibition zones around the discs were measured in millimeter scale. Nanomaterial samples were tested three times and the results were averaged. Finally, the effect of pH of soultions containing ZnSe nanoparticles on the diameter of inhibition zone was investigated.

3. Results

In the present research, ZnSe nanoparticles were synthesized by aqueous method at pHs of 8, 10.2, 11.2 and 12.2 and were grown by microwave irradiation at the times of 0 and 6 minutes. Antibacterial properties of these nanoparticles have been carried out by using disc diffusion method (in solid Muller-Hinton-Agar culture) against the Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa gram-negative bacteria in the loading volume of 140 μ L of nanoparticles.

As shown in Figs. 1 and 2, by increasing the radiation time from 0 to 6 min, bacterial growth inhibition zone increased for Pseudomonas aeruginosa bacteria in compare with Escherichia coli bacteria; the highest antibacterial activity is devoted to the cases of pH=10.2 and 11.2, and these samples can be introduced as new agents in the field of nano-biotechnology applications.

4. Conclusions

Results of antibacterial tests on the ZnSe nanoparticles synthesized at pHs of 8, 10.2, 11.2 and 12.2 under the MWIR times of 0 and 6 min showed that by increasing the radiation time from 0 to 6 min, bacterial growth inhibition zone increased for Pseudomonas aeruginosa bacteria in compare with Escherichia coli bacteria; the highest antibacterial activity is devoted to

¹ Corresponding author: Professor, Faculty of Science, Department of Physics, Malayer University.
Email: d.souri@gmail.com

² M.Sc. Student Faculty of Science, Department of Physics, Malayer University.

³ Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Malayer University.

the cases of pH=10.2 and 11.2, and these samples can be introduced as new agents in the field of nano-biotechnology applications.

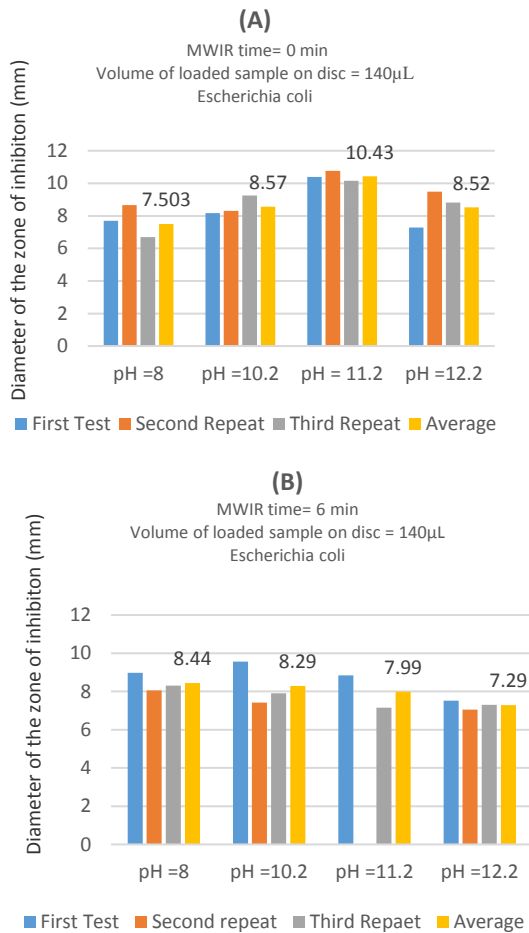


Figure 1. Antibacterial sensitivity comparative plot of nanoparticles grown at pH= 8, 10.2, 11.2 and 12.2 for 140 µl nanoparticle loading volume against E. coli, (A) for MWIR time = 0 min and , (B) for for MWIR time = 6 min .

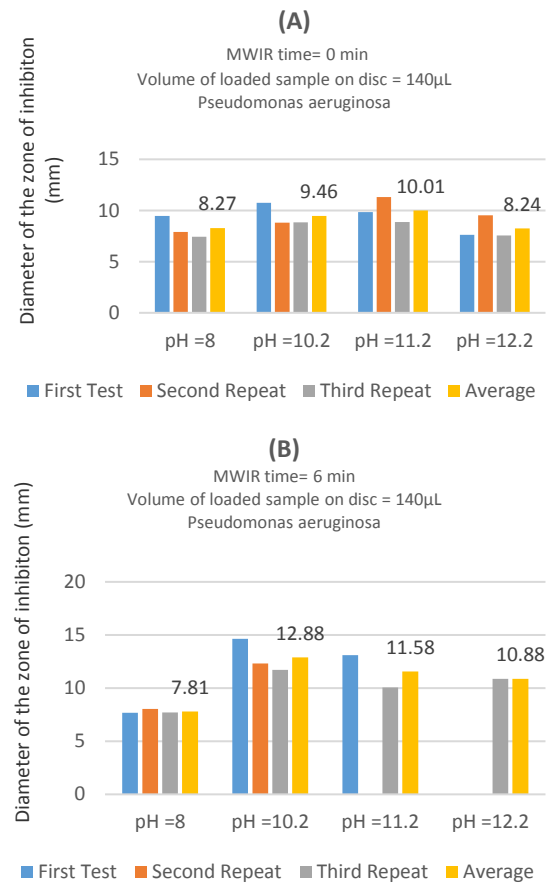


Figure 2. Antibacterial sensitivity comparative plot of nanoparticles grown at pH= 8, 10.2, 11.2 and 12.2 for 140 µl nanoparticle loading volume against P. aeruginosa, (A) for MWIR time = 0 min and , (B) for for MWIR time = 6 min .