مجله سلامت و محیط، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی
انجمن علمی بهداشت محیط ایران
دوره پنجم، شماره چهارم، پاییز ۱۳۹۱، صفحات ۴۶۳ تا ۴۷۴

کارایی ضد میکروبی سوسپانسیون نانو ذره اکسید روی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

ادریس حسین زاده[۱]، محمدرضا سمرقندی[۲]، محمدیوسف علی‌خانی[۳]، قدرتا... روشنایی[۴]، قربان عسگری[۵]

نویسنده مسئول: همدان، چهارراه پژوهش، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده بهداشت، گروه بهداشت محیط *mrsamaeghani@umsh.ac.ir*

دریافت: ۹۱/۰۲/۲۰ پذیرش: ۹۱/۰۵/۱۵

چکیده

مقدمه و هدف: *به موازات توسعه سریع زندگی بشری، کنترل اثرات مضر میکروارگانیسم‌ها امری غیرقابل اجتناب است. هدف از این مطالعه بررسی کارایی ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی در مقابل سویه‌های میکروبی بوده است.*

مواد و روش‌ها: *این مطالعه به صورت تجربی و با استفاده از باکتری‌های گرم منفی وگرم مثبت انجام شد. ویژگی‌های نانوذره با استفاده از XRD، میکروسکوپ الکترونی روبشی و انتقالی تعیین شد. حساسیت باکتری‌ها نسبت به نانوذرات با استفاده از روش انتشار دیسک و حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد تعیین گردید. مطالعات زمان مرگ با تعداد اولیه باکتری‌ها معادل 10^8 CFU/mL انجام شد. pH نقطه صفر بار الکتریکی (pH_{ZPC}) نانوذرات با استفاده از روش تعادل به دست آمد. اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 مدیریت شده و با استفاده از آزمون‌های آماری پیرسون، ANOVA و آزمون t تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری در تمامی آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.*

یافته‌ها: *بررسی ویژگی نانوذرات با XRD، SEM و TEM نشان داد که اندازه ذرات در محدوده نانو قرار دارد و هیچ‌گونه ناخالصی در کریستال نانو ذرات وجود ندارد. قطر نانو ذرات اکسید روی ۲۰nm به دست آمد. مقدار pH_{ZPC} برای ZnO ۷/۵۱ به دست آمد. قطر هاله عدم رشد باکتری پسودوموناس آیروژینوزوا در تماس با ZnO بزرگتر از بقیه سویه‌ها بود. جمعیت پسودوموناس آیروژینوزوا در غلظت 2xMIC در مدت زمان min ۱۵۰ در حضور ZnO به صفر رسیده است. تعداد باکتری‌های زنده مانده، با زمان، غلظت نانو ذرات و سویه باکتری در مطالعات زمان مرگ دارای اختلاف معنی‌داری بوده است ($P<0/001$).*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نشان داد که نانوذره اکسید روی اثر ضد باکتریایی داشته و می‌تواند به عنوان گزینه مناسبی برای حذف باکتری‌های گرم مثبت و منفی به ویژه باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی استفاده گردد.*

واژگان کلیدی: باکتری گرم مثبت، باکتری گرم منفی، اثر ضدمیکروبی، اکسید روی

۱-کارشناس ارشد بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی خرم آباد، لرستان
۲- دکترای بهداشت محیط، دانشیار دانشکده بهداشت، عضو مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان
۳- دکترای میکروب‌شناسی پزشکی، دانشیار دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان
۴- دکترای آمار زیستی، استادیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان
۵- دکترای بهداشت محیط، دانشیار دانشکده بهداشت، عضو مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بنابر تخمین سازمان بهداشت جهانی، روزانه از هر ۱۰ بیماری که در بیمارستان‌ها پذیرش می‌شوند، یک نفر به عفونت‌های بیمارستانی مبتلا می‌شود و تقریبا ۱۰٪ بیماران مبتلا جان خود را از دست می‌دهند و هزینه‌ای که این بیماران جهت درمان متحمل می‌شوند، سه برابر هزینه بیمارانی است که به عفونت بیمارستانی مبتلا نشده‌اند(۱). توسعه برخی مواد با خواص ضد میکروبی از دیرباز جزو اهداف بلند پایه علوم پزشکی بوده است(۲و۳). عوامل ضد میکروبی بر اساس ترکیب شیمیایی به دو دسته عوامل ضد میکروبی آلی و غیر آلی تقسیم‌بندی می‌شوند(۲و۴). بسیاری از نواقص عوامل ضدمیکروبی آلی منجر به محدودیت استفاده آنها شده است که می‌توان به مقاومت پایین آنها در مقابل حرارت، قابلیت تجزیه و در نتیجه نیمه عمر پایین در حرارت و فشار نسبتا بالا اشاره نمود(۵). در نتیجه عوامل ضد میکروبی غیر آلی در شرکت‌های ساخت عوامل ضد میکروبی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند(۴و۵). از بین عوامل ضد میکروبی غیر آلی، اکسید نانوذرات بسیار مورد توجه بوده و در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند(۸-۶). ذرات غیر آلی با اندازه نانو به دلیل طبیعت و ترکیب ساده، خواص فیزیکی و شیمیایی یکسانی بروز می‌دهند؛ بنابراین به طور فزاینده‌ای استفاده از آنها در ساخت و تجهیز دستگاه‌های نانو که در بسیاری کاربردهای دارویی، بیوپزشکی، بیولوژیکی و فیزیک استفاده می‌شوند، در حال افزایش است(۵). برخی از نتایج تحقیقات به دست آمده احتمال تولید انواع جدیدی از مواد نانو که از نظر سطح و ساختار می‌توان از آنها در استفاده به عنوان عوامل ضد میکروبی پیشنهاد کرده‌اند(۸). مقاومت باکتریایی به عوامل باکتریوستاتیک و باکتری‌کش در سال‌های اخیر به علت گسترش سویه‌های مقاوم افزایش یافته است(۳). برخی عوامل ضد میکروبی به صورت وسیعی التهاب آور بوده و سمی‌اند(۹) بنابراین تلاش جهت معرفی انواع جدیدی از عوامل بیوسید که استفاده از آنها ایمن و مقرون به صرفه باشد جزو اولویت‌های پژوهشی بسیاری از ارگان‌های مرتبط با سلامت معرفی شده است. محقیقن زیادی در مطالعه خود به این نتیجه رسیده‌اند نانو اکسید فلزات بسیار فعال بوده و در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی فعالیت باکتری‌کشی فوق‌العاده‌ای نشان می‌دهند(۱۰و۱۱). براساس مطالعه Atmaca و همکاران(۱۲) اکسید روی و استات روی علیه باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و سودوموناس آیروژینوزا در محیط مولرهینتون براث، دارای اثر ضدمیکروبی است. به طوری که اثر اکسید روی بر استافیلوکوک اورئوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس بیشتر از سودوموناس آیروژینوزا بوده است. Xie و همکاران به این نتیجه رسیدند که مقدار MIC برای کمپیلوباکتر ججونی از ۰/۰۵ mg/mL – ۰/۰۲۵ متغیر است و نانو ذرات اکسید روی در این غلظت برای کمپیلوباکتر ججونی دارای فعالیت باکتری‌کشی بوده و صرفا باکتریو استاتیک نیست(۸). از عوامل ضد میکروبی غیر آلی می‌توان به اکسید برخی فلزات چون دی اکسید تیتانیوم، اکسید روی، اکسید منیزیم و اکسید مس اشاره کرد که در تحقیقات مختلف استفاده از آنها به عنوان عوامل ضد میکروبی توصیه شده است. هم‌چنین از این گونه مواد به عنوان عوامل ضدمیکروبی ایمن برای انسان و حیوانات ذکر شده است(۱۳). برخی از اکسیدهای فلزی چون اکسید منیزیم و اکسید کلسیم از جمله مواد مغذی که برای سلامتی انسان ضروریست. برخی دیگر از اکسیدهای فلزی چون دی اکسید تیتانیوم و اکسید روی به طور گسترده‌ای در تهیه محصولات مراقبتی استفاده می‌شوند(۱۳). در مطالعه‌ای که توسط Sinha و همکاران که برای بررسی اثر سمیت دو نانوذره رایج نقره و اکسید روی بر روی باکتری‌های سرما دوست (مزوفیل) و نمک دوست (هالوفیل) انجام شد؛ نتایج نشان داد که سمیت نانوذرات به طور کلی بر روی باکتری‌های گرم منفی بیشتر بوده است. نانوذرات اکسید روی میزان رشد سویه‌های انتروباکتر را به میزان ۵۰٪ و میزان رشد باکتری‌های نمک دوست را به میزان ۸۰ ٪ کاهش داده است. دلیل تاثیر بیشتر بر روی باکتری‌های نمک دوست به دلیل میزان بیشتر بار منفی بر روی سطح سلولی ذکر شده است. تاثیر اندک این نانو ذرات بر روی باکتری‌های گرم مثبت به علت حضور لایه ضخیم‌تر لایه پپتیدوگلیکان در این باکتری‌ها عنوان شده است(۲). Akhavan و همکاران در بررسی نانو ذرات مس و اکسید مس تثبیت شده بر روی فیلم‌های نازک سیلیس به عنوان

Archive of SID
www.SID.ir

ماده آنتی باکتریال، مشاهده کرده‌اند که نانو ذرات اکسید مس دارای خواص سمیت بیشتری برای باکتری اشرشیاکلی بوده و نانوذرات اکسید مس خاصیت میکروب‌کشی آهسته رهش را در حالت فتوکاتالیستی از خود نشان داده است(۱۸).

این مطالعه به منظور بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی با تعیین MIC،MBC، تعیین (Zero Point of Charge) pH_{zpc} نانوذرات اکسید روی و بررسی زمان مرگ باکتری‌های در تماس با دو غلظت 1,2x MIC انجام شد. در مطالعات مشابه انجام شده بر روی بررسی اثر ضد میکروبی سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی تحقیقات زیادی صورت نگرفته است و لازم به ذکر است که تحقیقات قبلی به منظور بررسی اثر نانو ذرات در حالت خشک انجام شده است که می‌تواند با نتایج بررسی سوسپانسیون نانوذرات تفاوت قابل ملاحظه‌ای داشته باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی طی دو مرحله تهیه سوسپانسیون نانوذره اکسید روی و انجام تست‌های تعیین پتانسیل ضد میکروبی نانوذره اجرا شد.

تهیه نانو ذره اکسید روی: نانو ذرات اکسید روی از محصولات کمپانی Nano Amor، ایالات متحده تهیه شد. اندازه ذرات، مرفولوژی و ترکیبات ساختاری نانو ذره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) یا میکروسکوپ الکترونی پراکنشی (TEM) و پراش اشعه ایکس (XRD) تعیین شد. برای تعیین و اندازه‌گیری سطح مخصوص نانوذرات تهیه شده، از روش آنالیز BET، اندازه‌گیری مولکول‌های گاز نیتروژن جذب شده بر روی سطح جامد، بهره گرفته شده است. برای تهیه محلول استوک نانوذرات، غلظت ۱۰ g/L نانوذره در محیط کشت استریل به صورت سوسپانسیون در آورده شد و برای پراکنده شدن مناسب آنها از دستگاه التراسونیک (Bandelin Sonorex RK 31H) به مدت زمان ۳۰ min استفاده شد .جهت جلوگیری از عدم بروز خطا هم‌زمان با اجرای آزمایشات حساسیت میکروبی سوسپانسیون‌ها تهیه شدند.

نمونه‌های باکتریایی: باکتری‌های مورد استفاده جهت انجام آزمایشات ضد باکتریایی شامل اشرشیاکلی (ATCC 25922)، پسودوموناس آیروژینوزا (ATCC 27853) از انواع گروه منفی، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (PTCC 1114) باکتری گرم مثبت بودند که به صورت فریز خشک نگه‌داری شده بودند. شرایط بهینه رشد آنها دمای $37\ ^0C$ شرایط هوازی و محیط کشت تریپتوسویا آگار است. این باکتری‌ها از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی تهیه گردیدند. سویه‌های استاندارد باکتری‌های مذکور روی محیط کشت آگار خونی کشت داده شدند و به مدت ۲۴ h در گرم خانه (RAD Production.co) با دمای $37\ ^0C$ نگه‌داری گردید. پس از طی مدت انکوباسیون، از نمونه باکتریایی برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی استفاده شد. به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی جهت انجام آزمایشات در هر روز، ابتدا نیم مک فارلند (۱۰۸× ۱/۵–۱ عدد باکتری در هر mL) تهیه شد. برای اطمینان از ایجاد کدورت صحیح سوسپانسیون نیم مک فارلند، جذب آن به وسیله اسپکتروفتومتر مریی ـ فرابنفش (UNICO-2100؛ ایالات متحده) در محدوده طول موج ۶۲۰nm اندازه‌گیری و میزان جذب در محدوده ۰/۱ –۰/۰۸تنظیم شد(۱۴).

تعیین حساسیت به عامل ضد میکروبی

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشدMIC: این پارامتر به عنوان کمترین غلظت نانوذرات که از رشد ارگانیسم‌ها در محیط کشت ممانعت می‌کند، تعریف می‌شود(۱۵) و بر اساس محیط کشت‌هایی که در سیستم ناپیوسته دارای غلظت‌های متفاوتی از نانو ذرات اکسید روی در سوسپانسیون هستند، تعیین گردید(۱۶).

در این روش از ۱۲ لوله که هر کدام حاوی ۲ mL محیط تریپتون سویا براث (TSB) استریل و سوسپانسیون نانو ذره اکسید روی بود، استفاده شد. سپس به لوله‌های یک تا دوازده، سوسپانسیون باکتری مورد نظر با رقت ۰/۰۱اضافه (یک لوله به عنوان شاهد بود و سوسپانسیونی در آن ریخته نشد) و به مدت ۲۴ h ساعت در انکوباتور شیکردار (۲۰۰rpm، دمای $37\ ^0C$ و حداکثر مدت زمان ۲۴ h) قرار گرفته و جواب با مشاهده کدورت و شفافیت به صورت رشد، یا عدم رشد در نظرگرفته شد. کمترین غلظت (بیشترین رقت) سوسپانسیون نانوذرات که کدورت (نشان‌دهنده رشد میکروارگانیسم) نشان نمی‌داد به عنوان حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد نانوذرات شناخته شد. در این رقت به دست

Archive of SID
www.SID.ir

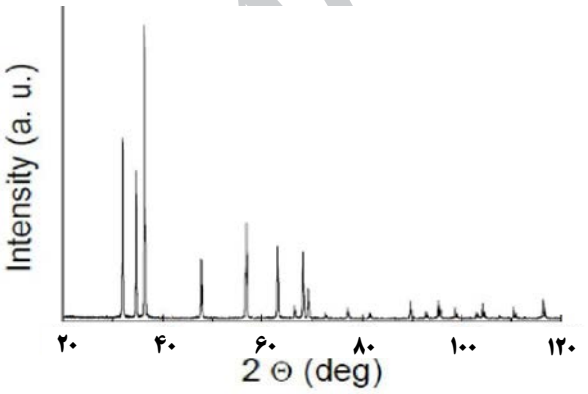
آمده سوسپانسیون نانو ذرات باکتریواستاتیک هستند.

روش دیسک‌گذاری: به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی سوسپانسیون نانوذرات از روش دیسک‌گذاری با سوسپانسیون باکتریایی ۰/۵ مک فارلند استفاده شد. برای تهیه دیسک‌های حاوی سوسپانسیون، دیسک‌های بلانک استریل را به تعداد مشخص در غلظت‌های تهیه شده از سوسپانسیون نانو ذرات قرار داده و به مدت یک شبانه روز به محتویات داخل ظرف زمان داده شد تا نانوذرات کاملا جذب دیسک‌های کاغذی شوند. لازم به ذکر است که در این آزمایش‌ها از دیسک آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین (برای سه سویه) و آمپی‌سیلین (برای استافیلوکوک اپیدرمیدیس) (HiMedia Laboratories Pvt. Limited) به عنوان شاهد h ۲۴ قطر هاله‌های عدم رشد باکتری‌ها اندازه‌گیری و میانگین آنها محاسبه شدند.

تعیین حداقل غلظت کشندگی نانوذرات MBC: برای تعیین MBC، از لوله‌هایی که در آنها کدورت دیده نشد بر روی محیط کشت آگار خونی کشت مجدد داده شدند(۱۴) و با روش رقت‌های متوالی شمارش کلنی صورت گرفت. اولین لوله‌ای که مقدار کاهش رشد تعداد باکتری‌های آن نسبت به زمان صفر لوله شاهد، بیشتر از ۰/۰۰۱ بود (کاهش ۹۹/۹۹٪ تعداد اولیه باکتری‌ها) به عنوان MBC انتخاب شد. در لوله کنترل نیز سوسپانسیون باکتری‌ها در مواجهه با نانو ذرات در محیط کشت قرار نداشتند، با شمارش CFU مربوط به آن از توانایی رشد باکتری در محیط کشت اطمینان حاصل شد.

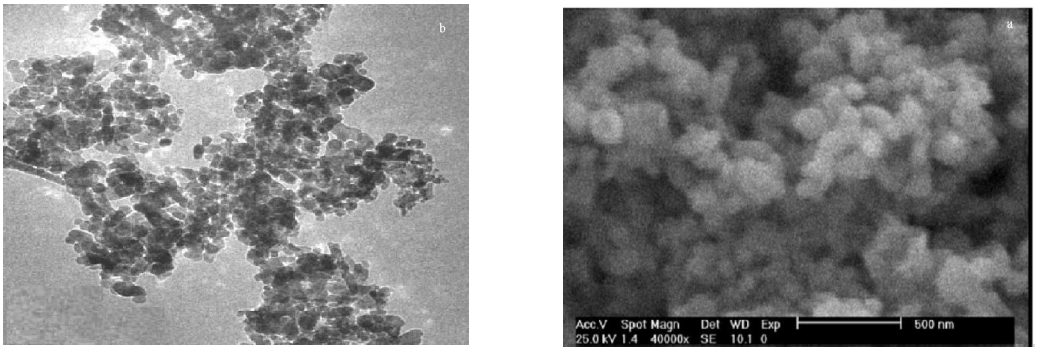
مطالعه زمان مرگ باکتری‌ها در تماس با نانو ذرات: در این مرحله از آزمایش‌ها از غلظت نیم مک فارلند جهت بررسی زمان مرگ باکتری‌ها استفاده شد. لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت بدون اضافه کردن نانو ذرات (کنترل منفی) و با اضافه کردن نانوذرات در غلظت‌های ۱ و ۲ ×MIC آماده و با سوسپانسیون باکتریایی تلقیح شدند. لوله‌ها در گرم‌خانه در شرایط مذکور در مراحل قبلی، قرار داده شدند و در زمان‌های صفر، t >۰ ≥۱ (به محض تلقیح)،min ۳۶۰ و ۳۰۰، ۲۴۰، ۱۸۰، ۱۵۰، ۱۲۰، ۹۰، ۶۰ و ۳۰ پس از تماس باکتری‌ها با سوسپانسیون نانو ذرات، در پایان هر زمان از لوله‌های انکوبه شده با رقت مناسب (۱۰ برابر)، نمونه کشت برداشته شده و در پلیت‌های حاوی محیط کشت آگار خونی کشت داده شدند. تعداد کلنی‌ها برای هر سویه و هر زمان بعد از h ۱۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شمارش می‌شدند.

تعیین pH_{ZPC}: pH_{ZPC}نقطه‌ای از pH که طی آن بارهای سطحی جاذب برابر صفر می‌شود، است. برای تعیین این پارامتر از محلول نمک طعام (Cermany- MERCK Inc.) ، ۰/۱Mبه عنوان الکترولیت و از محلول‌های سود و اسید کلریدریک۰/۱M به عنوان عوامل کنترل‌کننده pH استفاده گردید. مقدار mL ۳۰ از محلول الکترولیت را در ۱۱ عدد ارلن mL ۵۰ ریخته و pH محلول‌ها در محدوده ۲ تا ۱۲ با استفاده از اسید و سود با مولاریته مذکور تنظیم گردید. میزان جرمی g ۰/۲ از نانو ذرات اکسید روی در هر کدام از ارلن‌ها اضافه گردید(۱۷). به منظور کنترل نتایج یک ارلن محتوی الکترولیت و فاقد نانو ذره به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بعد از سپری شدن زمان فوق، pH نهایی هر یک از ارلن‌ها پس از سانتریفیوژ (Hettich مدل Rotofix 32 با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت min ۱۵) با استفاده از دستگاه pHمتر (schott Germany CG-824) خوانش گردید. خوانش‌ها ۳ بار تکرار شدند. نقطه pH_{ZPC} از رسم مقادیر اولیه در برابر مقادیر نهایی pH تعیین گردید. برای مدیریت داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 16، آمار توصیفی و آمار استنباطی (آزمون‌های آماری پیرسون، ANOVA و آزمون t) مناسب استفاده شد. در تجزیه و تحلیل آماری سطح معنی‌داری در کلیه آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.



شکل۱-الف: تصویرXRD نانو ذره اکسید روی مورد استفاده در این تحقیق

www.SID.ir
Archive of SID



شکل ۱- ب: تصویر نانو ذرات اکسید روی مورد استفاده در این تحقیق: a) SEM و b) TEM

یافته‌ها

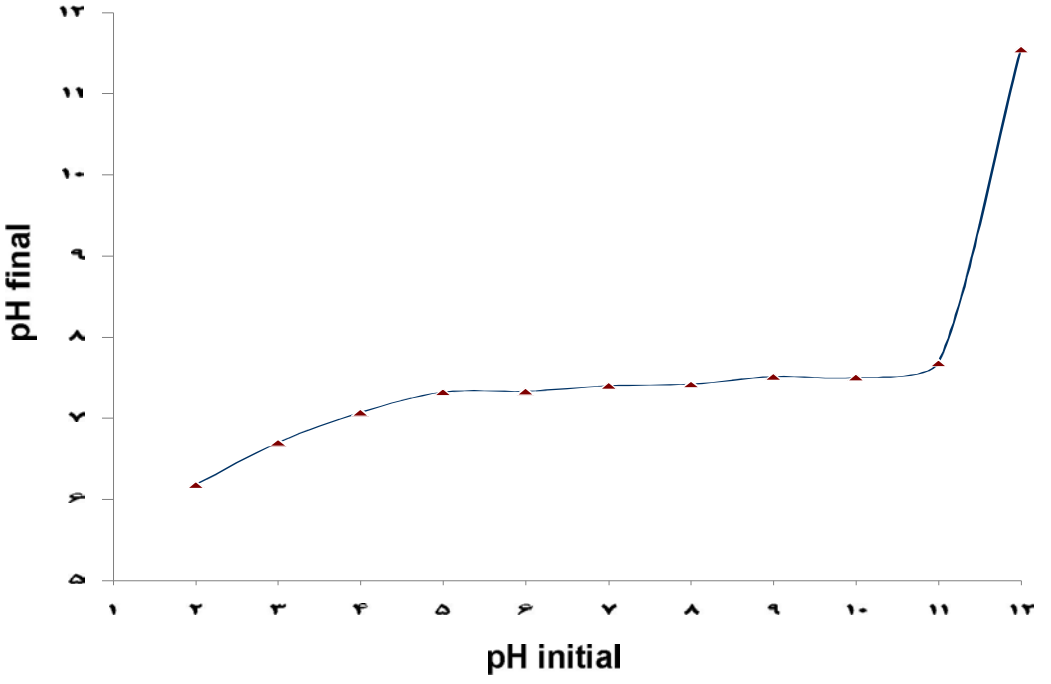
نتایج مطالعه در دو بخش مشخصات نانو ذره مورد استفاده در این تحقیق و نتایج تست‌های انجام شده ارایه شده است.

مشخصات نانوذره اکسید روی: برای بررسی ساختار بلوری و فازی نانو ذره اکسید روی از تفرق اشعه ایکس(XRD) استفاده شده است. شکل ۱(الف) تصویر XRD نانو ذره اکسید روی را نشان می‌دهد. شکل ۱(ب) تصویر SEM نانوذرات اکسید روی مورد استفاده در این تحقیق را نشان می‌دهد. مطالعات میکروسکوپ الکترونی روبشی و TEM بر روی نانوذرات اکسید روی مورد استفاده نشان داد که ذرات اکسیدروی دارای قطر ۲۰ nm هستند.

نتایج بررسی شکل، میزان سطح مخصوص، اندازه، رنگ ومیزان خلوص نانوذرات اکسیدروی در جدول ۱ آورده شده است.

بر اساس شکل۲، pH_{ZPC} نانو ذرات اکسید روی ۷/۵۱ به دست آمده است.

با توجه به انجام روش میکروبراث دایلوشن (جدول ۲) مقادیر غلظت مهارکننده رشد سوسپانسیون نانو ذره اکسید روی علیه باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه ۱۲۵۰ µg/mL –۱۵۶/۲۵ بوده است که در این میان کمترین غلظت مهارکننده رشد مربوط به پسودوموناس آیروژینوزا ATCC 27853 بوده است. هم‌چنین حداقل غلظت کشنده باکتری‌ها ۵۰۰۰ µg/mL –۳۱۲/ بود



شکل ۲: pH_{ZPC} نانو ذرات اکسید روی مورد استفاد در این مطالعه

www.SID.ir

جدول ۱: مشخصات کلی نانو ذرات اکسید روی مورد استفاده در این تحقیق

درصد خلوص (٪)	رنگ	شکل ذرات	سطح ویژه (m^2/g)	قطر ذرات (nm)	پارامترها
> ۹۹	سفید	کروی	۹۰	۲۰	مقادیر

که حداقل و حداکثر این پارامتر به ترتیب برای باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923 و پسودوموناس آیروژینوزا ATCC 27853وجود داشته است.

نتایج بررسی ضد میکروبی سوسپانسیون نانوذرات اکسید روی با روش دیسک دیفیوژن نشان داد که باکتری استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923 دارای بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد است و باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس PTCC 1114 دارای کمترین میانگین قطر هاله عدم رشد بوده است. سوسپانسیون نانوذرات در غلظت ۱۰۰۰۰ µg/mL بر استافیلوکوکوس اورئوس با ایجاد هاله عدم رشد۰/۷۷mm ± ۲۱/۲۵، بیشترین اثر مهارکنندگی رشد و کمترین تاثیر مربوط به غلظت ۱۵۶/۲۵ µg/mL بر پسودوموناس آیروژینوزا با ایجاد هاله عدم رشد رشد ۱/۰۴ mm ± ۱۳/۰۱ بوده است. برای پسودوموناس آیروژینوزا قطر هاله عدم رشد در دو غلظت ۱۰۰۰۰ µg و ۵۰۰۰ بیشتر از مقدار مربوط به شاهد مثبت (آنتی بیوتیک جنتامایسین) هم بوده است. مطالعات زمان مرگ باکتری‌ها در تماس با سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی در دو غلظت ۱ و۲ برابر مقدار MIC هر باکتری بررسی شد. بر اساس نتایج باکتری‌های در تماس با غلظت MIC دچار مرگ کامل جمعیت نشده‌اند اگرچه جمعیت آنها به میزان تقریبی ۴ تا ۷ واحد لگاریتمی کاهش نشان داده است. در غلظت ۲xMIC جمعیت همه باکتری‌ها در مدت زمان min ۳۶۰ صفر شده است. بر اساس شکل ۳-الف حداقل زمان باکتری‌کشی برای اشرشیاکلی ۳۶۰، برای استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۲۴۰، برای استافیلوکوک اورئوس ۱۸۰ و برای پسودوموناس آیروژینوزا min ۱۵۰ بوده است.

بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل آماری، اختلاف معنی‌داری بین سویه‌های باکتریایی مورد بررسی از نظر قطر هاله عدم رشد مشاهده نشده است (P =۰/۲۹۱)؛ تعداد باکتری‌ها یا به عبارتی مرگ باکتری‌ها با زمان در مواجهه، سویه‌های باکتری، اثر هم‌زمان باکتری و زمان مواجهه و غلظت نانوذرات در سوسپانسیون دارای اختلاف معنی‌داری بوده است (P <۰/۰۰۱).

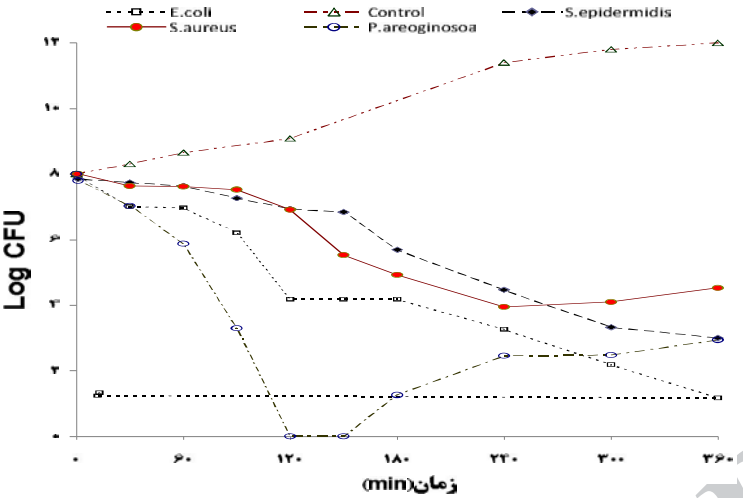
بحث

نتایج مربوط به XRD نانو ذره اکسیدروی تاییدکننده خلوص آنست و به جز اکسیژن، ناخالصی دیگری مشاهده نشده است. هم‌چنین تصاویر مربوط به نتایج XRD نانو ذرات دارای پیک‌های تیز هستند که بیانگر این است که نانو ذرات به خوبی دارای ساختار کریستالی هستند(۱۴و ۱۸). عکس‌های TEM بیانگر شکل نانو ذرات است. بر اساس تصاویر مربوطه می‌توان نتیجه گرفت که نانو ذرات اکسید روی نسبتا دارای

جدول ۲: نتایج مربوط به MIC و MBC (µL/mg) سوسپانسیون نانو ذره اکسید روی

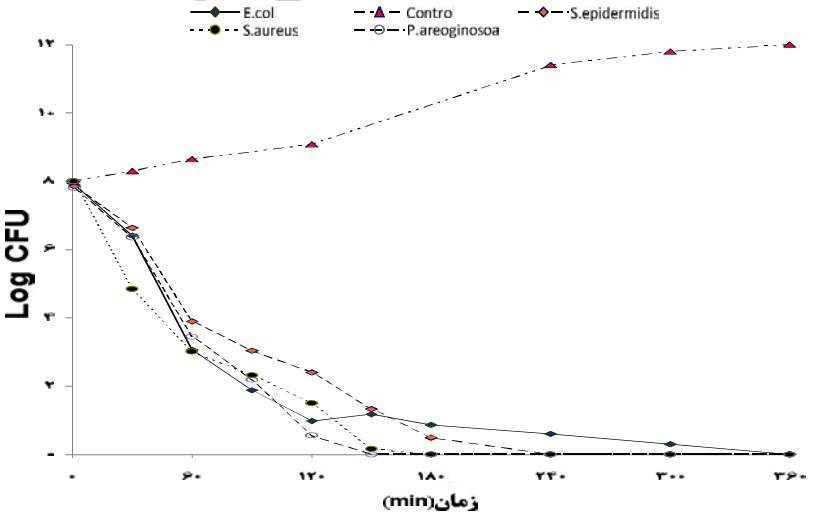
باکتری‌ها	MIC	MBC
اشرشیا کلی ATCC 25922	۱۲۵۰	۱۲۵۰
استافیلوکوک اپیدرمیدیس PTCC 1114	۶۲۵	۲۵۰۰
استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923	۱۲۵۰	۵۰۰۰
پسودوموناس آیروژینوزا ATCC 27853	۱۵۶/۲۵	۳۱۲/۵

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳-الف: منحنی زمان مرگ برای باکتری‌ها در زمان‌های مختلف در تماس با غلظت 1 x MIC سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی. برای کنترل از محیط کشت بدون نانوذره استفاده شد.

شکل کروی منظم هستند. همچنین عکس‌های TEM بیان‌گر این موضوع است که نانوذرات مورد استفاده در این تحقیق در محدوده نانو قرار دارند. کاهش اندازه ذرات باعث تغییر ویژگی‌های ساختاری و فیزیکوشیمیایی آنها و در نتیجه سبب دسترسی آنها برای موجودات زنده و افزایش خواص سمی آنها می‌شود(۱۹). کاهش اندازه و بنابراین افزایش سطح ویژه/ مخصوص همراه با افزایش تعداد گروه‌های راکتیو بر روی سطح ذرات به عنوان مهم‌ترین فاکتورها برای افزایش سمیت نانو ذرات ذکر شده است. شاید افزایش گروه‌های فعال (راکتیو) سطحی به عنوان مکان‌های فعال برای شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن راکتیو (ROS) شامل سوپراکسید، هیدروژن پروکسید و رادیکال هیدروکسیل منجر به استرس اکسیداتیو شود. در عکس SEM نانو ذرات یک حالت متراکم شدگی موجود است که ناشی از تجمع کریستال‌های بسیار کوچک نانوذرات است و به دلیل اندازه بسیار کوچک به طور منفرد قابل مشاهده نیست؛ هم‌چنین میکروگراف SEM نشان می‌دهد ذرات با توجه به ساختار، مرفولوژی و پراکندگی‌شان در اثر به هم نزدیک شدن ذرات شاید که در سوسپانسیون نانو ذرات در آزمایشات، حالت مجتمع یابند(۱۴). با توجه به جدول ۲ با افزایش غلظت نانو ذرات، خاصیت ممانعت‌کنندگی نانو ذره



شکل ۳-ب: منحنی زمان مرگ برای باکتری‌ها در زمان‌های مختلف در تماس با غلظت MIC×1 سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی

Archive of SID
www.SID.ir

علیه باکتری‌ها افزایش یافته است. با افزایش غلظت نانو ذرات در تعیین MIC در سویه‌های موجود هیچ‌گونه رشد باکتریایی مشاهده نشد به عبارتی اثر باکتری‌کشی نانو ذرات به غلظت اولیه نانو ذرات و غلظت اولیه باکتریایی وابسته است که این موضوع توسط دیگر محققین هم ذکر شده است(۱۹). بر اساس نتایج جدول ۲ اثر ممانعت کنندگی رشد و کشندگی سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی علیه اشرشیاکلی منطبق بر هم است. این نتیجه بیان‌گر نزدیک به هم بودن مقادیر MIC و MBC نانو ذرات در مقابل اشرشیاکلی به هم نزدیک است. Ruparelia و همکاران در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که احتمالا اثر تجمع‌پذیری نانوذرات در سوسپانسیون به علت وجود نمک‌ها در محیط کشت مغذی افزایش یابد(۱۴)؛ بنابراین با توجه به نقش اندازه نانو ذرات بر خاصیت میکروب‌کشی آنها ممکن است که خاصیت تجمع پذیری نانو ذرات کارایی باکتری‌کشی آنها و در نتیجه مقادیر MIC/MBC را تحت تاثیر قرار دهد که این مورد توسط Gan و همکاران نیز ذکر شده است(۲۰). در مطالعه حاضر اثر نانو ذرات اکسید روی بر روی سویه‌های مورد بررسی به ترتیب پسودوموناس آیروژینوزا ATCC 27853 > اشرشیاکلی ATCC 25922> استافیلوکوک اپیدرمیدیس PTCC 1114 > استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923 بوده است. به عبارت دیگر اثر نانوذرت اکسید روی بر باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است. اما می‌توان گفت که کارایی باکتری‌کشی نانوذرات منحصرا به دیواره سلولی (گرم مثبت یا گرم منفی) وابسته نیست(۱۴).

هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت نانوذره در سوسپانسیون، برای همه باکتری‌ها قطر هاله عدم رشد ایجاد شده افزایش می‌یابد. این نتیجه می‌تواند به سمیت بیشتر در غلظت‌های بالاتر نانو ذرات مرتبط باشد. البته این موضوع نمی‌تواند بیان‌گر رابطه خطی غلظت ـ قابلیت ضد میکروبی نانو ذرات باشد، زیرا در غلظت‌های بالاتر احتمال ایجاد مقاومت سازگاری وجود دارد. با توجه به این که بررسی زمان مرگ نسبت به تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی از حساسیت بالاتری برخوردار است(۱۶و۲۱) بنابراین به عنوان عامل تشخیصی بهتر برای بررسی پتانسیل باکتری‌کشی عوامل ضد میکروبی شناخته شده است. در این مطالعه بررسی قابلیت کشندگی نانوذرات اکسید روی با این روش هم بررسی گردید. بر اساس نتایج به دست آمده در شکل ۳-الف در غلظت MIC×۱ کاهش جمعیت باکتری‌های پسودوموناس آیروژینوزا نسبت به دیگر باکتری‌ها بسیار سریعتر بوده است و روند کاهش جمعیت سه باکتری دیگر تقریبا مشابه با هم بوده است. با افزایش غلظت سوسپانسیون نانوذرات به MIC×۲ سرعت کاهش جمعیت باکتری‌ها بسیار افزایش یافته است (شکل ۳- ب) **برای کنترل از محیط کشت بدون نانوذره استفاده شد.** البته کاهش جمعیت باکتری‌های اشرشیاکلی نسبت به بقیه دارای روند کندتری بوده است. با افزایش زمان تماس باکتری‌ها با سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی از ۲ به h ۶ برای غلظت MIC×۲ ، کاهش جمعیت باکتریایی برای اشرشیاکلی از ۸۷٪، برای استافیلوکوک اپیدرمیدیس از ۷۰٪، برای استافیلوکوک اورئوس از ۸۱/۱ ٪ و برای پسودوموناس آیروژینوزا از ۶۶/۷ ٪ به ۱۰۰٪ افزایش یافته است. هم‌چنین نتایج تجزیه و تحلیل آماری ارتباط معنی‌داری بین کاهش باکتری‌ها و زمان تماس نشان داده است (P<۰/۰۰۱). با توجه به این که در محیط‌های مایع و استفاده از سوسپانسیون نانوذرات احتمال ته‌نشین شدن نانوذرات و در نتیجه کاهش احتمال برخورد باکتری- نانوذره وجود دارد بنابراین افزایش زمان تماس و غلظت نانو ذره می‌تواند اثر این عامل منفی را کم رنگ یا خنثی نماید(۲۲). هم‌چنین با افزایش زمان تماس، میزان یون آزاد شده در محیط کشت در اثر انحلال جزیی نانو ذرات افزایش می‌یابد که خود بر کاهش جمعیت باکتری‌ها اثر مستقیم دارد. Tiwari و همکاران(۲۲) نیز در مطالعه خود به نتایج مشابهی با این مطالعه رسیده بودند و افزایش زمان تماس و غلظت نانوذرات را به عنوان عوامل تاثیرگذر بر مرگ باکتری‌ها ذکر کرده‌اند.

محققین بار سطحی غالب در نانو ذرات را تابعی از pH محیط ذکر کرده‌اند به طوری که اگر pH محیط پایین تر از pH_{ZPC} نانوذره باشد، سطح نانو ذره دارای بار الکتریکی مثبت و اگر pH محیط بالاتر از آن باشد سطح نانو ذره دارای بار الکتریکی منفی خواهد بود. Dimitri (۲۳) در مطالعه خود میزان pH_{ZPC} را برای بسیاری از ترکیبات چون نانو اکسید روی را به صورت تئوری محاسبه کرده است. بر اساس نتایج این محقق pH_{ZPC} نانو اکسید روی ۱۰ بوده است که مقدار آن از مقدار به دست

Archive of SID
www.SID.ir

آمده در این مطالعه اندکی بیشتر است. تفاوت pH_{ZPC} شاید به درصد خلوص نانوذرات، میزان اکسیژن موجود در ترکیب، ثابت دی الکتریک، وجود گونه‌های کربوکسیل موجود در محیط و روش محاسبه بستگی دارد و تفاوت در این متغیرها می‌تواند بر pH_{ZPC} تاثیر بگذارد. براساس مطالعات انجام شده جهت تعیین pH_{ZPC} باکتری‌ها (۲۴) نتایج حاکی از این موضوع است که مقدار pH_{ZPC} برای میکروارگانیسم‌ها به طور کلی در محدوده ۴ – ۲ قرار دارد. باکتری‌های گرم منفی دارای یک لایه لیپوساکارید در قسمت خارجی دیواره سلولی خود هستند و در قسمت زیرین آن یک لایه نازک (۸–۷ nm) پپتیدوگلیکان وجود دارد. لیپوپلی‌ساکاریدها به اندازه پپتیدوگلیکان‌ها سفت و سخت نیستند که دلیل آن ارتباط هم ظرفیت بین لیپید و پلی‌ساکارید است. لیپوپلی‌ساکاریدها دارای بار منفی هستند و جذب نانو ذرات دارای بار مثبت می‌شوند. با توجه به توضیحات ارایه شده می‌توان نتیجه گرفت که بار سطحی نانوذرات و باکتری‌ها هر دو منفی است و بر اساس پدیده الکترواستاتیک میزان جذب نانو ذرات بر سطح باکتری‌ها به دلیل نیروی دافعه کاهش می‌یابد(۲۴). بنابراین برای غلبه بر این نیروی ممانعت‌کننده بایستی غلظت‌های بیشتری از نانو ذره در محیط موجود باشد که شاید یکی از دلایل حساسیت پایین باکتری‌ها در غلظت‌های پایین به دلیل وجود همین نیروی دافعه الکترواستاتیک باشد. در تحقیقات مشابه گزارش شده است که بار مثبت موجود برروی یون‌های نقره فاکتور مهمی برای حالت آنتی باکتریال آن است. زیرا بین غشای سلولی که دارای بار منفی است و نانو ذرات دارای بار مثبت یک جاذبه الکترواستاتیکی برقرار می‌شود. پیشنهاد شده است که شاید نیروی الکترواستاتیک یک علت اضافی برای بر هم‌کنش نانوذرات و باکتری‌ها باشد. محققین بیان کرده‌اند که شاید نانوذرات به طور اساسی به فضای خارجی غشای سلولی باند می‌شوند که احتمالا در غلظت‌های بالا به درون سلول نفوذ می‌یابند(۲۲).

نتیجه‌گیری

براساس یافته‌های این مطالعه می‌توان گفت که سوسپانسیون نانوذرات اکسید روی در مقابل باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی در غلظت‌های مختلف دارای اثر باکتری‌کشی یا ممانعت‌کنندگی رشد است و در غلظت‌های بیشتر از غلظت MIC دارای اثر باکتری‌کشی سریعی است. به طور کلی این مطالعه نشان داد که نانوذره اکسیدروی اثر ضد باکتری داشته و می‌تواند به عنوان گزینه مناسبی برای حذف باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی در حیطه پزشکی استفاده گردد. البته این امر نیاز به انجام مطالعات بیشتری در این زمینه دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد بهداشت محیط در سال ۱۳۸۹ با کد ۸۹۱۱۱۹۱۷۶۸۱۵ است که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان اجرا شده است. نویسندگان مقاله بر خور لازم می‌دانند از جناب آقای مقدم کارشناس آزمایشگاه میکروب‌شناسی و همکاری‌شان تشکر و قدردانی نمایند.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1. Hoseinzadeh E, Samargandi M.R, Alikhani M.Y. Evaluation of synergetic effect of commercial zinc oxide and copper oxide nanoparticles against gram posetive and gram negative bacteria by fraction inhibitory concentration index. Journal of Zanjan University of Medical Sciences. 2012; 20(82): in press (in Persian).
2. Hoseinzadeh E, Samargandi M.R, Alikhani M.Y, Roshanaei Gh, Asgari G. Antimicrobial efficacy of zinc oxide nanoparticles against gram negative and positive bacteria. Iranian Journal of Health and Environment. 2012;14(5):13-9 (in Persian).
3. Hadi M, Shokoohi R, Namvar AME, Karimi M, Aminabad MS. Antibiotic resistance of isolated bacteria from urban and hospital wastewaters in Hamadan City. Iranian Journal of Health and Environment. 2011;4(1):105-14 (in Persian).
4. Hoseinzadeh E, Samargandi MR, Alikhani MY, Godini H, Shams Khorramabadi Gh. Sensitivity coefficient and death kinetics of Escherichia coli and Staphylococcus aureus to zinc oxide and copper oxide nanoparticles. Journal of Isfahan Medical School. 2012;30(200):1-11 (in Persian).
5. Fang M, Chen J-H, Xu X-L, Yang P-H, Hildebrand HF. Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. International Journal of Antimicrobial Agents. 2006;27(6):513-7.
6. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science. 2004;275(1):177-82.
7. Sinha R, Karan R, Sinha A, Khare SK. Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells. Bioresource Technology. 2011;102(2):1516-20.
8. Xie Y, He Y, Irwin PL, Jin T, Shi X. Antibacterial activity and mechanism of zinc oxide nanoparticles on Campylobacter jejuni. Applied and Environmental Microbiology. 2011;77(7):2325-31.
9. Kalantar E, Maleki A, Khosravi M, Mahmodi S. Evaluation of ultrasoundwaves 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 (in Persian).
10. Tawale JS, Dey KK, Pasricha R, Sood KN, Srivastava AK. Synthesis and characterization of ZnO tetrapods for optical and antibacterial applications. Thin Solid Films. 2011;519(3):1244-7.
11. Zhang L, Ding Y, Povey M, York D. ZnO nanofluids as potential antibacterial agent. Progress in Natural Science. 2008;18(8):939-44.
12. Atmaca S, Gul K, Clcek R. The effect of zinc on microbial growth. Journal of Medical Sciences. 1998;8:595-7.
13. Dastjerdi R, Montazer M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010;79(1):5-18.
14. Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomaterialia. 2008;4(3):707-16.
15. Qi L, Xu Z, Jiang X, Hu C, Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. Carbohydrate Research. 2004;339(16):2693-700.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline. Wayne, PA: NCCLS; 1999. Report No.: Document M26-A.
17. Samarghandy MR, Hoseinzadeh E, Taghavi M, Hoseinzadeh S. Biosorption of Reactive Black 5 from aqueous solution using acid-treated biomass from potato peel waste. Bioresources. 2011;6(4):4840-55.
18. Akhavan O, Ghaderi E. Cu and CuO nanoparticles immobilized by silica thin films as antibacterial materials and photocatalysts. Surface and Coatings Technology. 2010;205(1):219-23.
19. Blinova I, Ivask A, Heinlaan M, Mortimer M, Kahru A. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. Environmental Pollution. 2010;158(1):41-7.

Archive of SID

www.SID.ir

20.Gan X, Liu T, Zhong J, Liu X, Li G. Effect of silver nanoparticles on the electron transfer reactivity and the catalytic activity of myoglobin. ChemBioChem. 2004;5(12):1686-91.
21.Food and Drug Administration. Guidance for industry microbiological data for systemic antibacterial drug products - Development, Analysis, and Presentation. New Hampshire: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2009.
22.Tiwari DK, Behari J, Sen P. Time and dose-dependent antimicrobial potential of Ag nanoparticles synthesized by top-down approach. Current Sciences. 2008;95(5):647-56.
23.Dimitri AS. Prediction of surface charge on oxides in salt solutions: Revisions for 1:1 (M+L-) electrolytes. Geochimica et Cosmochimica Acta. 2005;69(2):225-57.
24.Lytle DA, Rice EW, Johnson CH, Fox KR. Electrophoretic mobilities of Escherichia coli O157:H7 and Wild-type Escherichia coli strains. Applied and Environmental Microbiology. 1999; 65(7):3222–5.

Archive of SID

www.SID.ir

Antimicrobial Efficacy of Zinc Oxide Nanoparticles Suspension Against Gram Negative and Gram Positive Bacteria

Edris Hoseinzadeh[1], *Mohammad Reza Samargandi[2], Mohammad Yosef Alikhani[3], Ghodratollah Roshanaei[4], Ghorban Asgari[2]

[1]Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran
[2]Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
[3]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
[4]Department of Biostatistics, School of Public Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

Received; 09 May 2012 Accepted; 05 August 2012

ABSTRACT

Background and Objectives: Along with the rapid development of human life, controlling harmful effects of microorganisms would be unavoidable. The objective of this study was to evaluate antibacterial efficacy of zinc oxide nanoparticles on different microbial strains.

Material and Methods: This experimental study was done using gram negative and gram positive bacteria in nutrient media. Nanoparticle characterization was determined using X-ray diffraction (XRD), scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM). Bacterial sensitivity to nanoparticles was tested using a disk diffusion test and minimum inhibitory concentration (MIC). Time–kill studies and other tests were carried out using 108 CFU/mL of bacteria at baseline. A point of zero charge, pHzpc, of nanoparticle was investigated using the batch equilibration method. Obtained data were managed by SPSS Ver.16 and were analyzed through the Pearson, analysis of variance (ANOVA) and Student's independent t-tests. 0.05 was selected as significant level for all tests.

Results: Characterization results from XRD, SEM, and TEM showed that particles are in nano range and they do not contain any discernible crystalline impurity. The average ZnO nanoparticles diameter was 20 nm. The pHZPC for ZnO was found to be 7.51. The P. aeruginosa strain exhibited larger diameter inhibition zone (DIZ) to ZnO nanoparticle compared with other strains. Population of P.aeroginosa for 2 x MIC concentration was reduced to zero in the presence of nano ZnO within 150 min. The bacterial CFU had significant difference with contact time, nanoparticles loading, and bacterial strain ($P<0.001$).

Conclusion: This study demonstrated that antibacterial activity of ZnO can be a candidates for the elimination of gram negative and gram positive bacteria, particularly in nasocomial infection agent control.

Keyword: Gram negative bacteria, Gram positive bacteria, Antimicrobial effect, ZnO

***Corresponding Author**: *mrsamarghani@umsha.ac.ir*
***Tel:** +98 811 8380025 **Fax:** +98 811 8380509*

Archive of SID

www.SID.ir