

بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی مس و آلومینیوم - اکسید روی و اثرات سینرژیستی با بیوسایدهای مختلف علیه باسیلوس سرئوس

*زهرا دیدار: استادیار، گروه صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران (*نویسنده مسئول). z_didar57@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۹

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: نانوذرات اکسیدهای فلزی اثرات ضد میکروبی در برابر دامنه وسیعی از میکروارگانیسم‌ها دارند. هدف از این تحقیق بررسی اثر نانوذرات ترکیبی مس و آلومینیوم - اکسید روی و اثرات سینرژیستی آنها با بیوسایدهای متداول علیه باسیلوس سرئوس است.

روش کار: در این تحقیق سنتز نانوذرات ترکیبی مس - اکسید روی، آلومینیوم - اکسید روی به روش رسوب همزمان و بررسی ویژگی‌های نانوذرات با استفاده از XRD، FTIR و TEM صورت گرفت. اثرات ضد میکروبی نانوذرات توسط روش قطر هاله عدم رشد و اثرات سینرژیستی نانوذرات با سایر بیوسایدهای متداول توسط اندیس کسر غلظت مهاری تعیین شد.

یافته‌ها: قطر هاله عدم رشد در مورد نانوذرات اکسید روی، نانوذرات ترکیبی مس - اکسید روی و آلومینیوم - اکسید روی به ترتیب برابر با ۱۶/۵، ۲۶ و ۲۰ میلی متر بود. در بررسی اثرات سینرژیست نانوذرات ترکیبی با دو ماده ضد میکروبی متداول شامل پراکسید هیدروژن و هیپوکلریت سدیم مشخص گردید که هر دو این نانوذرات با این ترکیبات ضد میکروبی اثر هم افزایی و سینرژیست دارند.

نتیجه‌گیری: می‌توان نتیجه‌گیری کرد افزودن عناصر مس و آلومینیوم در ساختار اکسید روی سبب بهبود اثرات ضد میکروبی آن می‌گردد. همچنین ترکیبات ضد میکروبی متداول (پراکسید هیدروژن و هیپوکلریت سدیم) با نانوذرات ترکیبی مس و آلومینیوم - اکسید روی اثرات سینرژیستی دارند.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات ترکیبی، اکسید روی، سینرژیست، باسیلوس سرئوس

مقدمه

اهمیت باسیلوس سرئوس گزارشات مختلف در خصوص افزایش مقاومت این باکتری به آنتی بیوتیک‌های مختلف است (۲).

نانوذرات اکسیدهای فلزی در برابر دامنه وسیعی از میکروارگانیسم‌ها؛ اثرات ضد میکروبی داشته‌اند که این ویژگی باعث تولید ترکیبات ضد میکروبی نوین در صنعت مواد غذایی و سایر صنایع شده است. در دسترس بودن این نانوذرات و ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و کارکردهای زیاد آنها این ترکیبات را نمونه‌ای مناسب و جایگزین برای ترکیبات ضد میکروبی متداول نموده است. نانوذرات اکسیدهای فلزی خصوصیات ضد میکروبی بهتری نسبت به انواع متداول ترکیبات ضد میکروبی نشان می‌دهند که دلیل آن نسبت زیاد سطح به حجم این ترکیبات است (۳). دسته وسیعی از نانوذرات اکسیدهای فلزی از نظر خصوصیات ضد میکروبی مورد بررسی قرار

بیماری‌های عفونی یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در جهان است و افزایش مقاومت میکروب‌ها نیز یکی از معضلات مهم در حوزه بهداشت و سلامت است. ظهور گونه‌های مقاوم به ترکیبات ضد میکروبی و آنتی بیوتیک‌ها باعث شده محققان بر روی استفاده از ترکیبات ضد میکروبی نوین متمرکز شوند. باسیلوس سرئوس یک باکتری گرم مثبت، هوازی اختیاری است که در محیط به صورت گسترده‌ای یافت می‌شود و قدرت جوانه زنی سبب شیوع این نوع باکتری شده است. شیوع این باکتری بیشتر در شیر خام، گوشت و سبزیجات عامل بسیاری از بیماری‌های مرتبط با مواد غذایی معرفی شده است (۱). باسیلوس سرئوس یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی است که فرآیند پاستوریزاسیون را تحمل کرده و می‌تواند در یخچال نیز رشد کند. از دیگر موارد

ترکیبی، از دو بیوساید متداول شامل پراکسید هیدروژن و هیپوکلریت سدیم استفاده شده است.

روش کار

کلیه مواد شیمیایی مصرف مربوط به شرکت Merck آلمان است. نانوذره اکسید روی با اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شد.

به منظور تهیه نانوذرات ترکیبی مس-اکسید روی و آلومینیوم-اکسید روی از روش رسوب همزمان استفاده شد. در این روش برای تهیه نانوذرات مس-اکسید روی از سولفات مس و سولفات روی و به منظور تهیه نانوذرات آلومینیوم-اکسید روی از سولفات آلومینیوم و سولفات روی استفاده شد. پس از تهیه محلولهای سولفات مورد نظر، محلولهای سولفات تهیه شده با یکدیگر مخلوط شده و در دستگاه اولتراسونیک مارک 4D Eurosonic با فرکانس ۵۷kHz برای مدت ۲ ساعت در دمای ۵۰°C قرار داده شد. سپس در دمای ۸۰ همراه با همزدن قرار گرفت. محلول هیدروکسید سود با غلظت ۲۵٪ قطره قطره به آن افزوده شد تا زمانی که pH محلول به ۱۲ برسد (با استفاده از pH متر Jenway 3520). در این شرایط، همزدن به مدت ۳۰ دقیقه ادامه پیدا می کند. محلول حاصله به مدت ۱۸ ساعت در دمای محیط قرار داده می شود. سپس عمل سانتریفوژ به منظور جدا کردن رسوبات انجام گردید. خالص سازی توسط شستشو با آب مقطر و اتانول انجام شد. رسوبات حاصله در دمای ۲۰۰°C به مدت ۱ ساعت داخل آن خلأ خشک شد. بدین ترتیب نانوذرات ترکیبی مس-اکسید روی و آلومینیوم-اکسید روی حاصل گردید (۱۸).

بررسی خصوصیات ساختاری نانوذرات توسط طیف مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) توسط دستگاه Perkin-Elmer مدل Spectroma2 و با استفاده از قرص پتاسیم بروماید خشک در دامنه فرکانس $4000-4500 \text{ cm}^{-1}$ ثبت شد. پراش پرتو X با استفاده از دستگاه Phillips PW1820 از ۲° تا ۸۰° آزمایش شد.

شکل گیری و اندازه ذرات نانوذرات تولیدی توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری HITACHI

گرفته اند همچون نانوذرات آلومینیوم در برابر اثرشیاکلی (۴) نانوذرات اکسید قلع در برابر باسیلوس سوبتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اثرشیاکلی (۵) نانوذرات بیسموت در برابر سودوموناس آئروژنوزا، آسینتوپاکتر بائومانی و اثرشیاکلی (۶) نانوذرات اکسید کلسیم در برابر اثرشیاکلی (۷). در میان نانوذرات اکسیدهای فلزی، نانوذرات اکسید روی اثرات ضد میکروبی وسیعی را نشان داده است بطوری که در تحقیقات مختلف اثرات ضد میکروبی آن ثابت شده است (۸).

به منظور بهبود خصوصیات فیزیکی نانوذرات اکسیدهای فلزی، سایر عناصر با آنها ترکیب می شود که این عمل با ترکیب یک عنصر با ظرفیت بالاتر نسبت به اکسید اولیه فلزی انجام می شود. با عمل ترکیب، خصوصیات ساختاری، الکتریکی و نوری اکسیدهای فلزی دستخوش تغییر می شود (۹). عمل آمیختن سایر عناصر در ساختار اکسید روی به منظور افزایش کارایی آن در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است از جمله آمیختن عنصر آهن (۹)، آلومینیوم (۱۰)، نقره (۱۱)، مس (۱۲). بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی مختلف در برابر باکتریهای مختلف توسط برخی محققین صورت گرفته است. بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی منگنز کلسیم با اکسید روی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس (۱۳)؛ نانوذرات ترکیبی نقره و اکسید تیتانیوم بر علیه اثرشیاکلی (۱۴)؛ نانوذرات ترکیبی روی و اکسید مس در برابر اثرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس (۱۵) از جمله تحقیقات انجام شده در این زمینه است. مطالعاتی نیز در خصوص بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات مختلف مانند نقره (۱۶) و اکسید روی (۱۷) را بر روی باسیلوس سرئوس صورت گرفته است اما در خصوص اثرات ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی بر روی باسیلوس سرئوس مطالعه انجام نشده است. در این تحقیق اثرات ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی مس و آلومینیوم با اکسید روی بر روی باسیلوس سرئوس مورد مطالعه قرار گرفته است. به منظور بررسی اثرات سینرژیستی نانوذرات

آنها ریخته شد. بدین ترتیب که به لوله شماره ۱ حداقل غلظت نانوذره و به لوله شماره ۷ حداکثر غلظت نانوذرات یا بیوساید را وارد کرده و لوله شماره ۸ به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد بدین معنی که در این لوله فقط ۱ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی و ۱ میلی لیتر محیط براث استریل قرار داشت. در این آزمایش از لوله کنترل منفی نیز استفاده شد. بدین ترتیب که از هر یک از ترکیبات نانوذرات یا بیوسایدها مقدار ۱ میلی لیتر در یک لوله آزمایش ریخته و به آن ۱ سی سی محیط کشت براث استریل اضافه گردید. پس از اضافه کردن محلولهای نانوذرات و بیوسایدها به لوله‌های هر سری، یک میلی لیتر از سوسپانسیون سوش میکروبی *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1665) که دارای کدورت معین است، به لوله های ۱ تا ۸ اضافه شد. به این ترتیب محلولهای نانوذرات و ترکیبات بیوساید با هم حجم خود، از سوسپانسیون باکتریایی رقیق شد و غلظت مورد نظر به دست آمد. پس از انجام مراحل فوق، درب لوله ها بسته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرمخانه گذاری گردید. دانسیته نوری برای تمام نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قبل و بعد از انکوباسیون سنجیده شد. افزایش میزان دانسیته نوری نشان دهنده رشد باکتری بود درحالی که عدم رشد باکتری در هر یک از نمونه‌ها شامل نانوذرات اکسید روی به تنهایی یا ترکیب با هیپوکلریت سدیم یا پراکسید هیدروژن به عنوان حداقل غلظت مهاری هر ترکیب در نظر گرفته شد. اندیس کسر مهاری برای هر یک از ترکیبات بدین صورت تعیین شد:

$$\text{FIC}(A) = \frac{\text{حداقل غلظت مهاری ماده } A \text{ در حالت ترکیبی}}{\text{حداقل غلظت مهاری ماده } A \text{ به تنهایی}}$$

$$\text{FIC}(B) = \frac{\text{حداقل غلظت مهاری ماده } B \text{ در حالت ترکیبی}}{\text{حداقل غلظت مهاری ماده } B \text{ به تنهایی}}$$

$$\text{FIC} = \text{FIC}(A) + \text{FIC}(B)$$

اثر ترکیبی سپس بدین صورت تفسیر می گردد: اندیس کسر غلظت مهاری کمتر از ۰/۵ نشان دهنده اثر سینرژیست؛ ۰/۷۵ - ۰/۵ نشان دهنده اثر سینرژیست جزئی؛ ۱ - ۰/۷۵ نشان دهنده اثر

مدل H-7500 با قراردادن یک قطره از نانوذرات حل شده در متانول بر روی توری مخصوص با پوشش کربنه و خشک کردن با هوا و سپس گرفتن تصاویر میکروسکوپی با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی در ۱۰۰kv انجام شد.

جهت آماده سازی مایه تلقیح، آمپول لیوفیلیزه از باکتری *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1665) خریداری شده از مرکز پژوهشهای علمی و صنعتی ایران در شرایط استریل، شکسته شده و به محیط BHI منتقل گردید و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد، گرمخانه گذاری گردید (۱۹). سلولهای میکروبی توسط سانتریفیوژ شیکردار مدل ALC4232 با دور ۴۰۰rpm جدا شدند و کدورتی معادل با نیم مک فارلند (کدورت معادل 1.5×10^8 در هر میلی لیتر) تهیه گردید. سپس با رقیق کردن آن به نسبت ۰/۰۱ کدورت حدود 10^6 باکتری در هر میلی لیتر به دست آمد. با روش انتشار در آگار اثر ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی به تنهایی یا همراه با بیوسایدهای مورد آزمایش (پراکسید هیدروژن، هیپوکلریت سدیم) مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا 10^6 سلول در هر میلی لیتر از *باسیلوس سرئوس* بر روی سطح محیط کشت محیط کشت بلاد آگار به طور جداگانه تلقیح شد. سپس غلظتهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از هر یک از نانوذرات ترکیبی اکسید روی بر روی سطح محیط کشت بلاد آگار تلقیح شده با باکتری *باسیلوس سرئوس* قرار داده شد و سپس پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. هاله عدم رشد برای نشان دادن فعالیت ضد باکتری در نظر گرفته شد (۲۰).

به منظور بررسی این که آیا نانوذرات ترکیبی اکسید روی با سایر ترکیبات ضد میکروبی اثر سینرژیست دارند از آزمایش تعیین اندیس کسر غلظت مهاری استفاده شد. بدین منظور، از روش رقیق سازی براث استفاده شد (۲۱). ابتدا یکسری ۸ تایی لوله حاوی محیط BHI در جالوله ای قرار داده و ۱ میلی لیتر از هر یک از رقت‌های سریال تهیه شده از نانوذرات و ترکیبات بیوساید داخل

جدول ۱- تیمارهای مختلف مورد بررسی و کدهای مربوطه

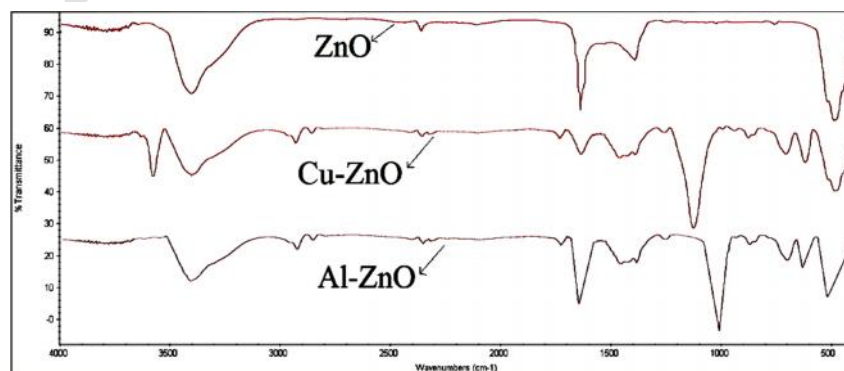
| کد | تیمار | کد | تیمار | کد | تیمار |
|----|-------------------------------|----|--|----|---|
| ۱ | نانوذرات اکسید روی (۵mg/ml) | ۸ | نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی (۵mg/ml) | ۱۵ | نانوذرات ترکیبی آلومینیوم- اکسید روی (۵mg/ml) |
| ۲ | نانوذرات اکسید روی (۱۰mg/ml) | ۹ | نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی (۱۰mg/ml) | ۱۶ | نانوذرات ترکیبی آلومینیوم- اکسید روی (۱۰mg/ml) |
| ۳ | نانوذرات اکسید روی (۲۰mg/ml) | ۱۰ | نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی (۲۰mg/ml) | ۱۷ | نانوذرات ترکیبی آلومینیوم- اکسید روی (۲۰mg/ml) |
| ۴ | نانوذرات اکسید روی (۳۰mg/ml) | ۱۱ | نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی (۳۰mg/ml) | ۱۸ | نانوذرات ترکیبی آلومینیوم- اکسید روی (۳۰mg/ml) |
| ۵ | نانوذرات اکسید روی (۵۰mg/ml) | ۱۲ | نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی (۵۰mg/ml) | ۱۹ | نانوذرات ترکیبی آلومینیوم- اکسید روی (۵۰mg/ml) |
| ۶ | نانوذرات اکسید روی (۱۰۰mg/ml) | ۱۳ | نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی (۱۰۰mg/ml) | ۲۰ | نانوذرات ترکیبی آلومینیوم- اکسید روی (۱۰۰mg/ml) |
| ۷ | نانوذرات اکسید روی (۲۰۰mg/ml) | ۱۴ | نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی (۲۰۰mg/ml) | ۲۱ | نانوذرات ترکیبی آلومینیوم- اکسید روی (۲۰۰mg/ml) |

تفرق اشعه X نیز در مورد نانوذرات مورد بررسی در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی های مورفولوژیک با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری در شکل ۳ نشان داده شده است. به طور کلی نتایج هر سه آزمون بر روی نانوذرات نشان داد که روش رسوب همزمان یک روش مناسب جهت تهیه این نانوذرات ترکیبی است. بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات نشان داد که با ترکیب عناصر مس و آلومینیوم در ساختار اکسید روی، قطر هاله عدم رشد و خاصیت ضد میکروبی نانوذرات به طور معنی داری افزایش یافت (۰/۰۱ p) و اثر ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی به مراتب بیشتر از نانوذرات ترکیبی آلومینیوم- اکسید روی بر علیه باسیلوس سرئوس است (شکل ۴). نتایج اثرات سینرژیست نانوذرات ترکیبی

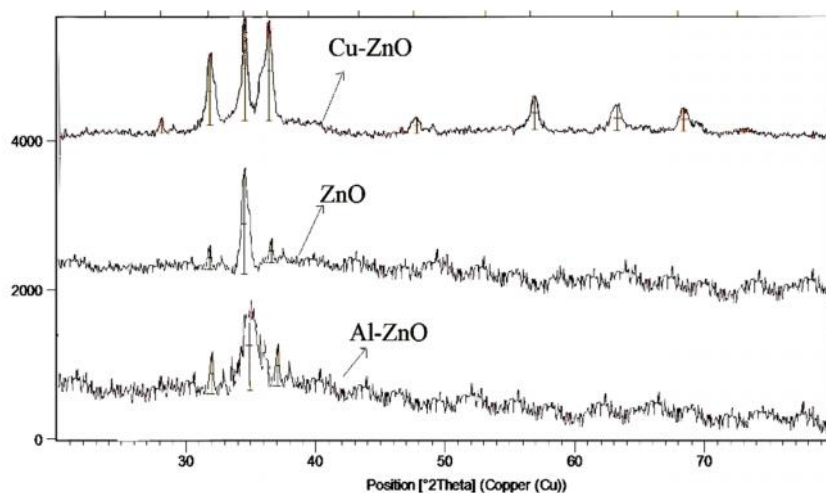
افزایشی؛ ۴-۱ نشان دهنده بی اثر بودن و بیشتر از ۴ نشان دهنده اثر آنتاگونیستی است (۲۲). جهت انجام آزمون های آماری از تجزیه و تحلیل واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار STATISTICA نسخه ۱۳ انجام شد. تمامی آزمایشات، در سه تکرار صورت گرفت. به منظور سهولت بررسی تیمارهای مختلف برای هر تیمار کد مشخصی تعیین شده است که در جدول ۱ نشان داده شده است.

یافته ها

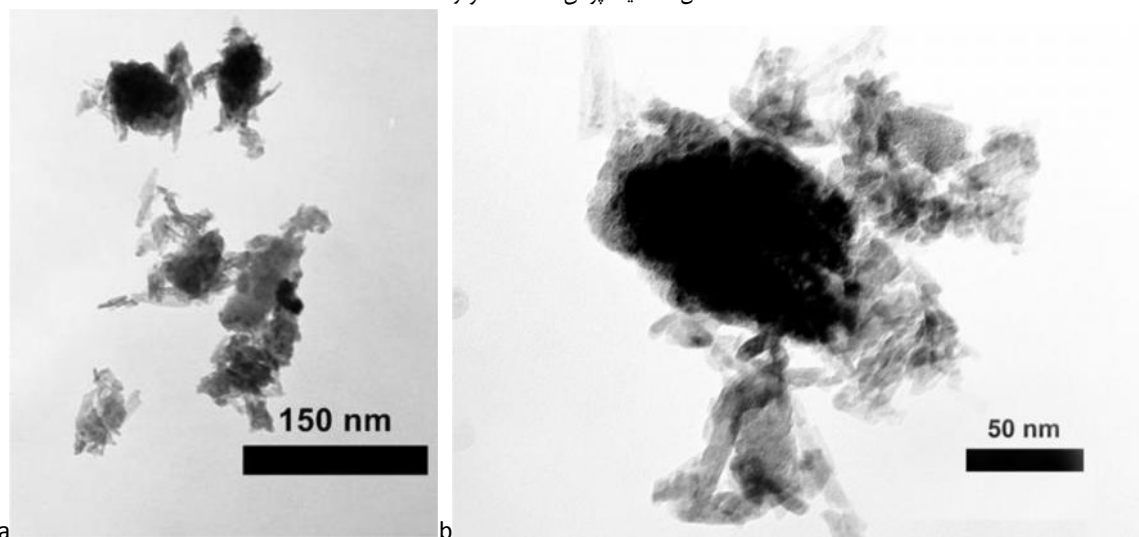
بررسی ساختاری نانوذرات اکسید روی به تنهایی یا به صورت ترکیبی با عناصر مس و آلومینیوم توسط روش طیف مادون قرمز فوریه صورت گرفت و نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. الگوی



شکل ۱- طیف مادون قرمز فوریه نانوذرات



شکل ۲- طیف پراش اشعه X نانوذرات



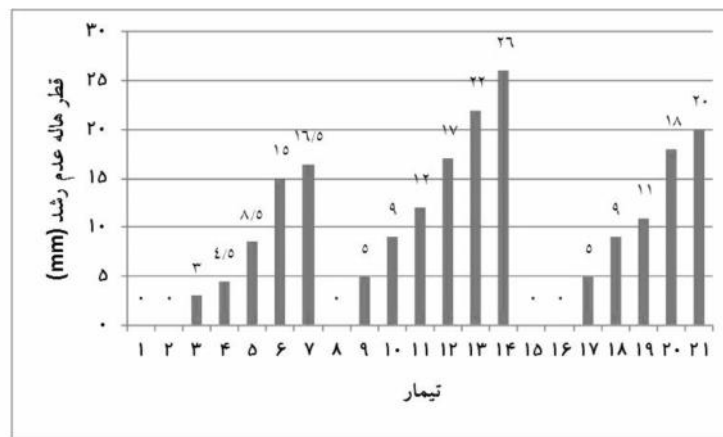
شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری. نانوذرات مس- اکسید روی (a); نانوذرات آلومینیوم- اکسید روی (b).

اکسید روی و هیپوکلریت سدیم نیز در تمام غلظت‌های مورد بررسی مقادیر کسر مهاری بیش از ۰/۵ بود.

بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی طیف مادون قرمز فوریه، پیک در طول موج 555cm^{-1} - 530cm^{-1} مربوط به اکسید روی است (۲۳) که در هر سه طیف قابل مشاهده است. پیک‌های دامنه 2402cm^{-1} ، 1638 ، و 1365 مربوط به وجود مس در نانوذرات مس- اکسید روی است (۲۳). در خصوص نانوذرات آلومینیوم- اکسید روی پیک‌های 2362cm^{-1} ، 1740 و 1364 به پیوند Zn Al- O نسبت داده شده است (۲۴).

مس و آلومینیوم- اکسید روی همراه با پراکسید هیدروژن و هیپوکلریت سدیم در جدول ۲ نشان داده شده است. اندیس کسر مهاری در مورد نانوذرات مس- اکسید روی همراه با پراکسید هیدروژن در غلظت $100 + 0.2$ برابر با 0.41 که نشان دهنده اثر سینرژیست کامل است ولی در سایر غلظت‌ها، اثر سینرژیستی جزئی داشته است. همچنین نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی همراه با هیپوکلریت سدیم در غلظت‌های $50 + 50$ و $100 + 100$ ، به ترتیب برابر با 0.5 و 0.45 تعیین گردید. نانوذرات ترکیبی آلومینیوم- اکسید روی و پراکسید هیدروژن در تمام غلظت‌های مورد بررسی مقادیر اندیس کسر مهاری بیش از 0.5 را نشان داد. در مورد نانوذرات ترکیبی آلومینیوم-



شکل ۴- قطر هاله عدم رشد (mm) باسیلوس سرئوس در غلظت های مختلف نانوذرات مس- اکسید روی و آلومینیوم- اکسید روی

روی ایجاد می کنند که نشان دهنده قدرت بیشتری ضد میکروبی مس- اکسید روی در برابر باسیلوس سرئوس است همچنین غلظت های مختلف بر روی خاصیت ضد میکروبی هر یک از نانوذرات مؤثر است و غلظت های بیشتر، اثر ضد میکروبی بیشتری نشان دادند. بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به مس- اکسید روی با غلظت 50.0 mg/ml است (۲۶ میلی متر). نانوذرات آلومینیوم- اکسید روی، قطر هاله عدم رشد برابر با ۲۰ میلی متر ایجاد می کنند. نانوذرات اکسید روی به تنهایی قطر هاله عدم رشد برابر با $16/5$ میلی متر را دارا می باشد. ترکیب عناصر مس و آلومینیوم در ساختار نانوذرات اکسید روی سبب بهبود خاصیت ضد میکروبی آن در برابر باسیلوس سرئوس می گردد. شارما و همکاران (۲۰۱۵) بهبود خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی همراه با آلومینیوم را در برابر باسیلوس سوبتیلیس، اشرشیاکلی و استافیلوکوس اورئوس را نشان دادند. ترکیب کردن عناصر در ساختار اکسیدهای فلزی سبب بهبود خاصیت ضد میکروبی آنها می گردد که این اثر به دلیل تشکیل اکسیژن فعال ناشی از واکنش ترکیب و شکل گیری حامل های بار ایجاد شده بر روی نانوذرات اکسید روی و واکنش متقابل آنها با اکسیژن و مولکولهای آب بر روی سطح ذرات است (۲۶). آنالیز واریانس تیمارهای مختلف نیز تفاوت معنی داری بین نانوذرات اکسید روی به تنهایی، مس- اکسید روی و آلومینیوم- اکسید روی در سطح معنی داری ۱٪ را تأیید نمود

با بررسی الگوی تفرق اشعه X نانوذرات مورد بررسی (شکل ۲) می توان بیان نمود که پیک های پراش در $36/36^\circ$ ، $34/56^\circ$ ، $31/86^\circ$ متعلق به اکسید روی است (۱۰). بر اساس اطلاعات ICDD متعلق به وجود مس در ساختار نانوذرات اکسید روی است (۲۵) آمیختن عنصر آلومینیوم سبب هیچگونه تغییری در الگوی تفرق اشعه X نانوذرات اکسید روی نمی گردد (۱۰) فقط شکل پیکهای در اثر آمیختن عنصر آلومینیوم به اکسید روی تا حدی تغییر می کند (۲۳).

تصاویر میکروسکوپی ساختار ورتزیت را در نانوذرات نشان می دهد که با نتایج حاصل از پراش اشعه X همخوانی دارد. ترکیب عناصر آلومینیوم و مس نیز در تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مشهود است.

در مجموع نتایج بررسی های ساختاری نانوذرات ترکیبی نشان دهنده مناسب بودن روش رسوب همزمان که یک روش ساده شیمیایی است برای تهیه نانوذرات ترکیبی مورد نظر است.

بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی و آلومینیوم- اکسید روی توسط تعیین قطر هاله عدم رشد نشان دهنده افزایش خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی در صورت ترکیب عناصر مس و آلومینیوم در ساختار آن است (شکل ۴).

همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به نانوذرات آلومینیوم- اکسید

جدول ۲- حداقل غلظت بازدارندگی و کسر غلظت بازدارندگی بر روی باسیلوس سرئوس

| Al-ZnO+ NaOCl | FIC | Al- ZnO+H ₂ O ₂ | FIC | Cu-ZnO+ NaOCl | FIC | Cu-ZnO+ H ₂ O ₂ | FIC | درصد بازدارندگی | (mg/ml)NaOCl | درصد بازدارندگی | (%)H ₂ O ₂ | درصد بازدارندگی | Al- ZnO (mg/ml) | Cu- (mg/ml)ZnO |
|------------------|------|--|------|------------------|------|--|------|-----------------|--------------|-----------------|----------------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|
| ۰/۷۴ | ۰/۷۳ | ۰/۰۱+۰/۰۱ | ۰/۷ | ۰/۲۰+۰/۲۰ | ۰/۶۸ | ۰/۰۱+۰/۲۰ | ۰/۲۹ | ۲۱ | ۲۰ | ۰/۰۱ | ۲۲ | ۲۰ | ۲۰ | ۲۰ |
| ۰/۷۱ | ۰/۷۳ | ۰/۰۲+۰/۰۱ | ۰/۶۲ | ۰/۳۰+۰/۳۰ | ۰/۶۲ | ۰/۰۲+۰/۲۰ | ۰/۶۶ | ۵۹ | ۳۰ | ۰/۰۲ | ۵۵ | ۴۵ | ۱۰۰ | ۲۰ |
| ۰/۶۵ | ۰/۶۳ | ۰/۰۱+۰/۲۰ | ۰/۵ | ۰/۵۰+۰/۵۰ | ۰/۵۲ | ۰/۰۱+۰/۵۰ | ۰/۸۱ | ۷۶ | ۵۰ | ۰/۰۱ | ۶۸ | ۶۹ | ۲۰۰ | ۵۰ |
| ۰/۵۳ | ۰/۵۲ | ۰/۰۲+۰/۳۰ | ۰/۴۵ | ۰/۱۰۰+۰/۱۰۰ | ۰/۴۱ | ۰/۰۲+۰/۱۰۰ | ۰/۹۱ | ۹۱ | ۱۰۰ | ۰/۰۲ | ۸۹ | ۸۵ | ۴۰۰ | ۱۰۰ |
| | | | | | | | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۱۴۰ | ۰/۰۳ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۵۰۰ | ۲۰۰ |

خاصیت ضد میکروبی در برابر باسیلوس سرئوس هستند. خاصیت ضد میکروبی این ترکیبات با افزایش غلظت آنها افزایش می‌یابد و اثر ضد میکروبی اکسید روی دارای مس بیشتر از اکسید روی حاوی آلومینیوم است. استفاده مخلوط نانوذرات ترکیبی مس یا آلومینیوم و اکسید روی با دو ماده بیوساید متداول در صنعت ماده غذایی شامل پراکسید هیدروژن و هیپوکلریت سدیم، سبب افزایش قدرت ضد میکروبی این ترکیبات نانوذره می‌گردد. غلظت‌های بیشتر از ترکیب نانوذرات و هر یک از بیوسایدهای مورد مطالعه سبب اثر سینرژیستی بیشتر آنها می‌گردد. این بررسی نشان می‌دهد که مخلوط پراکسید هیدروژن یا هیپوکلریت سدیم همراه با نانوذرات مس- اکسید روی را می‌توان به عنوان ترکیبات ضد عفونی کننده به کار برد.

منابع

1. Altaf MS, Iqbal A, Ahmad M, Hussain SA, Ahmad R, Willayat MM. Study of enterotoxigenicity of *B.cereus* emetic strain by skin vasopermeability reaction in rabbits and poultry. *Int J Pharma Bio Sci*; 2012. 3(2):166-172.
2. Sood B, Pal Sahota P, Hunjan M. Multidrug Resistant *Bacillus cereus* in Fresh Vegetables: A Serious Burden to Public Health. *Int J Curr Microbiol App Sci*; 2017. 6(4): 649-661.
3. Whitesides GM. Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. *Small*; 2005.1:172-9.
4. Ansari MA, Khan HM, Khan AA, Cameotra SS, Saquib Q, Musarrat J. Interaction of Al₂O₃ nanoparticles with *Escherichia coli* and their cell envelope biomolecules. *J Appl Microbiol*; 2014.116:772-83.
5. Baek YW, An YJ. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and

(داده‌ها نشان داده نشده است).

حداقل بازدارندگی نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی، آلومینیوم- اکسید روی، هیدروژن پراکسید و هیپوکلریت سدیم به تنهایی و به صورت ترکیبی در غلظت‌های مختلف تعیین شد (جدول ۲).

مطابق این جدول، نانوذرات مس- اکسید روی دارای غلظت بازدارندگی کمتری نسبت به آلومینیوم- اکسید روی در برابر باسیلوس سرئوس دارد. مخلوط دو ماده بیوساید با نانوذرات سبب افزایش خاصیت ضد میکروبی آنها می‌شود که چنانچه مجموع کسر غلظت بازدارندگی کمتر از ۰/۵ باشد نشان دهنده اثر سینرژیست و ۰/۷۵-۰/۵ نشان دهنده اثر سینرژیست جزئی است. نانوذرات مس- اکسید روی همراه با هیدروژن پراکسید در غلظت (۱۰۰ + ۰/۰۲) اثر سینرژیست کامل نشان داد و در سایر غلظتها اثر سینرژیستی جزئی داشتند. در مورد ترکیب نانوذرات مس- اکسید روی و هیپوکلریت سدیم در دو غلظت (۱۰۰ + ۱۰۰ و ۵۰ + ۵۰) اثر سینرژیست کامل و در سایر غلظتها اثر سینرژیست جزئی داشت. در خصوص نانوذرات آلومینیوم- اکسید روی و پراکسید هیدروژن در تمام غلظت‌ها اثر سینرژیستی به صورت جزئی بود. مخلوط نانوذرات آلومینیوم- اکسید روی و هیپوکلریت سدیم نیز در تمام غلظت‌ها اثر سینرژیستی جزئی بود. اثر سینرژیستی پراکسید هیدروژن و هیپوکلریت سدیم با نانوذرات نقره در برابر *اشرشیاکلی* توسط دانگ (۲۰۱۵) گزارش شده است (۲۷).

این مطالعه نشان داد که نانوذرات ترکیبی مس- اکسید روی و آلومینیوم- اکسید روی دارای

Cu²⁺ Ions. Mater Sci Appl; 2012. 3: 543-551.

19. Yolmeh M, Habibi-Najafi MB, Najafzadeh M, Arzyabi asar UV bar roshd *E. Coli*, *Bacillus cereus* joda shode az shir kham va berenje kham]. Iran Food Sci Technol J; 2015.11: 319-324. [Persian].

20. Sawai J, Kojima H, Igarashi H, Hashimoto A, Shoji S, Sawaki T, et al. Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder. World J Microbiol Biotechnol; 2000.16(2):187-94.

21. Kumar KA, Mazumdar K, Dutta NK, Karak P, Dastidar SG, et al. Evaluation of synergism between the aminoglycoside antibiotic streptomycin and the cardiovascular agent amlodipine. Biol Pharm Bull; 2004. 27: 1116-1120.

22. Roks G, Deckers CL, Meinardi H, Dirksen R, van Egmond J, et al. Effects of polytherapy compared with monotherapy in antiepileptic drugs: an animal study. J Pharmacol Exp Ther; 1999; 288: 472-477.

23. Raja K, Ramesh PS, Geetha D. Structural, FTIR and photoluminescence studies of Fe doped ZnO nanopowder by co-precipitation method. Spectrochim. Acta A – Mol Biomol Spectrosc; 2014. 131: 183-188.

24. Sreeram, V. Influence of transition metal (Cu, Al) ions doping on structural and optical properties of ZnO nanopowders. Int J Chem Stud; 2017. 5(1): 70-73.

25. International Center for Diffraction data. Available at: <http://www.icdd.com/>

26. Sharma N, Jandaik S, Kumar S, Chitkara M, Singh Sandhu I. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of manganese- and iron-doped zinc oxide nanoparticles. J Exp Nanosci; 2015.11(1): 54-71

27. Dong X, Koo Y, Tang Y, Yun Y, Yang Y. Superior Antibacterial Activity of Photochemical Synthesized Ag-CNT Composites and their Synergistic Effects in Combination with other Antimicrobial Agents. J Nanomed Nanotechnol; 2015. 6(3): 1-7.

Streptococcus aureus. Sci Total Environ; 2011.409:1603-8.

6. Jassim AM, Farhan SA, Salman JA, Khalaf KJ, Al Marjani MF, Mohammed MT. Study the antibacterial effect of bismuth oxide and tellurium nanoparticles. Int J Chem Biol Sci; 2015.1:81-84.

7. Rezaei-Zarchi S, Javed A, Javeed Ghani M, Soufian S, Barzegari Firouzabadi F, Bayanduri Moghaddam A, et al. Comparative study of antimicrobial activities of TiO₂ and CdO nanoparticles against the pathogenic strain of *Escherichia coli*. Iran J Pathol; 2010.5:83-9.

8. Raghunath A, Perumal E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. Int J Antimicrob Agents; 2017. 49: 137-152.

9. Srinivasulu T, Saritha K, Ramakrishna Reddy K T. Synthesis and characterization of Fe-doped ZnO thin films deposited by chemical spray pyrolysis. Mod Electron Mater; 2017. 3 : 76-85

10. Poloju M, Jayababu N, Ramana Reddy MV. Improved gas sensing performance of Al doped ZnO/CuO nanocomposite based ammonia gas sensor. Mater Sci Eng B; 2018.227: 61-67.

11. Chauhan R, Reddy A, Abraham J. Biosynthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using *Pichia fermentans* JA2 and their antimicrobial property; 2015. J Appl Nanosci .5:63-71.

12. Muthukumaran S, Gopalakrishnan R. Structural, FTIR and photoluminescence studies of Cu doped ZnO nanopowders by co-precipitation method. Opt Mater; 2012.34:1946-1953.

13. Hameed ASH, Karthikeyan C, Sasikumar S, Kumar VS, Kumaresan S, Ravi G. Impact of alkaline metal ions Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ and Ba²⁺ on the structural, optical, thermal and antibacterial properties of ZnO nanoparticles prepared by the co-precipitation method. J Mater Chem B; 2013.1:5950.

14. Gupta K, Singh RP, Pandey A, Pandey A. Photocatalytic antibacterial performance of TiO₂ and Ag-doped TiO₂ against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. Beilstein J Nanotechnol; 2013. 4:346-51.

15. Malka E, Peralshstein I, Lipovsky A, Shalom Y, Naparstek L, Perkas N, et al. Eradication of multi-drug resistant bacteria by a novel Zn-doped CuO nanocomposite. Small; 2013. 9:4069-76.

16. Ghahfarokhi SA, Naji T, Mazdapour M, Kazemi A, Tajehmiri A. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Bacillus cereus*. Int J Basic Biosci; 2014. 2(2): 6-11.

17. Mirhosseini M, Barzegari Firouzabadi F. Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in Milk by Zinc Oxide Nanoparticles. Iran J Pathol; 2015. 10(2): 97-104.

18. Mukhtar M, Munisa L, Saleh R. Co-Precipitation Synthesis and Characterization of Nanocrystalline Zinc Oxide Particles Doped with

Investigating antimicrobial and synergistic effects of doped zinc oxide nanoparticles against *Bacillus cereus*

*Zohreh Didar, Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Neyshabur Branch, Neyshabur, Iran (*Corresponding author). z_didar57@yahoo.com

Abstract

Background: The purpose of this study was to investigate the effect of copper and aluminum-zinc oxide nanoparticles and their synergistic effects with conventional biocides against *Bacillus cereus*.

Methods: Synthesis of copper-zinc oxide, aluminum-zinc oxide nanoparticles performed via co-precipitation method and nanoparticle properties were investigated using FTIR, XRD and TEM. The antimicrobial effects of nanoparticles were determined by determination of the inhibition zone diameter and the synergistic effects of nanoparticles with other conventional biocides determined by the inhibitory concentration fraction index.

Results: The diameter of the inhibition zone for zinc oxide nanoparticles, copper doped zinc oxide and aluminum doped zinc oxide were 16.5, 26 and 20 mm, respectively. Investigation of synergist effects with two common antimicrobial agents, including hydrogen peroxide and sodium hypochlorite, have shown that the doped nanoparticles have synergistic effects with these antimicrobial compounds.

Conclusion: It can be concluded that the doping of copper and aluminum elements in the zinc oxide structure improves its antimicrobial effects. Also, conventional antimicrobial compounds (hydrogen peroxide and sodium hypochlorite) have synergistic effects with synthetic copper nanoparticles and aluminum oxide zinc.

Keywords: Doped nanoparticles, Zinc oxide, synergistic, *Bacillus cereus*