

بررسی راندمان غیر فعال سازی اشریشیاکلی توسط نانو ذره آهن صفر ظرفیتی تثبیت شده با کربوکسی متیل سلولز

رویا زرعی^۱، محمد مسافری^{۲*}، محمد حسین سروش برحقی^۳، علیرضا ختایی^۴، محمد اصغری جعفر آبادی^۵

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی تبریز، کمیته تحقیقات دانشجویی

۲. دانشیار دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات مدیریت خدمات بهداشتی درمانی تبریز

۳. استادیار میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی تبریز ۴. دانشیار دانشکده شیمی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۵. استادیار گروه آمار دانشگاه علوم پزشکی تبریز

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۴۴۱۴۸۹۸۴ فکس: ۰۴۱۳۳۴۰۶۳۴ ایمیل: mmosaferi@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: نانوذرات آهن صفر ظرفیتی (NZVI) در رفع آلودگی‌های زیست محیطی به طور وسیع به کار گرفته شده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ضد باکتریایی NZVI تثبیت شده بر روی *E. coli* به انجام رسید. **روش کار:** NZVI سنتز و مشخصات آن با استفاده از XRD و SEM تعیین گردید. برای تثبیت سازی از کربوکسی متیل سلولز (CMC) استفاده شد. غیرفعال سازی *E. coli* با به کارگیری درصدهای وزنی مختلف CMC و غلظت‌های مختلف نانوذرات در زمان ۳۰ دقیقه بررسی و جهت مقایسه اثر ضد باکتریایی نانوذرات تثبیت شده با نانوذرات ساده، غلظت ۰/۱g/l نانوذرات با سوسپانسیون باکتریایی اختلاط داده شد. واریانس سه طرفه و دانکن برای تحلیل آماری استفاده گردید.

یافته‌ها: با افزایش غلظت نانوذرات و زمان تماس راندمان غیرفعال سازی *E. coli* افزایش، اما با افزایش درصد وزنی تثبیت کننده NZVI از راندمان غیرفعال سازی باکتری کاسته شد. به ازای همه سطوح غلظت باکتری و CMC به جز درصد وزنی ۰/۰۲، غلظت‌های ۱ و ۲ گرم در لیتر در مقایسه با ۰/۱ و ۰/۵ گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری نشان داده و در غلظت‌های ۱ و ۲ گرم در لیتر راندمان ۱۰۰٪ حاصل شد. بین نتایج حاصل از نانوذرات تثبیت شده و ساده اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به طوری که پس از زمان تماس ۱۲۰ دقیقه راندمان ۱۰۰ درصد در کاربرد نانوذرات ساده و راندمان ۷۸ درصد در مورد نانوذرات تثبیت شده حاصل گردید.

نتیجه گیری: CMC احتمالاً با ممانعت از تماس مستقیم نانوذرات و سلول‌های باکتری باعث کاهش برهم کنش آن‌ها شده و سمیت نانوذرات آهن را نسبت به سلول‌های باکتری کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات آهن، غیر فعال سازی *E. coli*، تثبیت سازی، کربوکسی متیل سلولز، گندزدایی

پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۸

دریافت: ۹۲/۸/۱۱

مقدمه

زیست حائز اهمیت است (۱). طی پیشرفت‌های اخیر در نانو تکنولوژی انواع گوناگونی از نانوذرات فلزی و اکسیدهای فلزی نظیر اکسید منیزیم (۲)، مس (۳) و نقره (۴-۷) با خاصیت میکروب کشی شناسایی شده است که در این میان نانوذرات مغناطیسی به ویژه به علت قابلیت بازیابی و جداسازی آن‌ها از آب تحت میدان مغناطیسی، مورد توجه واقع شده‌اند (۸، ۹).

گندزدایی به عنوان آخرین مرحله از فرآیند تصفیه آب در سراسر دنیا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و مهم‌ترین مرحله تصفیه آب از لحاظ تضمین سلامت جامعه محسوب می‌شود. بدین لحاظ به کارگیری فن‌آوری‌های مقبول از نقطه نظر تأمین اهداف چندگانه گندزدایی و مطلوب از جنبه سلامت محیط

آهن صفر ظرفیتی تثبیت شده مورد بررسی قرار نگرفته است.

با توجه به واکنش پذیری بالای الکترون‌های آزاد موجود در سطح نانوذرات، ذرات بدون پوشش در مقابل فاکتورهای محیطی مثل pH، دما، الکترولیت‌ها و حلال‌ها حساس‌تر می‌باشند (۱۶). همچنین نانوذرات فلزی گرایش زیادی به تجمع‌پذیری و ته‌نشینی دارند و این عوامل می‌تواند واکنش‌پذیری و کارایی آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (۱۷). با توجه به موارد ذکرشده محافظت از نانو ذرات در برابر اکسایش سریع و جلوگیری از تجمع آن‌ها از اهداف مهم در سنتز این نانو ذرات می‌باشد.

مواد تثبیت‌کننده از طریق دافعه الکترواستاتیکی و مانعت فضایی باعث افزایش پراکندگی و در نتیجه کاهش تجمع ذرات می‌شود (۱۸). کاربرد تثبیت‌کننده‌ها برهم کنش بین نانو ذرات را محدود نموده و می‌تواند نفوذپذیری آن‌ها را افزایش داده و در عین حال منجر به تولید سوسپانسیون دیسپرس‌تر (۱۹) و تولید نانو ذرات کوچک‌تر گردد (۲۰). انواع گوناگونی از مواد برای پایدارسازی می‌تواند به کار رود نظیر: تیول‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک، سیلیکا، سورفاکتانت‌ها، پلیمرها، پلیمرهای ترکیبی با آکرلیک اسید، اسیدهای استرین سولفونیک، وینیل سولفونیک و... ولی همه این مواد برای کاربردهای زیست محیطی مناسب نمی‌باشد (۲۱). کربوکسی متیل سلولز (CMC) ماده‌ای غیرسمی، قابل تجزیه بیولوژیکی و ارزان است که می‌تواند به‌عنوان یک عامل پراکنده‌کننده مؤثر برای نانو ذرات آهن مورد استفاده قرار گیرد (۲۲). پیش از این نیز کاربرد CMC در مطالعات ژو^۵ به‌عنوان تثبیت‌کننده سطح NZVI، منجر به افزایش قابل ملاحظه‌ای در واکنش پذیری سطح نانوذرات و انتقال‌پذیری آن گشت (۲۳). برای این منظور در مطالعه حاضر از کربوکسی متیل سلولز (CMC) به

نانوذرات آهن صفر ظرفیتی^۱ (NZVI) جزو اولین تولیدات تکنولوژی نانو در محیط زیست بوده (۹) و استفاده آن به دلیل مساحت سطحی بالا و واکنش‌پذیری زیاد در عرصه‌های مختلف شامل الکترونیک، پزشکی، مهندسی محیط زیست، گندزدایی فاضلاب همواره مورد توجه بوده است (۱۰). در مطالعات انجام یافته توسط بوکسال^۲ و همکاران، نانوذرات آهن صفر نسبت به نانوذرات سایر ترکیبات آهن، خواص میکروبی‌کشی قوی‌تری از خود نشان دادند (۱۱). قبلاً مطالعاتی در زمینه غیرفعال سازی باکتروفاژ توسط انواع ترکیبات آهن نظیر فیلترهای شنی پوشیده با اکسید آهن یا مقیاس‌های میکرو آهن صورت گرفته اما فعالیت ضد میکروبی با این ترکیبات ملزم به استفاده از زمان‌های تماس (چندین روز یا هفته) طولانی و دوزهای بالا بوده است (۱۲،۱۳). این در حالی است که در مطالعات لی^۳ و همکاران نانوذرات آهن صفر ظرفیتی در غلظت ۱۰۰ mg/l باکتری *E.coli* را به سرعت غیرفعال نموده در عین حال که به آسیب فیزیکی قابل ملاحظه‌ای در غشای سلولی و به دنبال آن تراوش محتویات داخل سلولی منجر شدند (۱۴). اوفال^۴ و همکاران نیز سمیت NZVI را در غلظت کمتر از ۱۰۰ mg/l روی سلول‌های *E.coli* نشان داده و علت این سمیت را اعمال یک سری تنش اکسیداتیو توسط رادیکال‌های آزاد شده ROS مطرح نمودند. همچنین در مطالعه خود نشان دادند که سمیت نانوذرات آهن صفر ظرفیتی در مقایسه با نانوذرات سایر ترکیبات آهن نظیر مگنتیت (Fe_3O_4) و نانو اکسید آهن (Fe_2O_3) بیشتر می‌باشد (۱۵). هر چند مطالعاتی در زمینه خواص باکتری‌کشی نانوذرات آهن صفر ظرفیتی صورت گرفته است، اما در پژوهش‌های صورت گرفته اثر باکتری‌کشی نانوذرات

¹ Nano Zero Valent Iron

² Boxall

³ Lee

⁴ Auffal

⁵ Zhou

مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰، برداشت نموده و دو بار در ۵۰ میلی لیتر محلول فسفات بافر سالین (PBS) ۱۵۰ میلی مول شستشو داده شد. محلول *E. coli* از طریق تعلیق مجدد سوسپانسیون باکتری‌های رسوبی در ۵۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۵۰ میلی مول PBS، آماده شد. تعداد سلول‌های باکتری با کشت آن‌ها به روش پخش در سطح پلیت مشخص گردید که در آن سلول‌های *E. coli* بر سطح نوترینت آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت و سپس تعداد کلنی‌های حاصل از کشت شمارش و محاسبه شد. جمعیت باکتریایی مورد نظر در سوسپانسیون ذخیره *E. coli* تقریباً به اندازه 2×10^5 - ۱ عدد در هر میلی لیتر محاسبه و تنظیم گردید.

آزمایشات غیرفعال‌سازی در دمای اتاق با استفاده از ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون *E. coli* بعد از ترقیق محلول سوسپانسیون استوک *E. coli* انجام شد. رقت‌های به کار رفته شامل ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ بود. جهت نشان دادن تأثیر تثبیت‌سازی در نانوذرات آهن صفر ظرفیتی، یک‌بار سوسپانسیون رقیق شده باکتری با غلظت‌های ۱/۱۰۰، ۱/۵۰، ۱/۲۰ از نانوذرات تثبیت شده CMC با درصدهای وزنی مختلف ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۲ درصد تماس داده شد و بار دیگر نیز غلظت ۱/۱۰۰ g/l از نانوذرات تثبیت شده با ۰/۲ درصد وزنی CMC و نانوذرات ساده، در زمان‌های ۵، ۱۵، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ دقیقه با سوسپانسیون باکتری اختلاط داده شد. قبل از قراردادن نمونه‌ها در شیکر (۲۰۰ rpm)، اکسیژن زدایی نمونه‌ها توسط گاز ازت انجام شد. نمونه‌ها بعد از اختلاط با روش پورپلیت کشت داده شدند و در هر مورد پلیت‌های سه‌تایی تهیه شده و بعد قرارگیری پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷-۳۵ به مدت ۱۸-۲۴ ساعت شمارش کلنی‌ها انجام شد. کشت نمونه‌های شاهد نیز در شرایط مساوی و بدون افزودن نانوذرات صورت گرفت. قابل ذکر می‌باشد که pH اولیه محلول در آزمایشات در رنج

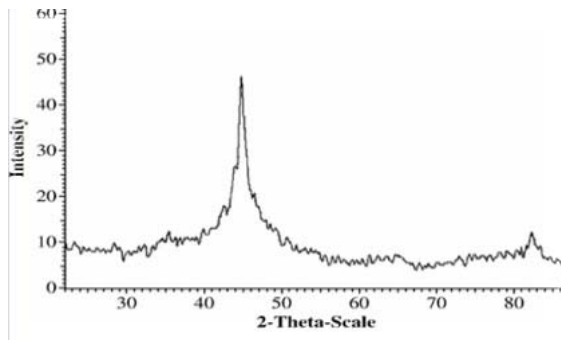
عنوان تثبیت‌کننده در سنتز نانوذرات استفاده گردید و تأثیر درصدهای وزنی مختلف تثبیت‌کننده در عملکرد ضد میکروبی NZVI بررسی شده و عملکرد ضد میکروبی نانوذرات آهن صفر ظرفیتی ساده (تثبیت نشده) و تثبیت شده با کربوکسی متیل سلولز مقایسه شد.

روش‌ها

نانوذرات آهن صفر ظرفیتی طبق روش اورفان و همکاران سنتز شد (۱۵). در این روش از احیای نمک سولفات آهن توسط بوروهیدرید سدیم (Na BH_4) استفاده شد. ابتدا محلول ۰/۱۴ مولار سولفات آهن ($\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Merck Co.) حاوی کربوکسی متیل سلولز (CMC) در بالن ریخته شده و به مدت ۱۵ دقیقه تحت گاز ازت جهت تشکیل کمپلکس CMC-Fe و اکسیژن‌زدایی هم زده شد. سپس بوروهیدرید سدیم (Merck Co.) به محلول اضافه شد. پس از افزودن تمام بوروهیدرید سدیم مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه به هم زده شد تا واکنش کامل گردد. محلول سنتز شده با سرعت ۲۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و همین عمل سه بار با الکل ۹۶٪ تکرار شد و رسوبات حاصله تحت خلأ خشک شدند. تهیه نانوذرات آهن ساده نیز بدون افزودن CMC و با روش مشابه صورت گرفت. مقادیر به کار رفته CMC شامل ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۲ درصد وزنی آهن بود.

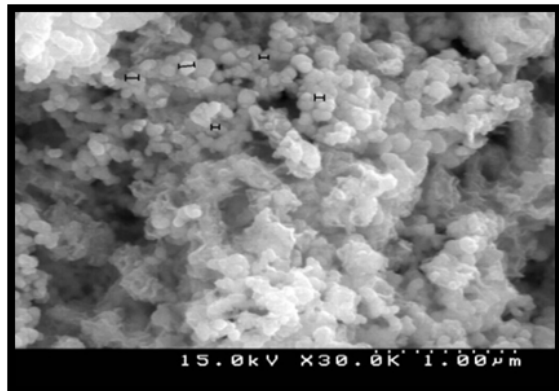
در این مطالعه سویه استاندارد باکتری اشریشیاکلی (ATCC 8739) به عنوان میکروارگانیزم مدل جهت نشان دادن خاصیت باکتری‌شناسی نانوذرات آهن صفر ظرفیتی تثبیت و غیر تثبیت و مقایسه اثر آن‌ها استفاده شد. *E. coli* به داخل ۵۰ میلی لیتر محیط کشت تریپتیک سوی براث (Merck KGaA, 4271 Darmstadt, Germany) تلقیح شده و به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و کشت داده شد. باکتری‌ها را پس از سانتریفیوژ کردن به

آهن صفر ظرفیتی است و بیک ضعیف‌تری در ۸۲/۳۳ (با اندیس میلر (۲۱۱)) دیده می‌شود. با توجه به طیف موجود در شکل مذکور هیچ پیکی مبنی بر اکسیداسیون آهن مشاهده نمی‌شود و نانوذرات سنتز شده فاقد هرگونه ناخالصی است. اندازه متوسط کریستال نانوذرات آهن نیز با استفاده از رابطه دبی- شرر حدود ۱۰ nm محاسبه شد.



شکل ۱. تصویر XRD نانو ذرات سنتز شده در این تحقیق

تصویر SEM نیز در شکل ۲ نشان می‌دهد که ذرات سنتز شده کروی شکل و در محدوده نانو بوده و قطر آن‌ها تقریباً ۱۰۰-۵۰ nm است.



شکل ۲. تصویر SEM نانوذرات آهن صفر ظرفیتی تثبیت شده با CMC

از آنجایی که خاصیت تجمع پذیری NZVI می‌تواند باعث افزایش اندازه و کاهش کارایی آن در غیرفعال سازی میکروارگانیزم‌ها گردد، بنابراین در مطالعه حاضر خواص ضد میکروبی نانوذرات تثبیت شده با ساده مقایسه شده و درصد های وزنی مختلف از کربوکسی متیل سلولز جهت تعیین اثر تثبیت سازی بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات تثبیت شده و ساده آهن صفر ظرفیتی هر دو از

جهت تعیین راندمان غیرفعال سازی اشریشیاکلی توسط نانوذرات تثبیت و غیر تثبیت رابطه زیر به کار گرفته شد:

$$\text{Removal rate (\%)} = \frac{\text{CFU}_{\text{control}} - \text{CFU}_{\text{exposed}}}{\text{CFU}_{\text{control}}} \times 100\%$$

که مقادیر $\text{CFU}_{\text{control}}$ و $\text{CFU}_{\text{exposed}}$ به ترتیب نشان‌دهنده تعداد کلنی‌های تشکیل شده در هر میلی‌لیتر از نمونه قبل و بعد از اختلاط با نانوذرات است.

جهت بررسی خصوصیات نانوذرات آهن صفر ظرفیتی از دستگاه (Siemens D5000) 4KV 30mA با تابش $\text{CuK}\alpha$ در طول موج 1.5418 \AA آنکستروم، متعلق به سازمان زمین شناسی، جهت تشخیص ساختار و ترکیب نانوذرات آهن صفر ظرفیتی و از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل (-Hitachi S4160 Japan) جهت شناسایی مورفولوژی و تعیین اندازه نانوذرات تثبیت شده استفاده گردید.

داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS-13 مورد آنالیز قرار گرفت. میانگین‌ها به همراه انحراف معیارشان تعیین گردید و از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه برای مقایسه اثر نانوذرات تثبیت شده با ساده و آنالیز واریانس سه طرفه با حضور اثرات متقابل سه تایی غلظت نانوذرات- تثبیت کننده CMC- غلظت باکتری استفاده شد و با توجه به معنی داری اثرات متقابل، آزمون تعقیبی دانکن^۱، به منظور یافتن ترکیب بهینه فاکتورهای فوق در بهینه سازی راندمان انجام شد (سطح معنی داری در کلیه آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد).

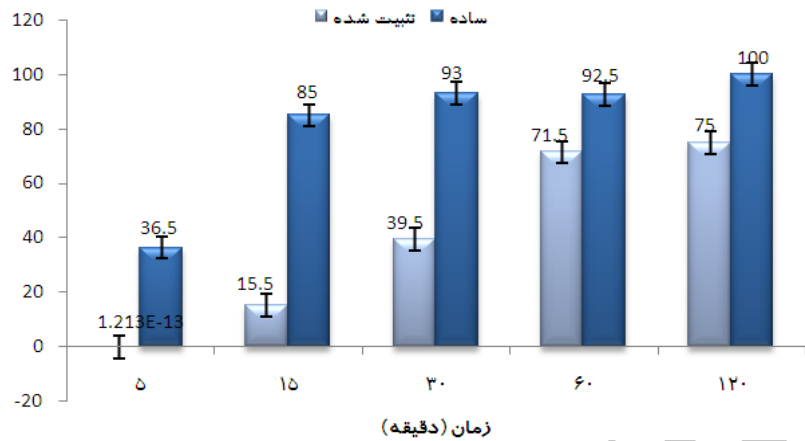
یافته‌ها و بحث

همان‌طور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود پیک اصلی مربوط به آهن صفر ظرفیتی در $2\theta = 44.7^\circ$ ظاهر می‌شود که همان پیک ۱۰۰ (بلندترین پیک)

¹ Post Hoc

در شکل ۳ درصد غیرفعال سازی اشریشیاکلی با 0.1g/l از نانوذرات تثبیت شده و ساده آهن صفر ظرفیتی مقایسه شده است.

خواص ضد میکروبی برخوردار می باشد، اما این خاصیت در نانوذرات ساده قوی تر می باشد.



شکل ۳. مقایسه میزان غیر فعال سازی *E. coli* با نانوذرات تثبیت شده و ساده

به طوری که افزایش در درصد وزنی CMC منجر به کاهش سمیت نانوذرات نسبت به *E. coli* گشته است، اما با افزایش غلظت نانوذرات به 2g/l و 1g/l در درصد های وزنی مختلف CMC سطح یکسانی از غیرفعال سازی باکتری حاصل شده است (۱۰۰٪) و در غلظت های بالاتر روند کاهش جمعیت باکتریایی مشابه هم بوده است. همچنین این شکل نشان می دهد که بین کاهش جمعیت باکتریایی و غلظت NZVI همواره ارتباط مستقیمی برقرار است. مطابق با تجزیه و تحلیل آماری واریانس دوطرفه، اختلاف معنی داری بین میزان غیرفعال سازی *E. coli* توسط دو نوع نانوذرات پایدار شده و ساده وجود داشت ($p < 0.05$). تحلیل واریانس سه طرفه نیز نشان داد که به ازای همه سطوح غلظت باکتری و CMC، غلظت های 2g/l و 1g/l در مقایسه با 0.1g/l و 0.5g/l تفاوت معنی داری نشان دادند، به جز درصد وزنی 0.2g/l CMC که غلظت 0.5g/l نیز با 2g/l و 1g/l اختلاف معنی داری نداشت. آزمون آنالیز واریانس سه طرفه نشان داد که همه فاکتورهای مورد بررسی شامل زمان، سطوح مختلف تثبیت کننده، غلظت اولیه باکتری و غلظت نانوذرات، ارتباط معنی داری با راندمان غیرفعال سازی *E. coli* داشتند ($p < 0.05$).

چنانچه در شکل ۳ مشاهده می شود کاهش جمعیت باکتریایی توسط نانوذرات ساده نسبت به تثبیت شده از روند سریع تری برخوردار است و نانوذرات تثبیت شده در زمان های تماس پایین دارای خواص ضد میکروبی جزئی می باشند، حتی بعد از ۵ دقیقه اختلاط سوسپانسیون میکروبی با نانوذرات تثبیت شده افزایش در رشد باکتری اتفاق افتاده است و این در حالی ست که در شرایط یکسان و با کاربرد نانوذرات ساده، راندمان ۳۶ درصد از غیرفعال سازی حاصل گردید. با افزایش زمان تماس باکتری و نانوذرات به ۱۲۰ دقیقه تعداد کلنی های شمارش شده در نمونه های تماس یافته با نانوذرات تثبیت نشده صفر بود (راندمان ۱۰۰٪)، در حالی که در همین زمان تماس با نانوذرات تثبیت شده میزان ۷۷ درصد از غیرفعال سازی مشاهده شد. به ازای افزایش زمان تماس، اختلاف مابین راندمان غیرفعال سازی باکتری ها توسط دو نوع نانوذره تقلیل یافته است. شکل ۵ و ۴ نیز راندمان غیرفعال سازی در سطوح مختلف تثبیت کننده و در دو رقت $1/1000$ و $1/100$ از باکتری را نشان می دهد. آنچه در این اشکال واضح است وجود رابطه معکوس بین میزان تثبیت کننده به کار رفته با راندمان غیرفعال سازی باکتری می باشد؛

اما غلظت نانوذرات بزرگ‌ترین اندازه اثر را در بین فاکتورهای مورد بررسی داشت. مطابق آزمون‌های تعقیبی دانکن شرایط بهینه آزمایش در زمان اختلاط ۱۲۰ دقیقه و کاربرد ذرات ساده و سپس نانوذرات تثبیت شده با ۰/۰۲ درصد وزنی حاصل شد.

نتیجه غیرمنتظره‌ای که در مقایسه کارایی باکتری‌کشی نانوذرات تثبیت شده و ساده مشاهده شد، افزایش جمعیت باکتریایی در نمونه‌های تماس‌یافته با نانوذرات تثبیت شده نسبت به نمونه‌های شاهد در زمان تماس ۵ دقیقه بود. در تفسیر این نتیجه می‌توان گفت با توجه به قابلیت جذب و مصرف گلوکز حاصل از تجزیه CMC توسط میکروب‌ها، در زمان‌های تماس کوتاه مدت بلافاصله میکروب‌ها از تثبیت‌کننده به‌عنوان عامل مغذی استفاده کرده و میزان رشد آن‌ها افزایش یافته است اما با اختلاط بیشتر نمونه‌های میکروبی با نانوذرات تثبیت شده و مصرف کریوکسی متیل سلولز توسط *E. coli* دسترسی Fe^0 به سطح باکتری افزایش می‌یابد و کاهش جمعیت باکتریایی در زمان‌های تماس بالاتر را منجر می‌شود. آن چه در یافته‌های این مطالعه مشهود است کاهش در کارایی و سرعت غیرفعال سازی اشیریشیاکلی بر اثر تثبیت‌سازی نانوذرات آهن صفر ظرفیتی با CMC می‌باشد.

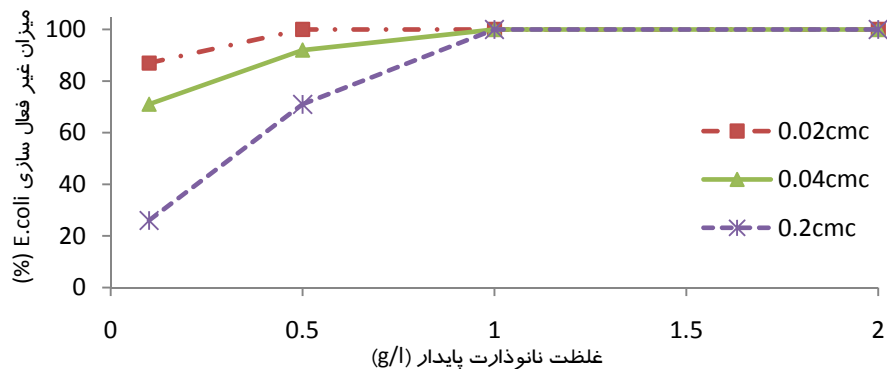
والودکار^۱ و همکاران نیز در تحقیقات خود به نتایج مشابهی دست یافتند و جهت کاهش در بقا سلول و تراوش LDH توسط نانوذرات تثبیت شده با نشاسته، غلظت‌های بالاتری در مقایسه با نانوذرات تثبیت نشده مس و یون‌های Cu^{2+} لازم بود، که علت این یافته را کاهش سرعت انتشار یون‌های آزادشده از سطح نانوذرات پوشش‌یافته با نشاسته بیان کردند (۲۴). یون‌های فلزی رها شده از سطح نانوذرات به واسطه اختلال در عملکرد آنزیم‌های پروتئینی می‌توانند از رشد باکتری پیشگیری کنند (۲۵) و کاربرد اصلاح‌کننده‌های سطوح نانوذرات احتمالاً

عملکرد این یون‌های فلزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. با استناد به مطالعات پیشین مکانیسم‌های موثر در غیرفعال سازی میکروارگانیسم‌ها توسط نانوذرات آهن صفر ظرفیتی آسیب دیواره سلولی، اختلال در عملکرد آنزیمی سلول‌ها و تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌باشد (۱۴،۱۵) و نظر به این که یکی از مکانیسم‌های فرض‌شده جهت غیرفعال سازی میکروارگانیسم‌ها با نانوذرات آهن صفر ظرفیتی تولید گونه‌های اکسیژن فعال شامل سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل می‌باشد (۲۶) که جهت تولید ROS از اکسیژن داخل سلولی و تجزیه و احیاء گروه‌های موجود در پروتئین و لیپولی ساکارید غشای سلولی نیاز به تماس نزدیک با نانوذرات است (۲۷). پوشش نانو ذرات با تثبیت‌کننده می‌تواند از تماس کامل بین ذرات و سلول‌ها ممانعت به عمل آورده و با ایجاد یک مانع دیفیوژن اطراف نانوذرات، برهم کنش بین نانوذرات یا رادیکال‌های آزاد حاصله از نانوذرات آهن صفر ظرفیتی را با دیواره سلولی باکتری کاهش دهد و در واقع با کاربرد تثبیت‌کننده نیروهایی که از تجمع‌پذیری نانوذرات جلوگیری می‌کنند، همچنین می‌توانند از تماس مستقیم بین باکتری و نانو ذرات نیز پیشگیری کنند. از طرفی کیشک^۲ و همکاران طی تحقیقات خود نشان دادند که CMC می‌تواند همانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD) عمل کرده و رادیکال‌های آزاد را مهار نماید (۲۸) که پیش از این در مطالعات چانگ^۳ و همکاران سوپراکسید دیسموتاز به عنوان آنزیم مهارکننده رادیکال‌های آزاد، عامل تأثیرگذار در کاهش سمیت نانوذرات نقره نسبت به *E. coli* ذکر شده بود (۲۹). ضمن این که حضور گروه‌هایی نظیر رادیکال‌های هیدروکسیل اتصال زیستی بیشتری بین سلول‌ها و نانوذرات فراهم می‌کند (۳۰) و مهار رادیکال‌های آزاد توسط CMC

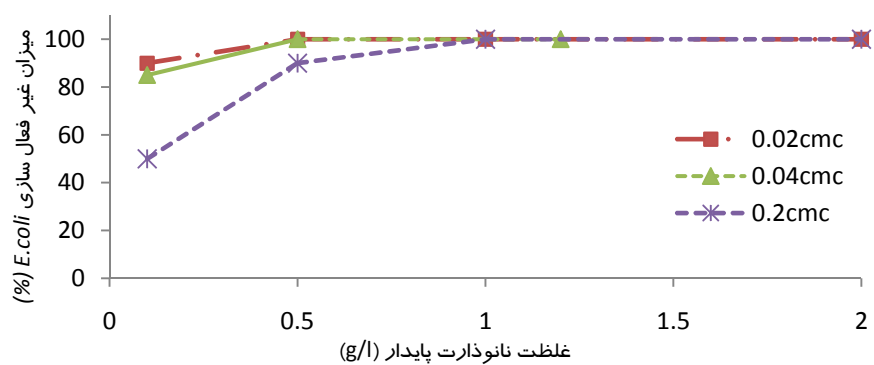
^۲ Kishk^۳ Chang^۱ Valodkar

بار منفی در CMC می‌تواند از طریق نیروی دافعه الکترواستاتیک از تماس باکتری و نانوذرات پوشش یافته ممانعت به عمل آورده و از آن جایی که تماس مستقیم سلول‌ها و نانوذرات از شرایط لازم جهت برهم کنش آن‌ها است، سمیت نانوذرات پوشش یافته نسبت به سلول‌ها کاهش یافته و جهت غلبه بر این نیروی دافعه غلظت‌های بیشتری از نانوذره و زمان‌های تماس بالاتری نیاز خواهد بود. اما از آن جا که نانوذرات ساده فاقد نیروی دافعه الکترواستاتیکی نسبت به سطح دیواره باکتری هستند، در گستره وسیعی از زمان‌های تماس و غلظت می‌توانند به سطح باکتری جذب شده و آن را غیر فعال سازند.

همچنین می‌تواند میزان این اتصال را کاهش دهد. علاوه بر آن طی مطالعه‌ای مشابه بر اثر اصلاح نانوذرات طلا توسط تثبیت‌کننده‌هایی با بار مثبت، سمیت نانوذرات طلا در برابر باکتری‌ها افزایش یافت که عامل تأثیرگذار در نتیجه مشاهده شده جاذبه الکترواستاتیکی برقرار شده بین سطح ذرات و دیواره باکتری گزارش شد (۳۱). از طرفی ژو و همکاران نیز در تحقیقات خود نشان دادند که نانوذرات Fe/Pd تثبیت شده با CMC در طیف‌های وسیعی از pH دارای بار منفی بوده است (۲۳). با توجه به توضیحات ارائه‌شده می‌توان گفت به علت این که باکتری‌ها دارای بار سطحی منفی هستند، حضور گروه‌هایی با



شکل ۴. بررسی راندمان غیرفعال سازی *E. coli* توسط سطوح مختلف تثبیت کننده در رقت ۱/۱۰۰ باکتری



شکل ۵. بررسی راندمان غیرفعال سازی *E. coli* توسط سطوح مختلف تثبیت کننده در رقت ۱/۱۰۰۰ باکتری

بالایی از غیرفعال سازی باکتری‌ها توسط نانو ذرات تثبیت شده، زمان‌های تماس و غلظت‌های بالاتری را می‌طلبد. البته جهت حصول اطمینان بیشتر بر تاثیر تثبیت سازی NZVI در خواص ضد میکروبی آن نیاز به تحقیقات بیشتر در زمینه سایر انواع

نتیجه گیری

بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان بیان نمود که نانوذرات آهن صفر ظرفیتی تثبیت شده و تثبیت نشده هر دو دارای خاصیت ضد میکروبی هستند اما این خاصیت در حالت ساده و پوشش نیافته نانوذرات قوی‌تر می‌باشد، بطوری که دستیابی به راندمان‌های

اصلاح کننده‌های سطوح نانوذرات به‌ویژه تثبیت کننده‌هایی با بار سطحی مثبت می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح پژوهشی مصوب سال ۹۰ به شماره الف/۱۵۱ است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز در دانشکده بهداشت اجرا شده است و نویسندگان مقاله بدین ترتیب مراتب تقدیر خود را اعلام می‌دارند.

References

- 1- Vaezi F, Mohammadi A. Regulation of water disinfection and operation of disinfectants, Se-Ostad, Tehran, 2003.
- 2- Stoimenov PK, Klinger RL, Marchin GL, Klabunde KJ. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*. 2002; 18(17):6679-86.
- 3- Hsiao M-T, Chen S-F, Shieh D-B, Yeh C-S. One-pot synthesis of hollow Au₃Cu₁ spherical-like and biomineral botallackite Cu₂(OH)₃Cl flowerlike architectures exhibiting antimicrobial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006; 110(1):205-10.
- 4- Alt V, Bechert T, Steinrcke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*. 2004; 25(18):4383-91.
- 5- Furno F, Morley KS, Wong B, Sharp BL, Arnold PL, Howdle SM, et al. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 54(6):1019-24.
- 6- Jeong SH, Yeo SY, Yi SC. The effect of filler particle size on the antibacterial properties of compounded polymer/silver fibers. *Journal of Materials Science*. 2005; 40(20):5407-11.
- 7- Chou W, Yu D, Yang M. The preparation and characterization of silver loading cellulose acetate hollow fiber membrane for water treatment. *Polymers for advanced technologies*. 2005; 16(8):600-7
- 8- Brame J, Li Q, Alvarez PJJ. Nanotechnology-enabled water treatment and reuse: emerging opportunities and challenges for developing countries. *Trends in Food Science & Technology*. 2011;22(11):618-24.
- 9- Wang C-B, Zhang W-X. Synthesizing nanoscale iron particles for rapid and complete dechlorination of TCE and PCBs. *Environmental science & technology*. 1997;31(7):2154-6.
- 10- Barnes RJ, van der Gast CJ, Riba O, Lehtovirta LE, Prosser JI, Dobson PJ, et al. The impact of zero-valent iron nanoparticles on a river water bacterial community. *Journal of hazardous materials*.2010;184 (1):73-80.
- 11- Boxall ABA, Tiede K, Chaudhry Q. Engineered nanomaterials in soils and water: how do they behave and could they pose a risk to human health? *Nanomedicine*. 2007; 2(6):919-27.
- 12- Ryan JN, Harvey RW, Metge D, Elimelech M, Navigato T, Pieper AP. Field and laboratory investigations of inactivation of viruses (PRD1 and MS2) attached to iron oxide-coated quartz sand. *Environmental science & technology*. 2002; 36(11):2403-13.
- 13- You Y, Han J, Chiu PC, Jin Y. Removal and inactivation of waterborne viruses using zerovalent iron. *Environmental science & technology*. 2005; 39(23):9263-9.
- 14- Lee C, Kim JY, Lee WI, Nelson KL, Yoon J, Sedlak DL. Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environmental science & technology*. 2008; 42(13):4927-33.
- 15- Auffan M, Achouak W, Rose Jm, Roncato M-A, Chane C, Waite DT, et al. Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*. *Environmental science & technology*. 2008; 42(17):6730-5.
- 16- Wei D, Sun W, Qian W, Ye Y, Ma X. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research*. 2009; 344(17):2375-82.

- 17- El-Rafie MH, El-Naggar ME, Ramadan MA, Fouda MMG, Al-Deyab SS, Hebeish A. Environmental synthesis of silver nanoparticles using hydroxypropyl starch and their characterization. *Carbohydrate Polymers*.2011; 86(2):630-5.
- 18- Nozad Ashan N. Synthesizing nanoscale zero-valent iron particles by chemical and electrochemical methods and their application in the removal of dye Reactive Navy Blue Sp-BR [Master of Science]: Tabriz university, 2012.
- 19- Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005; 26(18):3995-4021.
- 20- He F, Zhao D, Liu J, Roberts CB. Stabilization of Fe-Pd nanoparticles with sodium carboxymethyl cellulose for enhanced transport and dechlorination of trichloroethylene in soil and groundwater. *Industrial & engineering chemistry research*. 2007; 46(1):29-34.
- 21- Savage N MD, . DJ, SA, Richard S. *Nanotechnology Applications for Clean Water*. Ramsden J, editor. N o r w i c h: William Andrew Inc; 201.
- 22- Hebeish AA, El-Rafie MH, Abdel-Mohdy FA, Abdel-Halim ES, Emam HE. Carboxymethyl cellulose for green synthesis and stabilization of silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*.2010; 82(3):933-41.
- 23- Zhou H, Han J, Baig SA, Xu X. Dechlorination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by sodium carboxymethyl cellulose-stabilized Pd/Fe nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*.198(0):7-12.
- 24- Valodkar M, Rathore PS, Jadeja RN, Thounaojam M, Devkar RV, Thakore S. Cytotoxicity evaluation and antimicrobial studies of starch capped water soluble copper nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*.2012; 201-202(0):244-9.
- 25- Kim DK, Mikhaylova M, Wang FH, Kehr J, Bjelke B, Zhang Y, et al. Starch-coated superparamagnetic nanoparticles as MR contrast agents. *Chemistry of Materials*. 2003; 15(23):4343-51.
- 26- Biswas P, Wu CY. Nanoparticles and the environment. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 2005; 55(6):708-46.
- 27- Li Z, Greden K, Alvarez PJJ, Gregory KB, Lowry GV. Adsorbed polymer and NOM limits adhesion and toxicity of nano scale zerovalent iron to *E. coli*. *Environmental science & technology*.2010;44 (9):3462-7.
- 28- Kishk YFM, Al-Sayed H. Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. *LWT-Food Science and Technology*. 2007;40(2):270-7.
- 29- Chang Q, Yan L, Chen M, He H, Qu J. Bactericidal mechanism of Ag/Al₂O₃ against *Escherichia coli*. *Langmuir*. 2007; 23(22):11197-9.
- 30- Travan A, Pelillo C, Donati I, Marsich E, Benincasa M, Scarpa T, et al. Non-cytotoxic silver nanoparticle-polysaccharide nanocomposites with antimicrobial activity. *Biomacromolecules*. 2009; 10(6):1429-35.
- 31- Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chemistry*. 2004; 15(4):897-900.

***E. coli* Inactivation Efficiency of Zero-Valent Iron Nanoparticles Stabilized by Carboxymethyl Cellulose**

Zarei R¹, Mosaferi M *², Soroush Barhagi MH³, Khataee AR⁴, Asghari Jafarabadi M⁵

1. MSc Student of Environmental Health, Student Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
2. Associate Professor in Tabriz Health Services Management Research Center, Faculty of Health, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3. Assistant Professor in Department of Microbiology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4. Associate Professor in Faculty of Chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran
5. Assistant Professor in Department of Statistics, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

* **Corresponding author.** Tel: +989144148984 Fax: +984133340634 E-mail: mmosaferi@yahoo.com

Received: 2 Nov 2013 Accepted: 9 Mar 2014

ABSTRACT

Background & Objectives: Zero-valent iron nanoparticles have been widely used as an effective agent in environmental remediation. The present study was designed to determine bactericidal effect of stabilized zero-valent iron nanoparticles on *E.coli*.

Methods: Nano zero-valent iron (NZVI) particles were synthesized and characterized using X-ray diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscopy (SEM). Carboxymethyl cellulose (CMC) was used for stabilizing particles. Inactivation of *E.coli* was tested using different wt% (w/w) of CMC and different concentrations of stabilized nanoparticles for a period of 30 min. To compare antibacterial effects of stabilized and non-stabilized NZVIs, 0.1g/l of nanoparticles was mixed with *E. coli* suspension. For statistical purposes three-way ANOVA and Duncan's tests were used.

Result: Increasing nanoparticle concentration and contact time increased *E. coli* inactivation efficiency. However bactericidal effect was decreased with increasing wt% of NZVI stabilizer. Significant differences were observed between concentrations of 1 and 2 g/l and 0.1 and 0.5 g/l for all levels of bacteria density and CMC except for 0.02 wt%. Efficiency of 100% was obtained at concentrations of 1 and 2 g/l. Significant differences were found between results of stabilized and non-stabilized nanoparticles. After contact time of 120min, inactivation efficiency of 100 and 78% were observed for non-stabilized and stabilized particles, respectively.

Conclusions: CMC might prevent direct physical contact of bacteria with nanoparticle's surface and reduce their interaction and consequently cause a reduction in toxicity of nanoparticles against bacteria.

Keywords: Iron Nano Particles, Inactivation of *E.coli*, Stabilization, Carboxy Methyl Cellulose, Disinfection