

Biosynthesis of antibacterial nanoparticles reduced graphene oxide by green macro-algae *Ulva flexuosa*

Soolmaz Soleimani¹, Arash Ghaderi², Morteza Yousefzadi^{3*}, Hamid Saberi⁴,
Somayeh Dianat²

¹Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

²Department of Chemistry, College of Sciences, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

³Department of Biology, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran

⁴Department of Geotechnical, Faculty of Engineering, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

Received: 17 May 2021 Accepted: 2 July 2021

Abstract

Background and Aim: The growing concerns about antibiotic-resistant bacterial strains reveal the urgent need to discover and develop new types of antibacterial agents. Therefore, the aim of the current study is to present a new generation of new antibacterial nanoparticles for industrial medical applications.

Methods: In this experimental study, the biosynthesis process of graphene nanoparticles was performed using an aqueous extract of green algae of *Ulva flexuosa*. Then the antibacterial activity was evaluated by two methods of determining the diameter of the growth inhibition zone and determining the minimum inhibition concentration on gram-positive and gram-negative bacterial strains.

Results: The results of characterization analyses of graphene oxide reduction with the aqueous extract of the green alga *U. flexuosa* and its conversion to graphene were confirmed. Evaluation of the antibacterial activity of the samples showed that the aqueous extract of green algae and reduced graphene oxide had antibacterial activity, while graphene oxide had no antibacterial activity.

Conclusion: The results of this study showed that reduced graphene oxide by green macro-algae can be introduced as a new antibacterial to the pharmaceutical field and medicine.

Keywords: Antibacterial, Green macro-algae, Graphene oxide, Green synthesis

*Corresponding author: Morteza Yousefzadi, Email: Morteza110110@gmail.com
Address: Department of Biology, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran

سنتز زیستی نانوذرات ضدباکتریایی اکسیدگرافن احیا شده با ماکرو جلبک سبز *Ulva flexuosa*

سولماز سلیمانی^۱، آرش قادری^۲، مرتضی یوسفزادی^{۳*}، حمید صابری^۴، سمیه دیانت^۲

^۱ گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

^۲ گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

^۳ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

^۴ گروه عمران، دانشکده مهندسی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۲/۲۷ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۴/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: رشد روزافزون نگرانی‌ها در ارتباط با سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها نیاز مبرم به کشف و توسعه انواع جدیدی از عوامل ضدباکتریایی را آشکار می‌سازد. از این رو هدف از این مطالعه، ارائه نسل جدیدی از نانو ذرات جدید ضدباکتریایی برای کاربردهای پزشکی صنعتی است.

روش‌ها: در مطالعه آزمایشگاهی حاضر، ابتدا فرایند سنتز زیستی نانوذرات گرافن با استفاده از عصاره آبی جلبک سبز *Ulva flexuosa* انجام شد. در ادامه ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی با دو روش آزمون تعیین قطر هاله عدم رشد و تعیین حداقل غلظت کشندگی بر روی سویه‌های باکتری گرم مثبت و گرم منفی صورت پذیرفت.

یافته‌ها: نتایج مربوط به آنالیزهای مشخصه‌یابی احیای اکسیدگرافن به کمک عصاره آبی جلبک سبز *U. flexuosa* و تبدیل آن به گرافن را تایید کرد. ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد که عصاره آبی جلبک سبز و اکسیدگرافن احیا شده دارای فعالیت ضدباکتریایی هستند، این در حالی است که اکسیدگرافن فاقد فعالیت ضدباکتریایی بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که اکسیدگرافن احیا شده با جلبک سبز را می‌توان به عنوان یک ترکیب ضدباکتریایی جدید به حوزه دارو و درمان معرفی کرد.

کلیدواژه‌ها: ضدباکتری، ماکرو جلبک سبز، اکسیدگرافن، سنتز زیستی.

*نویسنده مسئول: مرتضی یوسفزادی. پست الکترونیک: Morteza110110@gmail.com

آدرس: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

مقدمه

در سال‌های اخیر، به دلیل مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک، ایجاد ماده آنتی‌بیوتیکی مورد بحث قرار گرفته است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سراسر جهان گسترش یافته و زندگی امروزه ما را تهدید می‌کند (۱). گزارش شده که مقاومت آنتی‌بیوتیکی باعث جهش در ساختار ژنومی و در نتیجه تغییر فنوتیپ باکتری‌ها برای کاهش کارایی آنتی‌بیوتیک و ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌شود (۲، ۳).

اخیراً بسیاری از محققان به مزایای اکسیدگرافن و تطبیق‌پذیری آن در تحویل دارو و منابع زیستی پی برده‌اند. اکسیدگرافن متشکل از یک ماده معمولی دو بُعدی از اتم‌های کربن است که به صورت انبوه در یک شبکه بلوری زنبوری قرار گرفته و به عنوان ماده امیدوارکننده‌ای برای تهیه کامپوزیت‌های جدید در دهه گذشته مورد استفاده قرار گرفته است. علاوه بر این، گزارش شده که اکسیدگرافن و ترکیبات آن دارای عوامل ضد میکروبی، ضدباکتریایی و ضدقارچی هستند. چندین مطالعه با استفاده از مکانیسم فیزیکی و شیمیایی، خواص آنتی‌بیوتیکی موثر را نشان داده‌اند. محققان ادعا کرده‌اند که ساختار لایه‌ای اکسیدگرافن می‌تواند غشای باکتری را بپیچاند و باعث استرس اکسیداتیو در سطح پایه شود، بنابراین به غشای سلولی آسیب می‌رساند. وقتی غشای باکتری در معرض گرافیت یا اکسیدگرافن قرار بگیرد، اکسیداسیون گلوکاتیون، یک آنتی‌اکسیدان مهم سلولی، رخ می‌دهد (۴، ۵).

علاوه بر نیاز به فعالیت ضدباکتریایی بالا و گسترده، نانومواد میکروبی باید با محیط زیست سازگار بوده، سمیت کمی داشته و از روش‌های سنتز سبز استفاده نمایند. در سال‌های اخیر، موضوع سنتز سبز بسیار مورد توجه قرار گرفته، زیرا می‌تواند مسیر جدیدی را برای محصولات شیمیایی ایجاد کند که با فرآیند احیا یا اکسیداسیون، استفاده یا تولید مواد خطرناک انجام می‌شود (۵). با پیشرفت فناوری نانو، اصول شیمی سبز در سنتز و کاربردهای نانو استفاده شده است. در استراتژی سبز مواد در مقیاس نانو، دو جنبه از جمله استفاده از مواد شیمیایی غیرسمی و حلال‌های سازگار با محیط‌زیست توجه زیادی را به دلیل مزیت آنها در کاهش خطر محیط‌زیست جلب کرده است. از این لحاظ، نانومواد سازگار برای کاربردهای امیدوارکننده در تصویربرداری زیستی، سنجش‌های زیستی و توسعه داروهای زیستی بسیار پراهمیت است (۲).

تاکنون مطالعات بسیاری به خواص ضدباکتریایی جلبک‌های دریایی به‌ویژه جلبک‌های سبز *Ulva* اذعان کرده‌اند، به نحوی که، عصاره‌های آبی، متانولی، اتیل استاتی و نیز نانوذرات بیوسنتز شده نقره از طریق این گروه از جلبک‌ها خواص ضدباکتریایی قوی را به نمایش گذاشته‌اند (۶-۸). لذا این فرض محتمل است که بهره‌گیری این گروه از جلبک‌های سبز در تولید زیستی نانوذرات گرافن بتواند توان ضدباکتریایی بالایی را به نمایش بگذارد. در این راستا، در تحقیق حاضر و طی اقدامی پیشگام در بحث سنتز زیستی نانوذرات

گرافن با استفاده از عصاره آبی جلبک سبز *Ulva flexuosa* هدف‌گیری شد و در ادامه ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات گرافن زیستی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

نمونه‌برداری

ماکرو جلبک سبز گونه *U. flexuosa* در پاییز سال ۱۳۹۶ از سواحل بندرعباس با موقعیت جغرافیایی $56^{\circ}19'14''$ E و $27^{\circ}10'58''$ N در هنگام بیشینه جزرومد جمع‌آوری شد. ماکرو جلبک مورد استفاده در این مطالعه با کمک کلید شناسایی معتبر شناسایی و یک نمونه با کد هر بار یوم ۳۰۳۰ در دانشگاه هرمزگان نگهداری گردید (۹). جهت حذف شن و ماسه و اپی‌فیت‌ها، نمونه‌ها یک‌بار در آب دریا و سپس با آب مقطر شسته شدند. ماکرو جلبک‌ها در دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز خشک و سپس آسیاب شدند.

سنتز اکسیدگرافن

سنتز اکسیدگرافن با روش مارکانو انجام شد. به‌طور خلاصه، به یک گرم گرافیت، ۱۳۴ میلی‌لیتر مخلوطی از اسید سولفوریک / اسید فسفریک (۹: ۱) اضافه و در دمای اتاق برای ۲ ساعت روی استیرر قرار گرفت تا محلول همگنی به دست آید. سپس، ۶ گرم پرمنگنات پتاسیم به آرامی در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مخلوط اضافه شد. در این لحظه به آرامی رنگ محلول به سبز تیره تبدیل و در همین وضعیت برای ۱۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا به خوبی مواد مخلوط شوند. پس از گذشت این مدت، مخلوط به رنگ قهوه‌ای تبدیل و در دمای اتاق خنک شد. سپس به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر خنک اضافه شد و دما تا ۸۳ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و مخلوط برای ۳۰ دقیقه روی استیرر قرار گرفت. پس از آن آب اکسیژنه ۳۵ درصد به آرامی به مخلوط اضافه و برای ۳۰ دقیقه دیگر روی استیرر قرار گرفت. به محض اضافه کردن آب اکسیژنه تغییر رنگ زرد مشاهده گردید. در نهایت، مخلوط ابتدا با اسید کلریدریک ۱۰ درصد و سپس با آب مقطر شستشو داده شد تا به pH خنثی برسد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت خشک شد (۱۰).

سنتز اکسیدگرافن احیا شده با ماکرو جلبک سبز

جهت احیای اکسیدگرافن ابتدا ۶ گرم ماکرو جلبک سبز در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و برای ۲۰ دقیقه جوشانده و با کاغذ صافی شماره یک صاف شد. سپس، ۳۰ میلی‌گرم اکسیدگرافن در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و برای ۹۰ دقیقه سونیکیت شد. سپس ۸۰ میلی‌لیتر عصاره بدست آمده از مرحله قبل به آن اضافه و مخلوط حاصل برای ۳۰ دقیقه سونیکیت شد. سپس مخلوط در

جداگانه آماده شد، سپس سوسپانسیون‌ها با محیط کشت مایع استریل شده ۱ به ۱۰۰ رقیق شدند.

جهت انجام آزمون، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع استریل در ارلن‌هایی با حجم ۵۰ میلی‌لیتر ریخته شد. سپس غلظت‌های مختلفی از نانوذرات سنتز شده (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵ و ۱۵/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به ارلن‌های جدا اضافه گردید. در آخر به تمامی ارلن‌ها ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری رقیق شده اضافه شد. برای هر غلظت به طور جداگانه نمونه مرجع (بدون حضور باکتری)، همچنین کنترل منفی (بدون حضور نانوذرات) در نظر گرفته شد. تمامی ارلن‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با دور ۱۲۰ rpm برای ۲۴ ساعت قرارگرفتند. بعد از طی این زمان کدورت همه ارلن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر ثبت شد (۱۳).

نتایج

آنالیز مشخصه‌یابی نانوذرات سنتز شده

نتایج آنالیز و بررسی ساختار بلوری و تشخیص فاز اکسیدگرافن از طریق دستگاه پراش پرتو ایکس در شکل-۱ نشان داده شده است. بر اساس الگوی طیفی پراش پرتو ایکس مربوط به اکسیدگرافن سنتز شده زوایای پراش ۲θ در ۱۱/۳۷، ۲۶/۶۱ و ۴۲/۶۵ به ترتیب مربوط به صفحات (۰۰۲)، (۰۰۲) و (۱۰۲) است. الگوی پراش پرتو ایکس در شکل ۱- الف تغییرات ساختاری اکسیدگرافن را برای تشکیل اکسیدگرافن احیا شده تأیید می‌کند. الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به ماکروجلبک سبز به عنوان عامل احیاکننده نشان می‌دهد (شکل ۱- ب) که پیک حاصل از صفحه (۰۰۲) در اکسیدگرافن به صورت یک پیک آشکار به $2\theta = 26^\circ$ درجه جابه‌جا شده است که نشان‌دهنده احیا شدن اکسیدگرافن و تبدیل آن به گرافن است. میانگین اندازه ذرات مطابق با رابطه دبای- شرر بدست آمد. اندازه ذرات اکسیدگرافن ۱۹/۲۶ نانومتر و اکسیدگرافن احیا شده ۸۱/۶ نانومتر محاسبه شد. نتایج نشان داد که بعد از احیا اکسیدگرافن با ماکروجلبک سبز اندازه ذرات افزایش یافته است.

برای مقایسه ریخت‌شناسی اکسیدگرافن و اکسیدگرافن احیا شده با ماکروجلبک سبز از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی استفاده شده است. شکل-۲ نشان می‌دهد که نمونه سنتز شده به صورت صفحه‌ای است و به دلیل پدیده کلوخه شدن بعضی از صفحات آنها به هم متصل شده‌اند. قطر تقریبی صفحات در اکسیدگرافن در محدوده ۳۳/۴۹ تا ۴۹/۱۲ نانومتر و اکسیدگرافن احیا شده با ماکروجلبک سبز در محدوده ۴۶/۸۶ تا ۷۱/۴۶ نانومتر متغیر است.

دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت قرارگرفت. بعد از ۲۴ ساعت، مخلوط به رنگ سیاه تغییر رنگ داد. بعد از خنک شدن مخلوط در دمای محیط در دور ۱۵۰۰۰rpm برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت نمونه چندین بار با آب مقطر و اتانول شستشو شد. رسوب نهایی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. این رسوب را اکسیدگرافن احیا شده می‌نامیم (۱۱). در آخر، برای سنجش نانوذرات سنتز شده از طیف‌سنجی پراش پرتو ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترون روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) استفاده شد.

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی

جهت بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های سنتز شده از دو روش تعیین قطر هاله عدم رشد به روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت کشندگی به روش تراکم نوری استفاده شد.

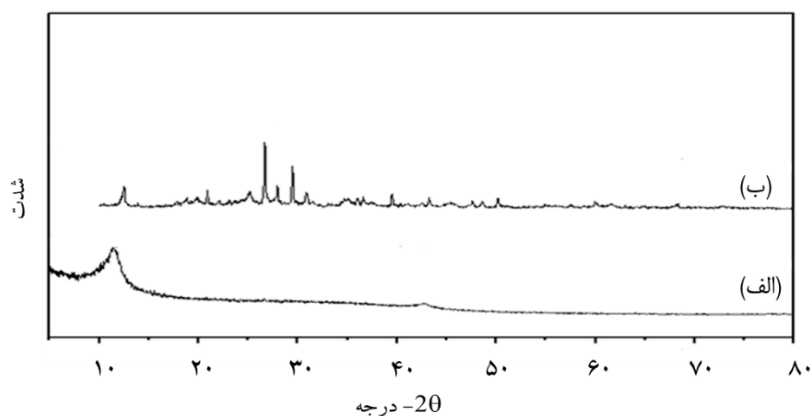
تعیین قطر هاله عدم رشد به روش انتشار دیسک

به منظور ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده از ۴ سویه باکتری *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)، *Vibrio harveyi* (ATCC 35084)، *Escherichia coli* (ATCC 25922) و *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) استفاده شد.

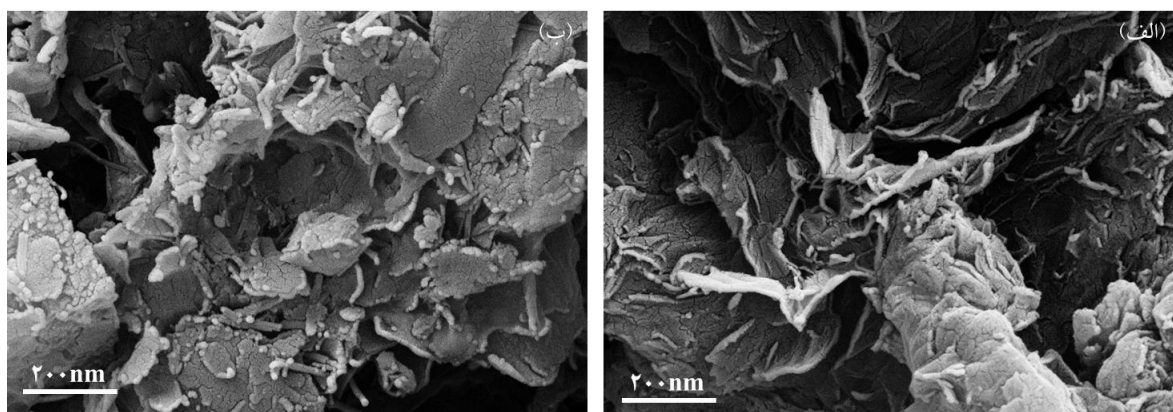
برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده از روش انتشار دیسک استفاده شد. برای این منظور ابتدا غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر نمونه ساخته و دیسک‌ها برای ۲۴ ساعت در آن خیس‌اند شدند (بر روی شیکر). سپس، از هر باکتری به روش خطی، پلیت تهیه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا باکتری‌ها کاملاً رشد کنند. سپس از این کشت رقتی معادل نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$) تهیه شد. پس از تلقیح باکتریایی (کشت چمنی سوسپانسیون‌های باکتریایی به وسیله‌ی سوآپ استریل) روی محیط آگار، دیسک‌های خیس‌انده شده روی پلیت قرار داده شد. قطر هاله‌های عدم رشد باکتری بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد (۱۲).

تعیین حداقل غلظت کشندگی به روش تراکم نوری

حداقل غلظت کشندگی باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* در حضور نانوذرات سنتز شده با استفاده از تکنیک اندازه‌گیری کدورت باکتری به کمک دستگاه اسپکتروفتومتری تعیین گردید. برای انجام این آزمون، بعد از کشت جامد ۲۴ ساعته جهت فعال کردن هر یک از باکتری‌ها، یک سوسپانسیون با غلظت $10^8 \times 1/5$ باکتری بر میلی‌لیتر (معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند) از هر باکتری به طور



شکل-۱. مقایسه الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) مربوط به نمونه‌های (الف) اکسیدگرافن (ب) اکسیدگرافن احیا شده با ماکروجلبک سبز

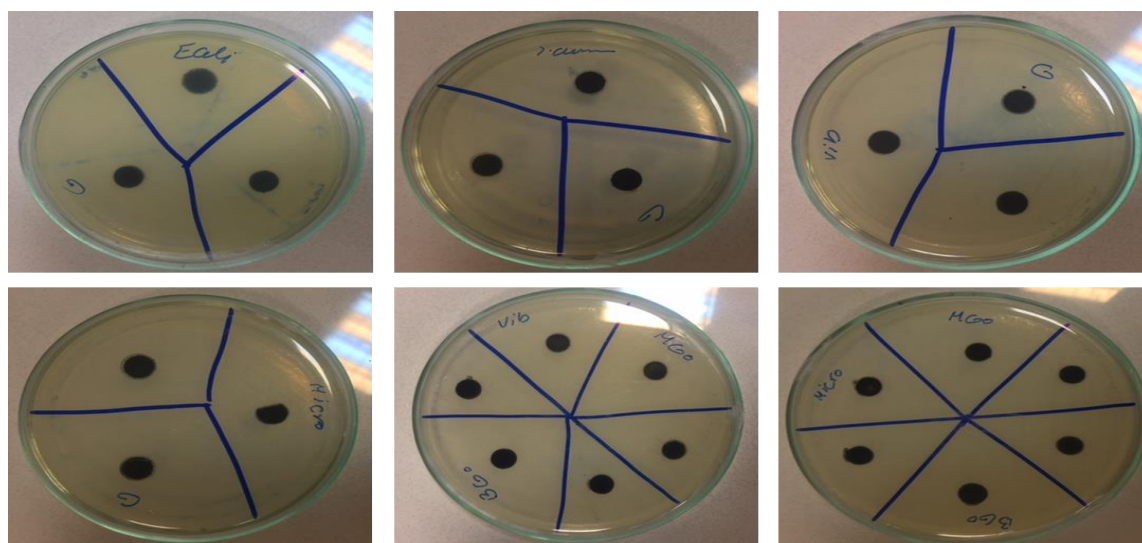


شکل-۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی نمونه‌های (الف) اکسیدگرافن (ب) اکسیدگرافن احیا شده با ماکروجلبک سبز

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی

اثر ضدباکتریایی گرافیت و اکسیدگرافن سنتز شده بر روی باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli*، *V. harveyi* و *M. luteus* با روش انتشار دیسک انجام شد. نتایج نشان داد که هیچ یک از

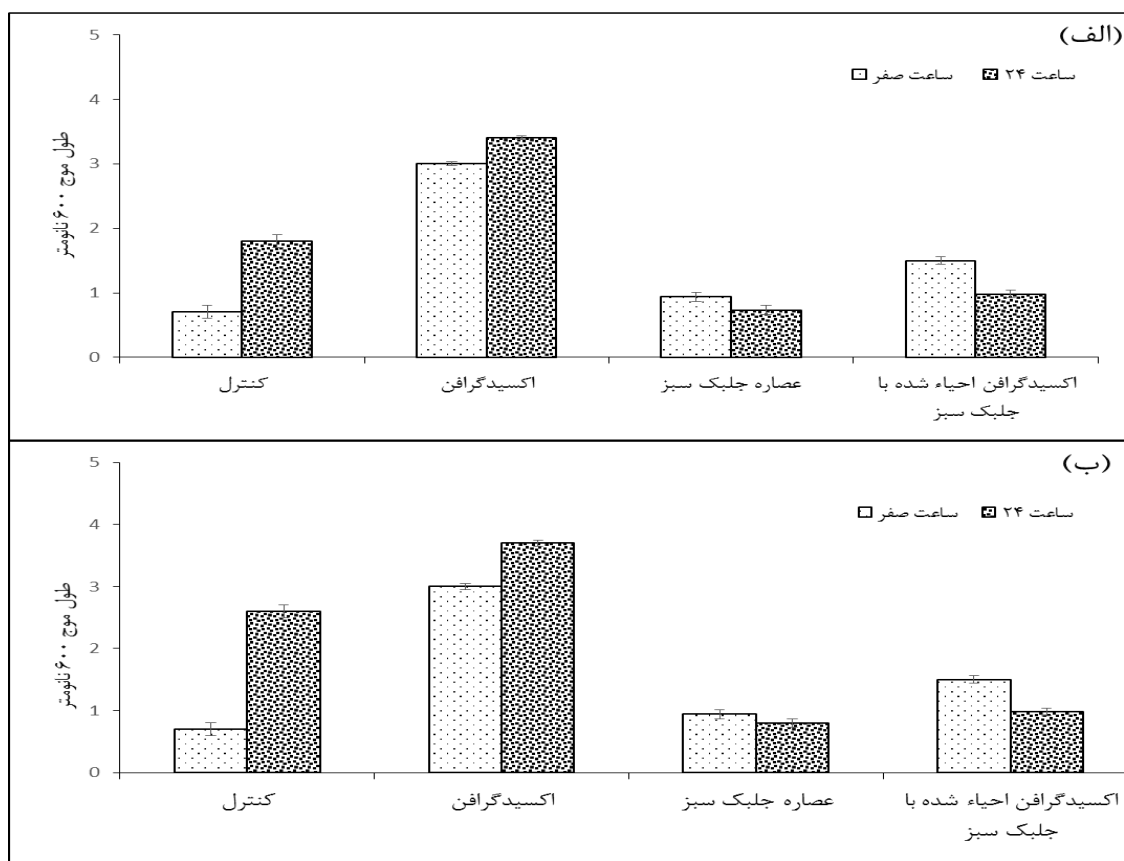
نمونه‌های گرافیت و اکسیدگرافن سنتز شده، فعالیت ضدباکتریایی را در مقابل باکتری‌های مورد آزمایش نشان ندادند. آب مقطر به عنوان نمونه مرجع استفاده شد و هیچ فعالیت ضدباکتریایی نشان نداد (شکل-۳). قطر دیسک‌های استفاده شده در این آزمون ۶ میلی‌متر بود.



شکل-۳. اثر ضدباکتریایی گرافیت و اکسیدهای گرافن سنتز شده بر روی باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli*، *V. harveyi* و *M. luteus*

هیچ یک از باکتری‌ها فعالیت ضدباکتریایی نشان نداد. نتایج حداقل غلظت کشندگی یا بازدارندگی رشد نشان داد که اکسیدگرافن احیا شده با جلبک سبز در مقابل دو باکتری *S. aureus* و *E. coli* به ترتیب در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در مقابل باکتری *E. coli* در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

نتایج فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی جلبک سبز و اکسیدگرافن احیا شده در مقایسه با اکسیدگرافن برای تعیین حداقل غلظت کشندگی به روش تراکم نوری در شکل ۴-ارائه شده است. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که عصاره آبی جلبک سبز و اکسیدگرافن احیا شده توانایی مهار رشد باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* بعد از ۲۴ ساعت دارند. در مقابل، اکسیدگرافن در برابر



شکل ۴- مقایسه‌ی اثر ضدباکتریایی نمونه‌های مختلف در مقابل الف) باکتری *S. aureus* ب) باکتری *E. coli*

هیدرات هیدرازین و احیای حرارتی اکسیدگرافن (۱۴) انجام شده است. این روش‌های شناخته شده که از مواد احیاکننده شیمیایی استفاده می‌کنند ماهیت سمی دارند و برای محیط زیست مضر هستند (۱۵-۱۷). از این‌رو، محققان بسیاری به دنبال روش‌های دوست‌دار محیط زیست و در عین حال مقرون به صرفه برای احیا اکسیدگرافن هستند. استفاده از روش‌های زیستی علاوه بر سازگار بودن با محیط زیست دارای یک مزیت منحصر به فرد در بهبود پراکندگی گرافن در آب هستند و انتظار می‌رود به دلیل وجود مولکول‌های زیستی اکسید شده در منبع زیستی، منجر به ثبات گرافن شود (۱۱).

یکی از منابع زیستی و سازگار با محیط زیست، منابع دریایی است که کم‌تر به آن توجه شده است. یکی از دلایل استفاده از منابع دریایی داشتن ترکیباتی با خواص زیستی مختلف است که علاوه بر توانایی احیای اکسیدگرافن باعث افزایش توانایی اکسیدگرافن احیا شده در کاربردهای زیستی از جمله ضدباکتریایی می‌شود. در این

بحث

در دهه‌های اخیر، نانوفناوری یکی از سریع‌ترین بخش‌های اقتصاد در کشورهای پیشرفته بوده است و محصولات این صنعت در سال‌های اخیر رشد و توسعه بسیار شگرفی داشته‌اند؛ به نحوی که در حال حاضر بخش تفکیک‌ناپذیری از حوزه‌های پزشکی دارویی، زیست‌فناوری، فرآیندهای مواد و انرژی و محیط زیست شده است.

امروزه سنتز اکسیدگرافن احیا شده با استفاده از روش‌های دوست‌دار محیط زیست یکی از روش‌های تحقیقاتی مورد علاقه در بین جامعه علمی است. اکسیدگرافن احیا شده کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف دارد. تاکنون تولید اکسیدگرافن احیا شده با روش‌های زیادی مانند احیای الکتروشیمیایی، احیای اکسیدگرافن با هیدرازین، احیای اکسیدگرافن با تیواوره، احیای اکسیدگرافن با سدیم بوروهیدرید، احیای اکسیدگرافن از طریق تنفس باکتریایی، احیای اکسیدگرافن با آسکوربیک اسید، احیای اکسیدگرافن با

جذب (انتشار فعال و جذب اندوزومی) و پاسخ سلول به نانومواد بر پایه گرافن تأثیر می‌گذارد (۳۰).

به دلیل ماهیت کربنی گرافن، لایه‌های گرافن قادر به تعامل با لیپیدهای غشای سلولی هستند. فعل و انفعالات بین سطح گرافن و دمه‌های لیپیدی می‌تواند به حدی قوی باشد که بر جاذبه‌های لیپید-لیپید غشا غلبه کند و باعث اختلال در غشای فیزیکی شود. دمه‌های فسفولیپید موجود در دو لایه سلول باکتریایی در تعامل با گرافن باعث می‌شود که گرافن وارد غشا شود که احتمالاً با ایجاد منافذ یا از طریق استخراج مولکول‌های لیپیدی به غشای سلولی نفوذ می‌کند. از بین رفتن یکپارچگی غشایی منجر به نشت ترکیبات سیتوپلاسمی از جمله RNA و الکترولیت داخل سلولی می‌شود که به نوبه خود باعث مرگ سلولی می‌گردد (۳۱). از طرفی، گرافن به دلیل انحنای سطح مناسب، دارای توانایی بالا برای اتصال با ساختارهای آلفا مارپیچی پپتیدها است (۳۰). با توجه به اثر الکترون‌گاتیویته دیواره سلولی، باکتری توسط ورقه‌های گرافن به دام افتاده و لایه‌های آن غشای سیتوپلاسمی را تخریب می‌کند، منجر به رهاسازی ترکیبات داخل سلولی می‌شود و در نهایت فعالیت باکتریایی را مهار می‌کند (۳۲). نقش تنش اکسایشی در تعیین ساز و کار ضدباکتریایی سطوح گرافن، اغلب مسئول سمیت سلولی نانو مواد است. هنگامی که سطح گونه‌های اکسیژن فعال افزایش می‌یابد، تنش اکسایشی فعالیت آنزیم‌های ضداکسیدان، از جمله کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز را بالا می‌برد (۳۰). گونه‌های اکسیژن فعال به عنوان پیام‌رسان ثانویه در بسیاری از آبشارهای سیگنال‌های داخل سلولی عمل می‌کند و منجر به آسیب شدید ماکرومولکول‌های سلولی مانند تخریب لیپید غشا، تجزیه DNA، تخریب پروتیین و اختلال عملکرد میتوکندری می‌گردد که به شدت بر متابولیسم سلولی و سیگنالینگ سلول تأثیر می‌گذارد (۳۳). تعامل مواد مبتنی بر گرافن با سلول‌ها می‌تواند منجر به تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال شود. فعالیت سوپراکسید دسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز پس از در معرض قرارگرفتن با مواد بر پایه گرافن به صورت وابسته به زمان و دوز کاهش می‌یابد. به همین ترتیب، تنش اکسایشی عامل اصلی آپوپتوز و آسیب DNA سلول‌های در معرض مواد بر پایه گرافن است (۳۴). باکتری‌های گرم مثبت به دلیل دارا بودن دیواره ضخیم‌تر در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، کم‌تر در معرض آسیب ناشی از لایه‌های تیز اکسیدگرافن احیا شده قرار می‌گیرند که با نتایج این مطالعه و همچنین سایر مطالعات مطابقت خوبی نشان داد (۳۵، ۳۶). با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان ماکروجلبک سبز *U. flexuosa* را به عنوان عامل احیاکننده اکسیدگرافن معرفی کرد که دارای فعالیت ضدباکتریایی است. بنابراین می‌توان ادعا کرد که این نانوذره می‌تواند به عنوان یک ماده اولیه در فرمولاسیون آنتی‌بیوتیک‌ها به کار رود.

مطالعه از منابع دریایی (ماکروجلبک سبز) به عنوان عامل احیاکننده استفاده شد. مطالعات حاکی از آن است که ماکروجلبک‌های سبز به دلیل دارا بودن ترکیبات آلکالویدی، فنولی، استرویدی و کلروفیل می‌تواند به عنوان عامل احیاکننده مورد استفاده قرار گیرد (۱۸). سازوکار تشکیل گرافن شامل دو مرحله احیا، تبدیل اکسیدگرافن به هیدروکسیدگرافن و تبدیل هیدروکسیدگرافن به گرافن است. قدرت و میزان عوامل احیاکننده نقش مهمی در تولید هیدروکسیدگرافن یا گرافن دارند (۱۹). ماکروجلبک استفاده شده در این پژوهش به عنوان عامل احیاکننده موفق به گذراندن دو مرحله احیا اکسیدگرافن شد و در نهایت اکسیدگرافن تبدیل به گرافن شد. López و همکاران، Naqvi و همکاران و Ramanathan و همکاران گزارش کردند که ترکیبات فنولی مسئول احیای اکسیدگرافن هستند (۲۰-۲۲).

در سال‌های اخیر توجه زیادی به خواص ضدباکتریایی نانو مواد بر پایه گرافن متمرکز شده است. طبق استاندارد ISO 22196: 2011 (E) دو سویه باکتری گرم مثبت *S. aureus* و باکتری گرم منفی *E. coli* به عنوان مدل‌های آزمایشگاهی در بیشتر مطالعات مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۳، ۲۴). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره‌های آبی ماکروجلبک سبز و همچنین اکسیدگرافن احیا شده با ترکیبات طبیعی دریایی توانایی بیشتری در از بین بردن باکتری *S. aureus* نسبت به باکتری *E. coli* دارند. مطالعات Sadhukhan و همکاران، Belachew و همکاران و Joshi و همکاران نیز نشان داد که اکسیدگرافن احیا شده دارای فعالیت ضدباکتریایی بالا در مقابل دو سویه *S. aureus* و *E. coli* است (۲۵-۲۷).

سازوکار سمیت گرافن و مشتقات آن به طور دقیق شناخته شده نیست، اما امروزه محققان بیان کردند که به احتمال زیاد فرآیند فعالیت ضدباکتریایی این مواد را می‌توان با سازوکار احاطه کردن-از بین بردن (Capturing-Killing Mechanism) توضیح داد (۲۸). این سازوکار با دو فرایند شکستن فیزیکی غشای سلولی و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن اثر خود را نشان می‌دهد. گرافن از طریق موانع فیزیولوژیک یا ساختارهای سلولی به وسیله روش‌های مختلف در معرض قرارگرفتن، وارد سلول می‌شوند و در نهایت منجر به سمیت می‌گردد. مسیرهای مختلف ورود، توزیع و دفع بافت‌های مختلف، حتی الگوی جذب سلول‌های مختلف، ممکن است میزان سمیت گرافن را تعیین کند (۲۹). گرافن به روش‌های مختلفی مانند اندوسیتوز وارد سلول می‌شود و باعث تولید گونه‌های اکسیژن فعال، افزایش لاکتات دهیدروژناز، مالون دی‌آلدهید و رهاسازی یون کلسیم می‌شود. تعامل نانوذرات گرافن با سلول‌ها به خواص فیزیکی و شیمیایی بستگی دارد. گزارش‌ها نشان می‌دهد که ریخت‌شناسی (اندازه، شکل و لایه‌های تیز)، بار سطحی، عامل‌دار کردن سطح، پراکندگی، حالت تجمع، تعداد لایه‌ها، خلوص و روش سنتز، عوامل کلیدی هستند که بر سازوکار

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که ماکرو جلبک سبز *U. flexuosa* توانایی احیا اکسیدگرافن و تبدیل آن به گرافن را دارد. نتایج مشخصه یابی این مطالعه تایید کرد که گرافن سنتز شده با ماکرو جلبک سبز کاملاً ورقه ای بوده و دارای اندازه ای کمتر از اکسیدگرافن است. همچنین نتایج فعالیت ضدباکتریایی نمونه های مورد آزمایش نشان داد که اکسیدگرافن فاقد فعالیت ضدباکتریایی و گرافن سنتز شده با ماکرو جلبک سبز دارای فعالیت ضدباکتریایی در مقابل دو سویه *S. aureus* و *E. coli* است؛ به طوری که توانایی بیشتری در از بین بردن باکتری *S. aureus* نسبت به باکتری *E. coli* دارند. براساس نتایج به دست آمده می توان اذعان کرد که رویکرد قدرتمند سنتز زیستی گرافن با استفاده از ماکرو جلبک سبز *U. flexuosa*، توانسته منجر به تولید نانوذراتی با توان ضدباکتریایی شود و این امر می تواند راهکاری ایمن و پاک و نیز چشم اندازی نویدبخش را پیش روی حوزه پزشکی و دارودرمانی باز کند.

تشکر و قدردانی: از همه اساتیدی که در غنای مطالب حاضر یاری رسان بودند، نهایت تشکر و قدردانی به عمل می آید.

نقش نویسندگان: سلیمانی: کار آزمایشگاهی، متدولوژی، آنالیز داده ها، نگارش مقاله. قادری: متدولوژی، ادیت مقاله. یوسف زادی: نویسنده مسئول، ایده پردازی، متدولوژی، ادیت مقاله. صابری: کار آزمایشگاهی. دیانت: متدولوژی. همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می کنند که هیچ گونه تضاد منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*. 2015;40(4):277.
- Graves JL, Thomas M, Ewunkem JA. Antimicrobial nanomaterials: why evolution matters. *Nanomaterials*. 2017;7(10):283. doi:10.3390/nano7100283
- Graves Jr JL, Tajkarimi M, Cunningham Q, Campbell A, Nonga H, Harrison SH, et al. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Frontiers in genetics*. 2015;6(1):42-49. doi:10.3389/fgene.2015.00042
- Krishnamoorthy K, Umasuthan N, Mohan R, Lee J, Kim SJ. Antibacterial activity of graphene oxide nanosheets. *Science of Advanced Materials*. 2012;4(11):1111-7. doi:10.1166/sam.2012.1402
- Tegou E, Magana M, Katsogridaki AE, Ioannidis A, Raptis V, Jordan S, et al. Terms of endearment: Bacteria meet graphene nanosurfaces. *Biomaterials*. 2016;89(5):38-55. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.02.030
- Mashjoor S, Yousefzadi M, Esmaeili MA, Rafiee R. Cytotoxicity and antimicrobial activity of marine macro algae (Dictyotaceae and Ulvaceae) from the Persian Gulf. *Cytotechnology*. 2016;68(5):1717-26. doi:10.1007/s10616-015-9921-6
- Zarei Jeliani Z, Soleimani S, Pirian K, Amiri Moghadam SH, Yousefzadi M. Analysis of bioactive compounds in some marine seaweeds along the coastline of Bandar Abbas, Iran. *Journal of Phycological Research*. 2020;4(1):444-57. doi:10.29252/JPR.4.1.444
- Yousefzadi M, Rahimi Z, Ghafari V. The green synthesis, characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from green alga *Enteromorpha flexuosa* (wulfen) J.

- Agardh. *Materials Letters*. 2014;137(4):1-4. doi:10.1016/j.matlet.2014.08.110
- Mačić V, Antolić B, Žuljević A. A Checklist of the Benthic Marine Macroalgae in Montenegrin Coastal Waters. 2021. doi:10.1007/978_2020_720
- Marcano DC, Kosynkin DV, Berlin JM, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev A, et al. Improved synthesis of graphene oxide. *ACS nano*. 2010;4(8):4806-14. doi:10.1021/nn1006368
- Mhamane D, Ramadan W, Fawzy M, Rana A, Dubey M, Rode C, et al. From graphite oxide to highly water dispersible functionalized graphene by single step plant extract-induced deoxygenation. *Green Chemistry*. 2011;13(8):1990-1996. doi:10.1039/c1gc15393e
- Sreeprasad T, Maliyekkal MS, Deepti K, Chaudhari K, Xavier PL, Pradeep T. Transparent, luminescent, antibacterial and patternable film forming composites of graphene oxide/reduced graphene oxide. *ACS applied materials & interfaces*. 2011; 3(7):256-265. doi:10.1021/am200447p
- Li Y, Yang D, Cui J. Graphene oxide loaded with copper oxide nanoparticles as an antibacterial agent against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *RSC Advances*. 2017;7(62):38853-60. doi:10.1039/C7RA05520J
- Ren P-G, Yan D-X, Ji X, Chen T, Li Z-M. Temperature dependence of graphene oxide reduced by hydrazine hydrate. *Nanotechnology*. 2010; 22 (5): 055705. doi:10.1088/0957-4484/22/5/055705
- Acik M, Chabal YJ. A review on thermal exfoliation of graphene oxide. *Journal of Materials Science Research*. 2013; 2(1): 101-112. doi:10.5539/jmsr.v2n1p101
- Shan C, Yang H, Han D, Zhang Q, Ivaska A, Niu L. Water-soluble graphene covalently functionalized

- by biocompatible poly-L-lysine. *Langmuir*. 2009; 25 (20): 12030-3. doi:10.1021/la903265p
17. Si Y, Samulski ET. Synthesis of water soluble graphene. *Nano letters*. 2008; 8(6): 1679-1682. doi:10.1021/nl080604h
18. Bhagavathy S, Sumathi P, Bell IJS. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2011;1(1):S1-S7. doi:10.1016/S2221-1691(11)60111-1
19. Wang H, Wang D, Deng T, Zhang X, Zhang C, Qin T, et al. Insight into graphene/hydroxide compositing mechanism for remarkably enhanced capacity. *Journal of Power Sources*. 2018; 399 (4): 238-45. doi:10.1016/j.jpowsour.2018.07.104
20. López A, De Tangil MS, Vega-Orellana O, Ramírez AS, Rico M. Phenolic constituents, antioxidant and preliminary antimycoplasmic activities of leaf skin and flowers of *Aloe vera* (L.) Burm. f.(syn. *A. barbadensis* Mill.) from the Canary Islands (Spain). *Molecules*. 2013;18(5):4942-54. doi:10.3390/molecules18054942
21. Naqvi S, Ullah M, Hadi S. DNA degradation by aqueous extract of *Aloe vera* in the presence of copper ions. 2010.
22. Ramanathan S, Elanthamilan E, Obadiah A, Durairaj A, Merlin JP, Ramasundaram S, et al. *Aloe vera* (L.) Burm. f. extract reduced graphene oxide for supercapacitor application. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 2017; 28 (22): 16648-57. doi:10.1007/s10854-017-7576-0
23. Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS nano*. 2010;4(10):5731-6. doi:10.1021/nn101390x
24. Valenzuela L, Iglesias-Juez A, Bachiller-Baeza B, Fardalos M, Bahamonde A, Rosal R. Biocide mechanism of highly efficient and stable antimicrobial surfaces based on zinc oxide-reduced graphene oxide photocatalytic coatings. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(36):8294-304. doi:10.1039/D0TB01428A
25. Belachew N, Kahsay MH, Tadesse A, Basavaiah K. Green synthesis of reduced graphene oxide grafted Ag/ZnO for photocatalytic abatement of methylene blue and antibacterial activities. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2020; 8 (5): 104106. doi:10.1016/j.jece.2020.104106
26. Joshi S, Siddiqui R, Sharma P, Kumar R, Verma G, Saini A. Green synthesis of peptide functionalized reduced graphene oxide (rGO) nano bioconjugate with enhanced antibacterial activity. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1-11. doi:10.1038/s41598-020-66230-3
27. Sadhukhan S, Ghosh TK, Roy I, Rana D, Bhattacharyya A, Saha R, et al. Green synthesis of cadmium oxide decorated reduced graphene oxide nanocomposites and its electrical and antibacterial properties. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;99 (6):696-709. doi:10.1016/j.msec.2019.01.128
28. Faria AF, Martinez DST, Moraes AC, Maia da Costa ME, Barros EB, Souza Filho AG, et al. Unveiling the role of oxidation debris on the surface chemistry of graphene through the anchoring of Ag nanoparticles. *Chemistry of Materials*. 2012; 24 (21): 4080-4087. doi:10.1021/cm301939s
29. Pelin M, Fusco L, León V, Martín C, Criado A, Sosa S, et al. Differential cytotoxic effects of graphene and graphene oxide on skin keratinocytes. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-12. doi:10.1038/srep40572
30. Ou L, Song B, Liang H, Liu J, Feng X, Deng B, et al. Toxicity of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms. *Particle and fibre toxicology*. 2016;13(1):57. doi:10.1186/s12989-016-0168-y
31. Lu X, Feng X, Werber JR, Chu C, Zucker I, Kim J-H, et al. Enhanced antibacterial activity through the controlled alignment of graphene oxide nanosheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(46):E9793-E801. doi:10.1073/pnas.1710996114
32. Mao HY, Laurent S, Chen W, Akhavan O, Imani M, Ashkarran AA, et al. Graphene: promises, facts, opportunities, and challenges in nanomedicine. *Chemical reviews*. 2013;113(5):3407-24. doi:10.1021/cr300335p
33. Chong Y, Ma Y, Shen H, Tu X, Zhou X, Xu J, et al. The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots. *Biomaterials*. 2014;35(19):5041-8. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.03.021
34. Zhang Y, Ali SF, Dervishi E, Xu Y, Li Z, Casciano D, et al. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *ACS nano*. 2010; 4(6):3181-6. doi:10.1021/nn1007176
35. Dat NM, Long PNB, Nhi DCU, Minh NN, Nam HM, Phong MT, et al. Synthesis of silver/reduced graphene oxide for antibacterial activity and catalytic reduction of organic dyes. *Synthetic Metals*. 2020; 260: 116260. doi:10.1016/j.synthmet.2019.116260
36. Naeem H, Ajmal M, Qureshi RB, Muntha ST, Farooq M, Siddiq M. Facile synthesis of graphene oxide-silver nanocomposite for decontamination of water from multiple pollutants by adsorption, catalysis and antibacterial activity. *Journal of environmental management*. 2019;230:199-211. doi:10.1016/j.jenvman.2018.09.061