



بررسی خواص ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی سنتز شده به کمک امواج

اولتراسونیک

نویسندگان: علیرضا نصیری^۱، محمد ملکوتیان^۲، فاطمه تمدن^۳

۱. کارشناس ارشد شیمی آلی، پژوهشگر مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۲. نویسنده مسئول: استاد مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط و گروه بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۳. دانشیار شیمی آلی، گروه شیمی دانشگاه یزد

تلفن تماس: ۰۳۴۱۳۲۰۵۱۲۸ Email: m.malakootian@yahoo.com

چکیده

مقدمه: معرفی یک عامل ضد باکتریایی قوی از اهمیت فراوانی در جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زا بویژه سویه‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها برخوردار می‌باشد. هدف از این تحقیق سنتز نانوذرات اکسید روی به کمک امواج اولتراسونیک و بررسی خواص ضد باکتریایی آن بود.

روش بررسی: ابتدا نانوذرات اکسید روی به کمک امواج اولتراسونیک سنتز شدند. ویژگی‌های ساختار فیزیکی و شیمیایی این نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت ضدباکتریایی این نانوذرات بر روی دو سویه باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به کمک روش های استاندارد انتشار دیسک، چاهک گذاری، تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی و تعیین حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی فیزیکی و شیمیایی نانوذرات اکسید روی سنتز شده نشان داد که ذرات در ابعاد نانو، کروی شکل، بدون هیچ ناخالصی تولید شدند. حداقل غلظت بازدارنده رشد باکتری برای اشرشیاکلی برابر با ۰/۱۲۵ mg/ml و استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۰/۰۶۲ mg/ml گزارش شد. حداقل غلظت کشندگی باکتری برای اشرشیاکلی برابر با ۰/۵۰۰ mg/ml و استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۰/۲۵۰ mg/ml گزارش شد. در مقایسه دو روش چاهک گذاری و دیسک گذاری، قطر هاله عدم رشد در روش چاهک گذاری بیشتر از دیسک گذاری شد. قطر هاله عدم رشد در روش چاهک گذاری برای باکتری اشرشیاکلی $18/66 \pm 1/527$ میلی‌متر و استافیلوکوکوس اورئوس $24/66 \pm 0/577$ میلی‌متر گزارش شد.

نتیجه گیری: نانوذرات اکسید روی با درجه خلوص بالا به کمک امواج اولتراسونیک قابل سنتز بوده و خواص ضدباکتریایی قابل توجهی را در مقابل باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس دارند. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با اشرشیاکلی حساسیت بیشتری را در مقابل نانوذرات اکسید روی از خود نشان داد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات اکسید روی، امواج اولتراسونیک، ضد باکتری، گرم مثبت، گرم منفی

طلوع بهداشت

فصلنامه علمی پژوهشی

دانشکده بهداشت یزد

سال سیزدهم

شماره: چهارم

مهر و آبان ۱۳۹۳

شماره مسلسل: ۴۶

تاریخ وصول: ۱۳۹۲/۹/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۱۹

مقدمه

خواص بازدارندگی مکانیکی، حرارتی، شیمیایی و میکروبی نانوذرات در مقایسه با ماکروملکولها افزایش می یابد (۲،۱). این مواد در صورتیکه به روش صحیح سنتز شوند به دلیل داشتن خواص ارتقاء یافته خود می توانند برای مقاصد مختلف در علوم پزشکی، صنایع الکترونیک، انرژی، بیوتکنولوژی و زیست محیطی بکار گرفته شوند (۳).

از مهمترین و جدیدترین کاربردهای نانوذرات در صنعت استفاده از آنها در بسته بندی مواد غذایی (۴)، بیوسنسورها (۵)، میکروالکترونیک (۶)، سلولهای خورشیدی (۷)، کاتالیزورها (۸)، فتوکاتالیست ها (۹)، و از جمله کاربردهای این ترکیبات در پزشکی شامل تولید مواد آرایشی و بهداشتی (۱۰)، آنتی بیوتیک ها (۱۱)، نانو حامل ها در انتقال و رهاسازی داروها به سلولهای هدف (۱۲)، تصویربرداری از سلولها و درمان سرطان می باشد (۱۳) که روند رو به رشدی را دارد.

عوامل ضدباکتریایی که در صنایع غذایی مورد استفاده است به دو دسته آلی و معدنی تقسیم می شوند که نوع معدنی آنها خاصیت ضدباکتریایی پایدارتری در دما و فشار بالا نسبت به عوامل ضدباکتریایی آلی دارند. به تبع این تفاوت می توان نانوذرات اکسیدهای فلزی را به عنوان یک عامل ضدباکتریایی قوی در این زمینه پیشنهاد کرد (۱۴). نانوذرات اکسیدهای فلزی در طیف گسترده ای بعنوان عامل ضد میکروبی در ظروف نگهداری و بسته بندی، مواد افزودنی و مکمل های غذایی در صنایع غذایی بکار می روند (۱۵).



از مزایای استفاده از نانوذرات اکسیدهای معدنی در علوم پزشکی، وجود عناصر معدنی می باشد که در مقیاس نانو خواص بهتری را از خود نشان می دهند. نانوذرات اکسید روی از جمله اکسیدهای فلزی است که به دلیل خواص گسترده مورد توجه بیشتری قرار گرفته اند. اکسید روی یکی از ترکیبات روی می باشد که توسط وزارت غذا و داروی آمریکا بعنوان یک ماده بی خطر شناخته شده است. هم چنین از نمک های روی در درمان کمبود روی در بدن استفاده می شود (۱۶-۱۸).

برخی عوامل ضد باکتریایی، سمی و در ارگانهای طبیعی باعث التهاب می شوند (۱۸) بنابراین تحقیقات جهت تولید و معرفی انواع عوامل جدید ضد میکروبی که استفاده از آنها ایمن و مقرون به صرفه باشد جزو اهداف و اولویت های تحقیقاتی بسیاری از سازمانها و گروههای تحقیقاتی می باشد.

نانوذرات زینک اسید خاصیت ضدباکتریایی موثری را نسبت به طیف گسترده تری از باکتریها از خود نشان داده است (۱۹). از جمله پاتوژن های مهم مواد غذایی اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس می باشند. اشرشیاکلی یک باکتری گرم منفی و مهمترین منبع آلوده کننده مواد غذایی از قبیل گوشت، ماهی، شیر و سبزی و غیره است. استافیلوکوکوس اورئوس یک کوکسی گرم مثبت است که بسیاری از نژادهای بتاهمولتیک و کواگولاز مثبت آن بیماری زا هستند که از طریق آنتروتوکسین تولیدی باعث مسمومیت غذایی، اسهال و استفراغ می شود (۲۰-۲۱). نانوذرات اکسید روی این پتانسیل را دارند که بعنوان یک عامل ضدباکتریایی موثر برای محافظت مواد غذایی و محصولات



خاصیت ضد باکتریایی داشته و CuO خاصیت موثر تری را در مقایسه با این اکسیدهای فلزی از خود نشان داد (۲۶). Jiang و همکاران در سال ۲۰۰۹ در امریکا، اکسید روی را در مقایسه با اکسیدهای فلزی Al_2O_3 , TiO_2 و SiO_2 در مقابله با باکتریهای اشرشیاکلی، سودوموناس فلورسانس و باسیلوس سوبتیلوس عامل ضد باکتریایی قویتری گزارش نمودند (۲۷).

هرچند تاکنون مطالعاتی در زمینه خواص ضد باکتریایی نانوذرات اکسیدهای فلزی از جمله اکسید روی صورت گرفته است اما از آنجا که خواص ضد باکتریایی این نانوذره به شکل، اندازه و روش‌های سنتز آن بستگی دارد و این عوامل بر خاصیت ضد باکتریایی آن موثر است، در این مطالعه نانوذرات اکسید روی به کمک امواج اولتراسونیک سنتز شدند و از لحاظ ساختاری مورد بررسی قرار گرفتند. فعالیت ضد باکتریایی آنها نیز بر روی دو سویه از پاتوژنهای مواد غذایی اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه شد.

روش بررسی

مطالعه تجربی و در سال ۱۳۹۱ در مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد. در مرحله اول نانو ذرات اکسید روی مطابق روش کریمی و همکاران سنتز شد (۲۸). ابتدا ۵۰ میلی لیتر محلول استات روی ۰/۱ مولار تهیه شد و داخل حمام اولتراسوند تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفت. سپس ۱ گرم پلی وینیل پیرولیدون (Polyvinyl Pyrrolidone) در ۵۰ میلی لیتر محلول ۵۰:۵۰ آب و اتانل حل شد و به محلول زینک استات اضافه گردید. بوسیله بورت تترامیل

کشاورزی در مقابل پاتوژن‌های مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند (۲۲).

Martins و همکاران در سال ۲۰۱۳ در پرتقال، کامپوزیتی از نانوفیبرهای سلولزی و نانوذرات اکسیدروی تولید نمودند که از این ترکیب برای ساخت ورقه‌هایی که خواص ضدباکتریایی دارند استفاده شد. این ورقه هادر مقابل باکتری های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس و باکتری گرم منفی کلبسیلا پنومونیه، خواص ضد باکتریایی از خود نشان دادند (۲۳).

Stankovic و همکاران در سال ۲۰۱۳ در صربستان نانوذرات اکسید روی را با استفاده از عوامل فعال کننده سطحی پلی گلوتامیک اسید (Polyglutamic acid)، پلی وینیل استات (Polyvinyl acetate) و پلی وینیل پیرولیدون (Polyvinyl Pyrrolidone) با ساختارهای متفاوت سنتز نمودند و این نانوذرات خواص ضدباکتریایی قابل توجهی را بر روی باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند (۲۴). میرحسینی و همکاران در سال ۲۰۱۲ در ایران، اثرات ضدباکتریایی اکسید روی را بر روی باکتریهای اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در محیط Tryptic Soy Broth و شیر مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که استافیلوکوکوس اورئوس حساسیت بیشتری را نسبت به اشرشیاکلی در مقابل اکسید روی از خود نشان می دهد (۲۵). Baek و همکاران در سال ۲۰۱۱ در کره، سمیت نانو ذرات اکسیدهای فلزی NiO , ZnO , CuO و Sb_2O_3 را بر روی اشرشیاکلی، باسیلوس سوبتیلوس و استرپتوکوکوس اورئوس را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده شد که این اکسیدهای فلزی



(model pu 8700) استفاده شد. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه خلوص بالا برای تهیه نانوذرات اکسید روی از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

در مرحله دوم برای بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات از روش های استاندارد رقت سازی لوله ای، چاهک گذاری و دیسک گذاری استفاده شد (۳۰، ۲۹). در روش رقت سازی لوله ای، میزان حداقل غلظت بازدارنده رشد باکتری (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC: Minimum Bactericidal Concentration) در (TSB: Tryptic Soy Broth) به این صورت انجام شد که به دو مجموعه شش تایی لوله که حاوی ۱ سی سی محیط کشت TSB استریل بود، به لوله اول یک میلی لیتر محلول اکسید روی اضافه گردید. پس از هم زدن، ۱ میلی لیتر از لوله اول به لوله دوم و سپس ۱ میلی لیتر از لوله دوم به لوله سوم و به همین ترتیب تا لوله آخر اضافه شد و سرانجام ۱ میلی لیتر از لوله آخر به بیرون ریخته شد. به تمامی لوله ها ۰/۱ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری فعال که مطابق با لوله ۱ مک فارلند استاندارد شده بود اضافه گردید. در کنار هر سریال رقتی از یک لوله حاوی محیط کشت و باکتری جهت کنترل مثبت و یک لوله حاوی محیط کشت و محلول اکسید روی جهت لوله شاهد در نظر گرفته شد. تمامی لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت از تمامی لوله ها به میزان یک لوپ استاندارد روی محیط کشت نوترینت آگار جهت تعیین MIC و MBC کشت داده شد.

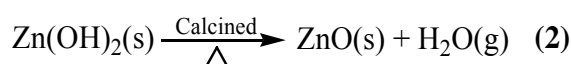
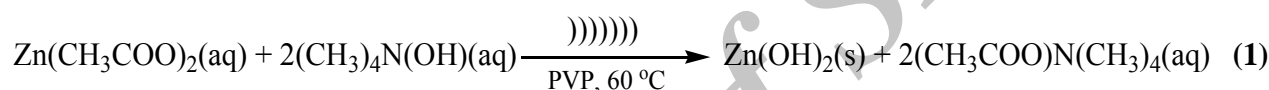
آمونیم هیدروکساید ۰/۲۸ مولار به آرامی و بطور تقریبی هر ثانیه یک قطره داخل ظرف مخلوط واکنش اضافه شد. دمای واکنش 60°C ثابت نگه داشته شد. بعد از افزودن کامل تترامیل آمونیم هیدروکساید، ظرف واکنش به مدت ۳۰ دقیقه تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفت تا ذراتی که احتمالاً به یکدیگر چسبیده و کلوخه شده اند از هم جدا شوند. سپس بر روی همزن حرارت داده تا حلال تبخیر و رسوب شیری رنگی تولید شود. رسوب حاصل با آب مقطر شستشو و با کاغذ صافی صاف شد، سپس داخل کوره در دمای ۳۲۰ درجه سانتیگراد برای مدت دو ساعت قرار گرفت تا کلسینه شده و با از دست دادن آب پودری سفید رنگ که محصول نهایی زینک اکسید است تولید شود (معادله ۱ و ۲).

سپس ساختار فیزیکی و شیمیایی نانوذرات اکسید روی مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین نوع فازهای تشکیل شده و تعیین اندازه کریستالی نانوذرات از آنالیز پراش اشعه ایکس (X-ray Diffraction) با استفاده از آند مسی با طول موج ۰/۱۵۴۰۵۶ نانومتر در محدوده 2θ ، ۲۰ تا ۸۰ درجه انجام گرفت (XRD: Philips Holland, model Xpert MPD) ، برای بررسی مورفولوژی و اندازه ذرات از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM: Philips Holland, model EM 208) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM: Oxford England, model LEO 1455-VP) ، برای مطالعه ساختار شیمیایی و نوع پیوندها از طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR model Bruker Equinox 55) و جهت مطالعه اپتیکی نانوذرات اکسید روی از طیف سنجی فرابنفش و مرئی (UV-VIS spectrophotometer) مرئی



حاوی باکتری استفاده شد. جهت جلوگیری از احتمال وقوع خطا در کلیه مراحل کار، این آزمایش ها با سه بار تکرار انجام گردید. باکتری های مورد استفاده در این مطالعه، اشرشیاکلی O157:H7 و استافیلوکوکوس اورئوس از سوش های استاندارد پژوهشکده تعلیم و تربیت کرمان تهیه و روی محیط مولر هینتون در انکوباتور در شرایط هوایی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. از محیط های کشت مایع نوترینت براث و کشت جامد نوترینت آگار جهت کشت و تست های باکتریولوژیکی استفاده شد.

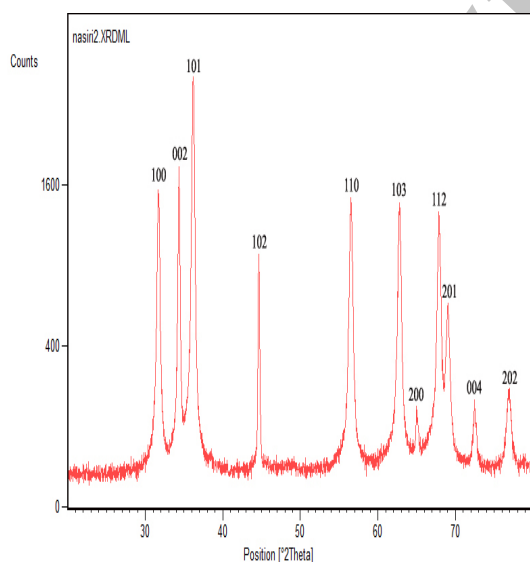
در روش چاهک گذاری پس از تهیه و کشت باکتری ها روی محیط کشت مولر هینتون، به وسیله بورر چاهک هایی روی محیط کشت ایجاد گردید. به هر کدام از این چاهک ها ۰/۰۱ میلی لیتر سوپانسیون اکسید روی اضافه گردید و مدت زمان ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از گذشت زمان ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد برای هر دو سویه باکتری اندازه گیری شد. در روش دیسک گذاری از دیسک های استریل به قطر ۶ میلیمتر آغشته به اکسید روی بر روی محیط کشت مولر هینتون



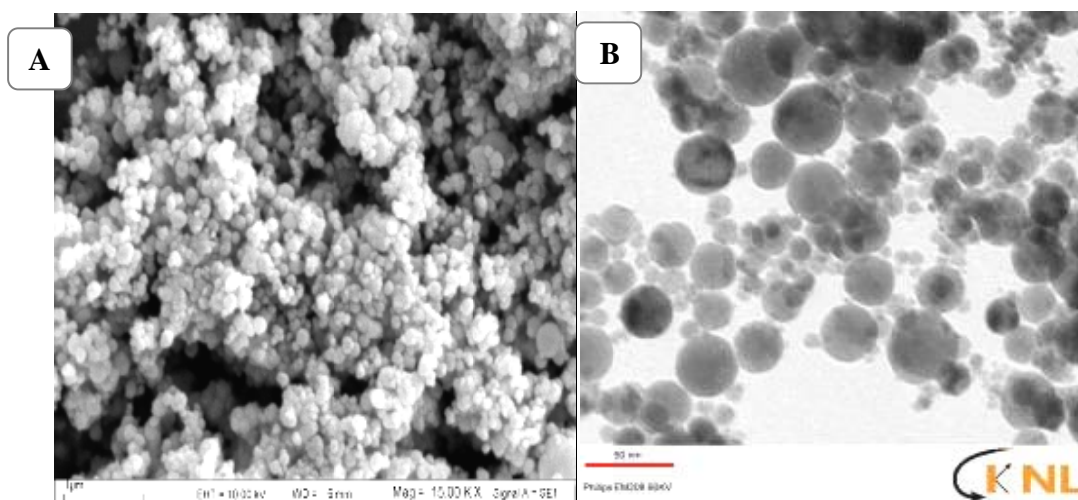
معادله ۲ و ۱

یافته ها

ساختار فیزیکی و شیمیایی نانوذرات اکسید روی سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیز پراش اشعه ایکس در شکل ۱ نشان داده شده است. شدت پیک ها و عرض نسبتاً کم آنها نشان دهنده درجه بالای بلوری محصولات می باشد. پیک های (۱۰۰-۰۰۲-۱۰۱-۱۰۲-۱۱۰-۱۰۳-۲۰۰-۱۱۲-۲۰۱-۰۰۴-۲۰۲) نشان دهنده ساختار هگزاگونال اکسید روی می باشد که با طیف های استاندارد دستگاه (JCPDS card: Joint Committee on Powder Diffraction Standards) مطابقت دارد. طیف XRD پیک اضافی از اجزای دیگر را نشان نمی دهد و بیان گر این موضوع می باشد که طی فرآیند تجزیه شدن تمام اجزای سایر مواد بطور کامل تجزیه شده است.



شکل ۱: پراش اشعه ایکس نانوذرات اکسید روی



شکل ۲: (A) تصویر SEM و (B) تصویر TEM نانوذرات اکسید روی سنتز شده به کمک امواج اولتراسونیک

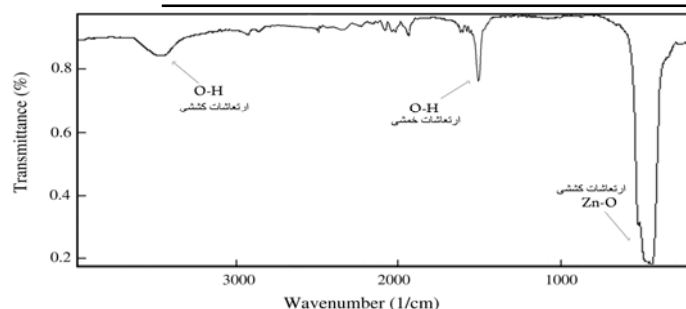
(، تغییر مکان هیپسوکرومی یا تغییر مکان به فرکانس بالاتر یا طول موج کوتاهتر مشاهده می شود که به دلیل اثر اندازه ذرات می باشد. این اثر همچنین به گاف انرژی نانوذرات نسبت داده می شود (۳۲).

پس از سنتز نانوذرات و بررسی ساختاری آنها، فعالیت ضد میکروبی نانوذرات زینک اکسید روی مورد بررسی قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد در روش دیسک گذاری و چاهک گذاری برای دو سویه باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس اندازه گیری شد. بر اساس این نتایج قطر هاله عدم رشد در روش چاهک گذاری برای باکتری اشرشیاکلی برابر با $18/66 \pm 1/527$ میلی متر و برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برابر با $24/66 \pm 0/577$ میلی متر، و در روش دیسک گذاری برای باکتری اشرشیاکلی برابر با $10/66 \pm 0/577$ میلی متر و برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برابر با $14/33 \pm 0/577$ میلی متر گزارش شد (شکل ۵).

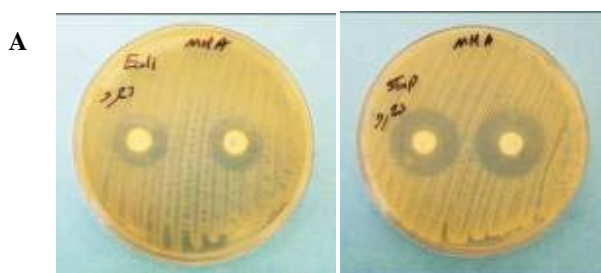
نتایج حاصل از عکس های میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و نانوذرات بیانگر این موضوع می باشد که نانوذرات کروی شکل بوده و از نظر اندازه نسبتاً یکنواخت می باشند (شکل ۲).

نتیجه بررسی ساختار شیمیایی و نوع پیوندهای شیمیایی نانوذرات اکسید روی به کمک طیف سنجی مادون قرمز در شکل ۳ نشان داده شده است. طیف جذبی مشاهده شده در ناحیه 3400 cm^{-1} و 1600 cm^{-1} را می توان به ارتعاشات کششی و خمشی پیوند H-O مربوط به آب جذب شده بر روی سطح نمونه نسبت داد. جذب شدید در 435 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوند Zn-O می باشد (۳۱).

از مطالعه اپتیکی نانوذرات اکسید روی به کمک طیف سنجی در ناحیه فرابنفش و مرئی، طیف جذبی در 375 نانومتر مربوط به نانوذرات اکسید روی سنتز شده مشاهده شد. از مقایسه طیف جذبی نانوذرات اکسید روی (375 nm) با نمونه بالک (262 nm)



شکل ۳: طیف FT-IR نانو ذرات اکسید روی سنتز شده



شکل ۴: هاله عدم رشد در روش چاهک گذاری بر روی باکتری

اشرشیاکلی (A) و استافیلوکوکوس اورئوس (B)

غلظت کشندگی باکتری برابر با ۰/۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد. در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کمترین غلظت بازدارندگی از رشد برابر با ۰/۰۶۲ میلی گرم بر میلی لیتر و کمترین غلظت کشندگی باکتری برابر با ۰/۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد.

نتایج حاصل از تستهای MIC و MBC در غلظت های متفاوت اکسید روی در جدول ۱ نشان داده شده است. با توجه به نتایج جدول ۱ در باکتری اشرشیاکلی کمترین غلظت بازدارندگی از رشد برابر با ۰/۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و کمترین

جدول ۱. نتایج حاصل از MIC و MBC برای دو سویه باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس

نوع خاصیت ضد میکروبی		غلظت نانوذره اکسید روی (mg/ml)
اشرشیاکلی	استافیلوکوکوس اورئوس	
بی تاثیر (رشد +)	بی تاثیر (رشد +)	۰/۰۱۵
بی تاثیر (رشد +)	بی تاثیر (رشد +)	۰/۰۳۱
بی تاثیر (رشد +)	باکتریواستاتیک MIC	۰/۰۶۲
باکتریواستاتیک MIC	باکتریواستاتیک	۰/۱۲۵
باکتریواستاتیک	باکتریوساید MBC	۰/۲۵۰
باکتریوساید MBC	باکتریوساید	۰/۵۰۰



بحث و نتیجه گیری

از مزایای سنتز نانوذرات به کمک امواج اولتراسونیک نسبت به سایر روشهای سنتز نانو ذرات در فاز مایع می توان به قابل کنترل بودن فرایند، امکان تولید ذرات نانو ساختار بصورت یک دست و یکنواخت، خلوص بالا و امکان تولید بسیاری از نانو ذرات اکسیدی اشاره کرد (۳۳). بر اساس نتایج بدست آمده از بررسی ساختاری نانوذرات تاییدکننده این مطلب می باشد که ذرات سنتز شده در ابعاد نانو، کروی شکل، با اندازه نسبتاً یکنواخت، بدون ناخالصی، با درجه بلوری بالا و با کمترین میزان چسبندگی می باشند.

از مقایسه نتایج حاصل از چاهک گذاری و دیسک گذاری، قطر هاله عدم رشد در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس هم در چاهک گذاری و هم در دیسک گذاری از اشرشیاکلی بیشتر بوده و نشان دهنده تاثیر ضد باکتریایی بیشتر نانوذرات اکسید روی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشرشیاکلی می باشد. همچنین نتایج حاصل از MIC و MBC بیانگر این موضوع است که اثر گذاری بر روی اشرشیاکلی در غلظت های بالاتر نانوذرات اکسید روی می باشد و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت های کمتر نانوذرات اکسید روی نسبت به آن حساسیت نشان می دهد. با توجه به این نتایج میتوان بیان کرد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس حساسیت بیشتر و مقاومت کمتری را در مقابل نانوذرات اکسید روی دارد که ممکن است به فیزیولوژی و ساختار غشاء سلولی بستگی داشته باشد. مکانیسم مشخص و تعیین شده ای برای عملکرد این نانو ذرات در مقابل باکتری ها وجود ندارد (۳۴).

تاکنون مکانیسم های متعددی برای این منظور پیشنهاد شده است که به صورت برهم کنش های فیزیکی، شیمیایی و فیزیکوشیمیایی بین نانوذرات اکسید روی و باکتری ها می باشد (۳۵،۳۶).

از جمله این برهم کنش ها می توان به واکنش های شیمیایی که بین یونهای Zn^{2+} با ترکیبات غشای سلولی اشاره کرد. یون های Zn^{2+} بعد از عبور از غشا و انتقال به داخل سلول می توانند با ترکیبات و اجزای داخل سلولی واکنش شیمیایی دهند و به اجزای داخل سلولی آسیب برسانند (۳۶). نانوذرات اکسید روی قابلیت تولید H_2O_2 را نیز در محیط دارند که بعد از تولید میتواند با ترکیبات و اجزای غشای سلولی واکنش دهد. افزایش گروه های (راکتیو) سطحی به عنوان مکان های فعال برای تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) شامل سوپراکسید، هیدروژن پروکساید و رادیکال هیدروکسیل منجر به استرس اکسیداتیو شود و گونه های اکسیژن فعال این قابلیت را دارند که به غشای سلولی و اجزای داخل سلولی آسیب وارد کنند. نانوذرات اکسید روی هم چنین از طریق انسداد فیزیکی کانال های انتقال غشای سلولی و قطع انتقالات الکترونی و آسیب فیزیکی به پوشش و غشای سلول از طریق سایش، خوردگی و پارگی می توانند به سلول آسیب برسانند و منجر به نابودی آن گردند (۳۶).

Reddy و همکاران در سال ۲۰۰۷ در هند اثرات ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی بررسی کردند و مشاهده کردند که باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با باکتری گرم منفی اشرشیاکلی حساسیت بیشتری نسبت به نانوذرات اکسید روی دارد



می شود (۴۱). Ramani و همکاران در سال ۲۰۱۲ در هند نانوذرات اکسید روی را با ساختارهای متفاوت سنتز کردند و خواص ضد باکتریایی آنرا بر روی ۴ سویه باکتری گرم مثبت و ۴ سویه باکتری گرم منفی مورد بررسی قرار دادند. و مشاهده کردند که نانوذرات اکسید روی کروی شکل خواص ضدباکتریایی بهتری را از خود نشان می دهند (۴۲).

Gunalan و همکاران در سال ۲۰۱۲ در هند نانوذرات اکسید روی را سنتز کردند و خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی آن را بر روی ۴ سویه باکتری و ۴ سویه قارچ مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که فعالیت ضد میکروبی نانوذرات به دوز نانوذرات، زمان تماس، اندازه ذرات و روش سنتز بستگی دارد (۴۳).

تاکنون اطلاعات دقیق و کاملی برای مکانیسم عملکرد نانوذرات در مقابل باکتریها بیان نشده است اما با توجه به نتایج این تحقیق نانوذرات اکسید روی میتوانند بعنوان یک عامل بازدارنده در مقابل پاتوژن های مواد غذایی در بسته بندی و نگهداری مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند و از آلودگی و فساد آنها جلوگیری کنند و در جهت بهبود صنعت بسته بندی منجر به کاهش مصرف مواد اولیه و مفید و ضایعات کمتر شوند.

ذرات اکسید روی با روش استفاده از امواج اولتراسونیک در ابعاد نانو، کروی شکل، با اندازه نسبتاً یکنواخت، بدون ناخالصی، با درجه بلوری بالا سنتز شدند و خواص ضد باکتریایی قابل توجهی در مقابل باکتریهای اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس دارند که می توانند بعنوان ترکیبات آنتی باکتریال در صنایع مواد غذایی برای جلوگیری از فساد و آلودگی مواد غذایی بکار روند.

که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۳۷). Tam و همکاران در سال ۲۰۰۸ در هنگ کنگ نانومیله های اکسید روی را به روش هیدروترمال سنتز کردند و اثرات ضد باکتریایی آنرا بر روی باکتری گرم منفی اشرشیاکلی و باکتری گرم مثبت باسیلوس آتروفیوس بررسی کردند و مشاهده کردند که نانومیله های اکسید روی بر روی باکتری گرم مثبت تاثیر بیشتری نسبت به باکتری گرم منفی دارد و این امر را به ساختار غشا سلولی ساده باکتری های گرم مثبت نسبت دادند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۳۸). ملکوتیان و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ایران از نانوذرات اکسید های فلزی CuO ، ZnO ، TiO_2 در حذف باکتری های گرم مثبت و منفی از فاضلاب شهری استفاده کردند و مشاهده شد که تاثیر ضد باکتریایی ZnO بیشتر از CuO و TiO_2 بوده و اشرشیاکلی در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت های بالاتری حذف می شود که تایید کننده نتایج این تحقیق می باشد (۳۹).

Jiang و همکاران در سال ۲۰۱۳ در چین نانوذرات اکسید روی را به کمک امواج مایکروویوسنتز کردند و خواص ضدباکتریایی آن را بر روی کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که خواص ضدباکتریایی نانوذرات به شکل و اندازه آنها بستگی دارد (۴۰). جاستین و همکاران در سال ۲۰۱۲ در آمریکا کامپوزیتی از پلی وینیل کلراید و نانوذرات اکسید روی سنتز کردند و خواص ضدباکتریایی آن را بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که اکسید روی باعث بهبود عملکرد خاصیت ضدباکتریایی کامپوزیت



تشکر و قدردانی

رسیده است که بدینوسیله از دست اندر کاران آن سپاسگزاری می نماید. پژوهشگران همچنین از آقای جاوید امینی سرپرست مرکز تحقیقات میکروبیولوژی پژوهشکده تعلیم و تربیت کرمان که در انجام این تحقیق با ما همکاری داشتند، تشکر می نمایند.

این تحقیق زیر نظر مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی کرمان در قالب طرح تحقیقاتی به شماره طرح (۹۱/۶۷) به انجام

References

- 1-Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine* 2007; 3(1):20-31.
- 2-Sanguansri P. Nanoscale material development, a food industry perspective. *Trend in food science and technology* 2008; (175):1447-55.
- 3-LeiShao L, Chen J. Synthesis and application of nanoparticles by a high gravity method. *China Particuology* 2005; 3(1-2):134-5.
- 4-Han W, Yu Y, Li NT, Wang LB. Application and safety assessment for nano-composite materials in food packaging. *Chinese Science Bulletin* 2011; 12(56):1216-25.
- 5-Zhao M, Huang J, Zhou Y, Chen Q, Pan X, He H, Ye Z. A single mesoporous ZnO/Chitosan hybrid nanostructure for a novel free nanoprobe type biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 2013; 43(1):226-30.
- 6-Zhan X, Chen F, Salicic Z, Wong C, Gao W. Synthesis of ZnO submicron spheres by a two-stage solution method. *Applied Nanoscience*. 2012; 2(1): 63-70.
- 7-Ibrahim MA, Wei H, Tsai MH, Ho KC, Shyu JJ, Chu CW. Solution-processed zinc oxide nanoparticles as interlayer materials for inverted organic solar cells. *Solar Energy Materials and Solar Cells* 2013; 108:156-63.
- 8-Tamaddon F, Aboee F, Nasiri AR. ZnO nanofluid as a structure base catalyst for chemoselective amidation of aliphatic carboxylic acids. *Catalysis Communications* 2011; 16(1):194-7.
- 9-Tu M, Abbood HA, Zhu Z, Li H, Gao Z. Investigation of the photocatalytic effect of zinc oxide nanoparticles in the presence of nitrite. *Journal of Hazardous Materials* 2013; 244(245):311-21.
- 10-Serpone N, Dondi D, Albini A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and sun care products. *Inorganica Chim. Acta* 2007; 360:794-802.



- 11-Bhande RM, Khobragade CN, Mane RS, Bhande S. Enhanced synergism of antibiotics with zinc oxide nanoparticles against extended spectrum β -lactamase producers implicated in urinary tract infections. *Journal of Nanoparticle Research* 2013;15(1):1-13.
- 12-Chen T,Zhao T,Wei D,Wei Y,Li Y,Zhang H.Core-shell nanocarriers with ZnO quantum dots-conjugated Au nanoparticle for tumor-targeted drug delivery. *Carbohydrate Polymers* 2012;9(2):1124-32.
- 13-Zhang H,Chen B, Jiang H,Wang C,Wang H,Wang X.A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment. *Biomaterials* 2011;32(7):1906-14.
- 14-Sawai J.Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO,MgO and CaO) by conductimetric assay. *Journal Microbiol Methods* 2003;54:177-82.
- 15-Henriette MC,Azeredo D.Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International* 2009;(42):1240-53.
- 16-Romana D,Brown K,Guinard J-X.Sensory trial to assess the acceptability of zinc fortificants added to iron-fortified wheat products. *Journal Food Science* 2002;67:461-65.
- 17-Premanathan M, Karthikeyan K, Jeyasubramanian K, Manivannan G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2011;7:184-92.
- 18-Kalantar E,Maleki A,Khosravi M,Mahmodi S. Evaluation of ultrasound waves effect on antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from hospital and their comparison with standard species. *Iranian Journal of Health and Environment* 2010; 3(3): 319-26.
- 19-Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 2008;279(1):71-6.
- 20-Zeina A. Kanafani, V. G. F. J., *Staphylococcus aureus* Infections: New Challenges from an Old Pathogen. *Enfermedades Infecciosasy Microbiología Clínica* 2006;24(3): 182-93.
- 21-Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extra intestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection* 2003;5(5):449-56.
- 22-Liu Y, He L, Mustapha A, Li H, Hu ZQ, Lin M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 2009;107:1193-201.



- 23-Martins NCT, Freire CSR, Neto CP, Silvestre AJD, Causio J, Baldi G, Sadocco P, Trindade T. Antibacterial paper based on composite coatings of nanofibrillated cellulose and ZnO. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2013;417(20):111-19.
- 24-Stankovic A, Dimitrijevic S, Uskokovic D. Influence of size scale and morphology on antibacterial properties of ZnO powders hydrothermally synthesized using different surface stabilizing agents. *Colloids and Surfaces B: Bio interfaces* 2013;102:21-28.
- 25-Mirhosseini M, Firouzabadi FB. Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens. *International Journal of Dairy Technology* 2012;65:1-5.
- 26-Baek YW, An YJ. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of the Total Environment* 2011;409(8):1603-8.
- 27-Jiang W, Mashayekhi H, Xing B. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environmental Pollution* 2009;157(5):1619-25.
- 28-Karimi MA, Roozbahani SH, Asadiniya R, Hatefi-Mehrjardi A, Mashhadizadeh MH, Behjatmanesh R, et al. Synthesis And Characterization Of Nanoparticles And Nanocomposite Of Zno And Mgo By Sonochemical Method And Their Application For Zinc Polycarboxylate Dental Cement Preparation. *International Nano Letters* 2011;1(1):43-51.
- 29-Nccls (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard.M7- A5.2000
- 30-Nccls (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests, Approved Standard.M2-A7.2000.
- 31-Tamaddon F, Moradi S. NanoZnO as an Efficient & Reusable Catalyst for the Preparation of 1,4-DHPS via Hantzsch Reaction. *Iranian Journal of Catalysis* 2012;2(3):101-6.
- 32-Samuel S, Bose L, KC G. Optical properties of ZnO nanoparticles. *Academic Review* 2009;16(1):57-65.
- 33-Simchi A. Introduction Nanoparticles: Properties, production and application procedures, Chapter 5, Tehran: Sharif University Press; 2008, 280.
- 34-Jiang W, Mashayekhi H, Xing B. Bacterial toxicity comparison between nano and micro scaled oxide particles. *Environmental Pollution* 2009;157:1619-25.



- 35-Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Daskalakis Y, Jeuken L, Povey M, et al. Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E. coli. *Journal of Nanoparticle Research* 2010;12(5):1625-36.
- 36-Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, Jimenez de Aberasturi D, Ruiz de Larramendi I, Rojo T, et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology* 2012; 30(10):499-511.
- 37-Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Punnoose A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters* 2007;90(21):1-3.
- 38-Tam KH, Djuricic AB, Chan CMN, Xi YY, Tse CW, Leung YH, et al. Antibacterial Activity Of ZnO Nanorods Prepared By A Hydrothermal Method. *Thin Solid Films* 2008;516(18):6167-74.
- 39-Malakootian M, Tolabi A. Determining And Comparing The Effect Of Nanoparticle CuO, TiO₂ And ZnO In Removing Gram Positive And Negative Bacteria From Wastewater. *Toloo Behdasht* 2011;(2):1-11. [Persian]
- 40-Ma J, Liu J, Bao Y, Zhu Z, Wang X, Zhang J. Synthesis of large-scale uniform mulberry-like ZnO particles with microwave hydrothermal method and its antibacterial property. *Ceramics International* 2013;39(3):2803-10.
- 41-Seil JT, Webster TJ. Reduced Staphylococcus aureus proliferation and biofilm formation on zinc oxide, nanoparticle PVC composite surfaces. *Acta Biomaterialia* 2011;7(6):2579-84.
- 42-Ramani M, Ponnusamy S, Muthamizhchelvan C. From zinc oxide nanoparticles to microflowers: A study of growth kinetics and biocidal activity. *Materials Science and Engineering* 2012;32(8):2381-89.
- 43-Gunalan S, Sivaraj R, Rajendran V. Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens, *Progress in Natural Science: Materials International* 2012;22(6):695-702.



Synthesis Nano ZnO Assisted by Ultrasound Irradiation and Evaluation of Antimicrobial Properties

Nasiri A (Ms.c)¹, Malakootian M (Ph.D)², Tamaddon F (Ph.D)³

1. MS.c in Organic Chemistry, Researcher of Environmental Health Engineering Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2. Corresponding Author: Professor, Environmental Health Research Center and Department of Environmental Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3. Associate Professor, Department of Chemistry, Yazd University, Yazd, Iran

Abstract

Introduction: Introducing a powerful antibacterial agent to control pathogenic bacteria especially strains resistant to antibiotics is of paramount importance. The purpose of this study is ZnO nanoparticles synthesis by using ultrasonic waves and evaluation of its antibacterial properties.

Methods: Zinc oxide nanoparticles were synthesized using ultrasound irradiation. Then physical and chemical properties of nanoparticles were studied. Antibacterial activity of the nanoparticles was investigated for two strains bacteria: Escherichia coli and Staphylococcus aureus through standard methods such as placing well and disc diffusions, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC).

Results: Chemical and physical investigation of the synthesized ZnO nanoparticles indicated that from nanoscale particles, spherical forms were produced with no impurities. The MIC for E.coli and Staph.aureus were reported as 0.125 mg/ml, and 0.062 mg/ml respectively. The MBC for E.coli and Staph. aureus was reported to be 0.500 mg/ml, and 0.250 mg/ml respectively. In comparison, for the methods of well and disc diffusions, inhibition zone diameter of the well method was more than disc diffusion.

Conclusion: High purity zinc oxide nanoparticles can be synthesized by ultrasonic waves and have the significant antibacterial properties against Escherichia coli and Staphylococcus bacteria. In contrast to Escherichia coli, Staph. aureus showed greater sensitivity against Zinc Oxide nanoparticles.

Keywords: ZnO nanoparticle, Ultrasound irradiation, Antibacterial, Gram-negative, Gram-positive