مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۰، شمـاره‌ی ۸۲، آذر و دی ۱۳۹۱، صفحات ۳۱ تا ۴۳

بررسی اثر سینرژیستی نانو ذرات اکسید مس و اکسید روی تجاری علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی با استفاده از شاخص غلظت مهاری نسبی (FIC)

ادریس حسین‌زاده[۱]، محمد یوسف علیخانی[۲]، محمدرضا سمرقندی[۳]

نویسنده‌ی مسوول: همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده‌ی بهداشت، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی mrsamarghandy@umsha.ac.ir

دریافت: ۹۰/۱۲/۹ پذیرش: ۹۱/۳/۸

چکیده

زمینه و هدف: *با توجه به‌مقاومت باکتری‌ها نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل ضدمیکروبی مرسوم، تحقیقات بسیاری برای یافتن انواع جدید عوامل ضدمیکروبی موثر انجام شده است. هدف مطالعه‌ی حاضر تعیین فعالیت ضدباکتری نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس در حالت منفرد و ترکیبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه‌ی تجربی باکتری‌های اشریشیاکلی (ATCC ۲۵۹۲۲)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۲۵۹۲۳)، پسودوموناس آئروژینوزوا (ATCC ۲۷۸۵۳) و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (PTCC ۱۱۱٤) به‌عنوان میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش استفاده شدند. نانوذرات اکسیدمس و اکسیدروی به‌صورت تجاری تهیه گردیدند. فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات با استفاده از حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) و مطالعات زمان مرگ بررسی گردید. مطالعات زمان مرگ با استفاده از غلظت مهاری رشد نانوذرات در هر دو حالت منفرد و ترکیبی برای همه‌ی باکتری‌ها انجام شد. شاخص غلظت مهاری نسبی (FIC) برای تعیین یا توضیح بر همکنش نانوذرات در حالت ترکیبی استفاده گردید. آزمون آنالیز واریانس جهت مقایسه‌ی فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات در حالت منفرد و ترکیبی استفاده و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انتخاب گردید.*

یافته‌ها: *میزان MIC اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس برای حالت ترکیبی نانوذرات از حالت منفرد کمتر ولی برای پسودوموناس آئروژینوزوا و استافیلوکوکوس اورئوس بر عکس بود. مقدار شاخص FIC برای اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، پسودوموناس آئروژینوزوا و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به‌ترتیب ۰/۷۵، ۹، ٦ و ۰/٦۲۵ به‌دست آمد.*

نتیجه‌گیری: *نانوذرت تجاری Cuo و ZnO مورد استفاده در این مطالعه علیه همه‌ی سویه‌های مورد بررسی دارای فعالیت ضد میکروبی بالایی بوده، ترکیب آن‌ها برای بعضی سویه‌ها باعث افزایش اثر باکتری کشی می‌شود.*

واژگان کلیدی: شاخص غلظت مهاری نسبی، نانو ذره‌ی اکسیدروی، نانوذره‌ی اکسیدمس، فعالیت ضد باکتریایی

مقدمه

در سال‌های اخیر به‌دلیل استفاده نادرست و بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت باکتری‌ها به‌عوامل ضدمیکروبی مرسوم، افزایش یافته و یا گونه‌های جدید مقاوم ایجاد شده‌اند که به‌عنوان یک چالش و مشکل در سیستم بهداشتی مطرح

۱- کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

۲- دکترای تخصصی میکروب شناسی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی همدان

۳- دکترای تخصصی بهداشت محیط، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی همدان، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی

Archive of SID

www.SID.ir

مـی‌باشـد (۱). گـاهی اوقـات بـرای افـزایش خاصـیت ممانعت‌کنندگی رشد عوامل ضد میکروبی چون نانوذرات، مـی‌تـوان از ترکیـب دو نـانو ذره بـا یکـدیگر بهـره جـست، به‌طوری‌که ترکیب آن دو بر محدودیت هر یـک از نـانو ذرات در حالت منفرد، غلبه نمایـد. ترکیـب نـانو ذرات در صـورت انتخاب صحیح آن‌ها می‌تواند فوایدی چون وسیع الطیف شدن عملکرد آن‌ها، استفاده از غلظت‌های پایین‌تـر آن‌هـا در حالـت ترکیبی نسبت به حالت منفرد و در نتیجه کاهش مقدار سمیت، جلوگیری از بروز مقاومت میکروبی به هر یـک از نـانو ذرات (عوامل ضـدمیکروبی) در حالـت منفـرد و افـزایش احتمـالی فعالیت ضدمیکروبی ترکیب دو نانو ذره به بیش از آن میزانـی که از مجمـوع سـاده آن‌هـا، داشـته باشـد (۳و۲). در صـورت اسـتفاده از ترکیـب دو عامـل ضـدمیکروبی علیـه جمعیـت باکتریایی، احتمال دارد که پاسخ ضد میکروبـی در مقایسه بـا مجموع اثرات هر یک از آن‌ها در حالت منفرد، افزایش یافته یا بدون تغییر باشد. البتـه کـاهش اثـر ضـدمیکروبی در صـورت ترکیب دو عامل ضدمیکروبی هم محتمل است (۳). شاید مواد شیمیایی ضدمیکروبی که از دو گروه همـسان هـستند و دارای مکانیسم ضدمیکروبی مشابهی می‌باشند، اثر ضدمیکروبی آن‌ها در حالت ترکیبی جمع شونده باشد، در حالی‌کـه عوامـل ضـد میکروبـی بـا مکانیـسم ضـدمیکروبی متفـاوت از هـم یـا در صورتی‌که محل اثر آن‌ها متفاوت از هم باشد، اثر ضدمیکروبی همدیگر را در حالت ترکیبی تقویت کرده، یا کاهش مـی‌دهنـد (٤) (به‌ترتیب سینرژیست و آنتاگونیـست نامیـده مـی‌شـوند). برخی مطالعات انجام شده نـشان داده‌انـد نـانو ذرات نقـره در ترکیب با برخی آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم جهت کنتـرل عوامـل میکروبی دارای خاصیت سینرژیـستی بـوده و کـارآیی حالـت ترکیبی آن‌ها از حالت منفرد هر یک از آن‌ها بیـشتر مـی‌شـود. استفاده از ترکیب بنزالکونیوم بروميـد (Benzalkonium Bromide) و نانو ذرات نقره جهت افزایش عملکرد آن‌ها در کنترل عوامل میکروبی، در مطالعه‌ی یانگ و همکارانش گزارش شده اسـت (۱)، ردی و همکارانش در مطالعه‌ی خویش تئوری استفاده از ترکیب اکسید فلـزی نـانوذرات بـه منظـور بررسـی اثـر ضـد میکروبی آن‌ها در حالت ترکیبی و مقایسه با حالت منفرد آن‌ها را مطرح نمودنـد (۵). گووگنـگ و همکـارانش هـم گروهـی دیگر از محققین بودند که تئوری استفاده از ترکیب نانو ذرات اکسید روی با دیگر نانو ذرات فلزی جهت دسـتیابی بـه یـک عامل ضدمیکروبی با قدرت کـشندگی بـالا علیـه سـویه‌هـای استافیلوکوکوس اورئـوس مقـاوم بـه متیـسیلین (MRSA) را مطرح نمودند (٦). بر اساس مطالعات آن‌ها باکتری‌هـای گـرم منفی نسبت به انواع گرم مثبت از مقاومت بالاتری نـسبت بـه سوسپانسیون ترکیب نانو ذرات مس و نقره برخـوردار بودنـد. تاکنون مطالعه جامع و کـاملی در زمینـه‌ی ترکیـب نـانو ذرات فلزی با یکدیگر و بررسی اثر ضدمیکروبی آن‌هـا علیـه طیـف وسیعی از باکتری‌ها گزارش نشده است، لـذا انجـام مطالعـات بیشتر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اینکـه امروزه استفاده از نانوذرات به منظور کنترل باکتری‌ها در حـال افزایش است (۷و٤) و خواص ضدمیکروبی نانو ذرات اکـسید روی و اکـسید مـس در برخـی مطالعـات تاییـد شـده اسـت (۸و ۷، ٤). و همچنین تاکنون مقاومت میکروبی بـه هیچکـدام از آن‌ها گزارش نشده است، لذا استفاده از آن‌ها جهـت کنتـرل باکتری‌ها می‌تواند هر چـه بیـشتر مـورد توجـه قـرار گیـرد و استفاده از حالت ترکیبی ایـن دو نـانوذره جهـت دسـتیابی بـه خاصـیت سینرژیـستی منطقـی بـه نظـر مـی‌رسـد. اسـتفانیا و همکاران (۹) در مطالعه‌ی خود گـزارش کـرده‌انـد نـانو ذرات اکسید مس قادر به تولید انـواع اکـسیژن فعـال (ROS) چـون پراکسید هیـدروژن در سـلول‌هـای اپیتلیـال مـی‌باشـد و مـانع اجرای مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی سلولی می‌شود؛ لـذا نسبت سلول‌های اکسید شده افزایش می‌یابد بـه‌عبـارت دیگـر نانو ذرات اکسید مس باعث ایجاد آسـیب‌هـای اکـسیداتیو در سلول‌های باکتری‌هـای در تمـاس بـا آن مـی‌شـود. همچنـین یون‌های دو ظرفیتی مس آزاد شده از نانو ذرات اکسید مس از

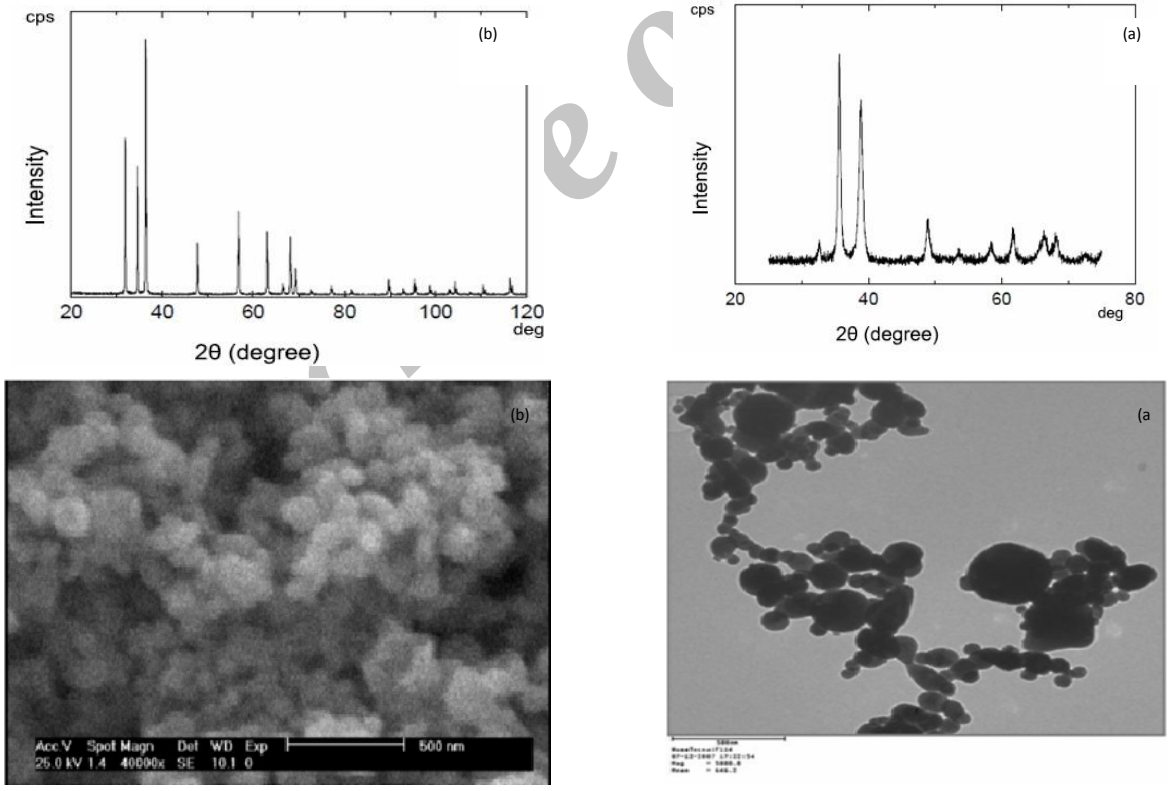
Archive of SID

www.SID.ir

طریق اتصال به DNA باعث آسیب آن شده، در نتیجه باعث مرگ باکتری‌ها می‌گردد. به‌علاوه یون‌های مس با اجرای آپوپتوزیس (مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی) از طریق تغییر مستقیم بیان ژن‌های آپوپتوزیس نیز سبب مرگ سلولی می‌گردند. خاصیت سینرژیستی ترکیب نانوذرات می‌تواند نیاز به غلظت‌های بالای عوامل ضدمیکروبی در جهت کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها را کاهش دهد و در نتیجه عوارض جانبی استفاده از دوزهای بالای آن‌ها نیز تخفیف می‌یابد (٤). براساس مطالعات کتابخانه‌ای و منابع در دسترس استفاده از ترکیب نانوذرات اکسید مس و اکسید روی به‌منظور بررسی اثر سینرژیستی آن‌ها در کنترل میکروارگانیسم‌ها گزارش نشده است. در این مطالعه جهت بررسی اثر ضدمیکروبی ترکیب نانو ذرات اکسید مس و اکسید روی، علاوه بر تعیین حداقل غلظت مهاری رشد برای حالت منفرد و ترکیبی نانو ذرات، توانایی ضدمیکروبی آن‌ها با استفاده از شاخص‌های غلظت مهاری نسبی (FIC) و همچنین مطالعات زمان مرگ هم بررسی شده است که می‌تواند نقطه‌ی قوت این مطالعه نسبت به دیگر مطالعات مشابه انجام شده باشد.

روش بررسی

این پژوهش تجربی و از نوع بنیادی کاربردی می‌باشد که در آزمایشگاه و برروی سویه‌های استاندارد باکتریایی انجام شد.



شکل ۱: *عکس‌های* ***XRD (a)*** *نانو ذره اکسید مس و* ***b*** *نانو ذره اکسید روی) و* ***SEM (a)*** *نانو ذره اکسید مس و* ***b*** *نانو ذره اکسید روی) نانوذرات مورد استفاده*

www.SID.ir

تهیه‌ی نانوذرات: نانوذرات اکسید روی و اکسید مس تجاری برای بررسی فعالیت ضد میکروبی با درجه‌ی خلوص بیشتر از ۹۹ درصد از شرکت Nano Amor؛ ایالات متحده تهیه شد. در ابتدا حالت بلوری و میزان ناخالصی موجود در نانو ذرات اکسید روی با استفاده از پراش اشعه ایکس (XRD) و همچنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) شکل و اندازه‌ی نانو ذرات، در آزمایشگاه مواد و انرژی دانشگاه مجلسی بررسی و تعیین گردید (شکل۱). بر اساس نتایج SEM، نانو ذرات تقریبا دارای شکل کروی بوده، قطر نانوذرات اکسید روی و اکسید مس به‌ترتیب در حدود ۲۰ و ٦۰ نانومتر به‌دست آمد. همچنین میزان سطح ویژه‌ی نانو ذرات با اندازه‌گیری ایزوترم جذب مولکول‌های گاز نیتروژن در دمای ۱۹٦ $^{\circ}C$- (BET; BELSORPmini) برای نانو ذرات اکسیدروی و اکسید مس به‌ترتیب ۹۰ m^2/g و ۸۰m^2/g بوده است.

آماده سازی سوسپانسیون نانو ذرات: برای تهیه‌ی محلول استوک نانو ذرات، ۱۰ گرم نانو ذره در یک لیتر محیط کشت استریل به صورت سوسپانسیون در آورده شد و برای پراکنده شدن مناسب آن‌ها از دستگاه اولتراسونیک (PARSONIC ۷۵۰۰s, Pars Nahand ENGG. Co. IRAN) به مدت زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد. جهت جلوگیری از عدم بروز خطا همزمان با اجرای آزمایشات میکروبی سوسپانسیون نانو ذرات تهیه شدند.

نمونه‌های باکتریایی: باکتری‌های مورد استفاده جهت انجام آزمایشات ضدباکتریایی شامل اشریشیاکلی (ATCC ۲۵۹۲۲) و پسودوموناس آئروژینوزوا (ATCC ۲۷۸۵۳)، از انواع گرم منفی، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۲۵۹۲۳) و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (PTCC ۱۱۱٤) باکتری گرم مثبت بودند که به‌صورت فریز خشک نگهداری شده بودند. این باکتری‌ها از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان تهیه گردیدند.

کشت نمونه‌ی باکتری‌های مورد آزمون: سویه‌های استاندارد باکتری‌های مذکور روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و به مدت ۲٤ ساعت در گرمخانه (RAD Production.Co) با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از طی مدت انکوباسیون، از باکتری‌های رشد کرده برای تهیه‌ی سوسپانسیون باکتریایی استفاده شد (۱۱و۱۰). از استاندارد نیم مک فارلند [$۱-۱/۵ \times ۱۰^۸$ عدد باکتری در هر میلی‌لیتر (Colony-Forming Unit (CFU)] برای آزمایشات استفاده شد. برای اطمینان از ایجاد کدورت مذکور، جذب آن به‌وسیله‌ی اسپکتروفتومتر مرئی- فرابنفش (UNICO-۲۱۰۰؛ ایالات متحده) در محدوده‌ی طول موج ٦۲۰ نانو متر اندازه‌گیری و میزان جذب در محدوده ۰/۱-۰/۰۸ تنظیم شد (۱۲).

آزمایشات حساسیت باکتری‌ها به نانو ذرات تعیین حداقل غلظت بازدارنده‌ی رشد (MIC): MIC به عنوان کمترین غلظت یک عامل ضدمیکروبی (در حالت منفرد) اطلاق می‌شود که از رشد ظاهری میکروارگانیسم‌های در تماس با آن ممانعت به عمل آورد (۱۳). برای به‌دست آوردن مقدار MIC از روش کلاسیک تهیه‌ی رقت‌های متوالی کمیته‌ی ملی استانداردهای آزمایشگاهی (National Committee for Clinical Laboratory Standards, ۲۰۰۰) استفاده شد (۱۰). در این تست از ۱۲ لوله که هر کدام حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط تریپتون سویا براث استریل بود، استفاده گردید. بدین صورت که در لوله‌ی اول فقط ٤ میلی‌لیتر سوسپانسیون مورد نظر ریخته، مخلوط شد، سپس از لوله‌ی شماره ۱ مقدار ۲ میلی‌لیتر برداشته، به لوله شمار ۲ اضافه و از این لوله ۲ میلی‌لیتر به لوله بعدی اضافه، به همین ترتیب تا لوله ۱۲ این عمل تکرار گردید. برای این که حجم همه لوله‌ها با هم برابر گردد، ۲ میلی‌لیتر از لوله آخر دور ریخته شد. سپس به لوله‌های یک تا دوازده، سوسپانسیون باکتری مورد نظر اضافه

Archive of SID
www.SID.ir

گردید و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور شیکردار (۲۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و حداکثر مدت زمان ۲٤ ساعت) قرار گرفته و جواب با مشاهده‌ی کدورت و شفافیت به‌صورت رشد، یا عدم رشد باکتری در نظرگرفته شد. کمترین غلظت (بیشترین رقت) سوسپانسیون نانو ذرات که کدورت (نشان دهنده‌ی رشد میکروارگانیسم) نشان نمی‌داد، به‌عنوان حداقل غلظت مهاری رشد نانو ذرات شناخته شد. در این رقت به‌دست آمده سوسپانسیون نانو ذرات باکتریواستاتیک می‌باشند.

غلظت مهاری نسبی: برای مشخص شدن هر گونه اثر سینرژیستی (هم افزایی) نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس از روش Two-Dimensional Dilution Assay استفاده شد. در این روش اثر ترکیب نانو ذرات نسبت به حالت منفرد آن‌ها با استفاده از محاسبه‌ی مقدار عددی شاخص غلظت مهاری نسبی بررسی شد (۱٤).

مطالعات زمان مرگ: مطالعات زمان مرگ مطابق با روش ارایه شده توسط NCCLS با اصلاحات انجام شده توسط Handwerger و همکاران استفاده شد (۱٦و ۱۵). بر اساس پیشنهاد این محققین برای تعیین زمان مرگ می‌توان از زمان تماس ٦ ساعت به جای ۲٤ ساعت استفاده شود. جهت مطالعات زمان مرگ سوسپانسیون باکتریایی به محیط کشت حاوی نانو ذرات با غلظت مقدار MIC اضافه شد و سپس در انکوباتور شیکر دار (۲۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و حداکثر مدت زمان ۲٤ ساعت) گرمخانه‌گذاری شدند. در زمان‌های مورد نظر (صفر تا ۳٦۰ دقیقه) از سوسپانسیون باکتری- نانوذره‌ی نمونه‌برداری شده و بر روی پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. کلنی‌های شکل گرفته برای هر زمان تماس، سویه‌ی باکتری و غلظت نانو ذره شمارش و ثبت شدند. برای بررسی معنی‌دار بودن اختلاف تعداد باکتری‌های زنده مانده در تماس با سوسپانسیون نانو ذرات در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف از آزمون آماری آنالیز واریانس مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون ۰/۰۵ انتخاب گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه غلظت مهاری رشد برای هر یک از نانو ذرات و همچنین حالت ترکیبی آن‌ها به‌دست آورده شد و نتایج آن‌ها در جدول ۱ ارایه شده است. بر اساس جدول ۱ مقدار MIC برای دو باکتری اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در حالت ترکیب دو نانو ذره کمتر از حالت منفرد آن‌ها است. به‌عبارت دیگر این دو باکتری حساسیت بیشتری به ترکیب نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس نسبت به حالت منفرد آن‌ها دارند. نتایج مطالعات تعیین غلظت مهاری نسبی در جدول ۱ ارایه شده است. در این شاخص اگر میزان FIC مساوی یا کمتر از ۰/۷۵ باشد، دو نانو ذره در برابر باکتری مورد بررسی اثر سینرژیستی بر هم دارند، اگر FIC برابر ۱ باشد آن دو نانو ذره اثر فزاینده ولی اگر میزان FIC بین ۱ و ۲ باشد، این دو نانو ذره بر هم هیچ اثری ندارند؛ همچنین اگر میزان FIC بزرگتر از ۲ باشد، این دو نانو ذره در حالت ترکیبی بر هم اثر آنتاگونیستی دارند (۱٤)؛ بر این اساس ترکیب نانو ذرات اکسید مس و اکسید روی فقط علیه دو باکتری اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس اثر تشدید کننده (سینرژیستی) داشته است و برای دو باکتری دیگر اثر ممانعت کننده (آنتاگونیستی) داشته‌اند.

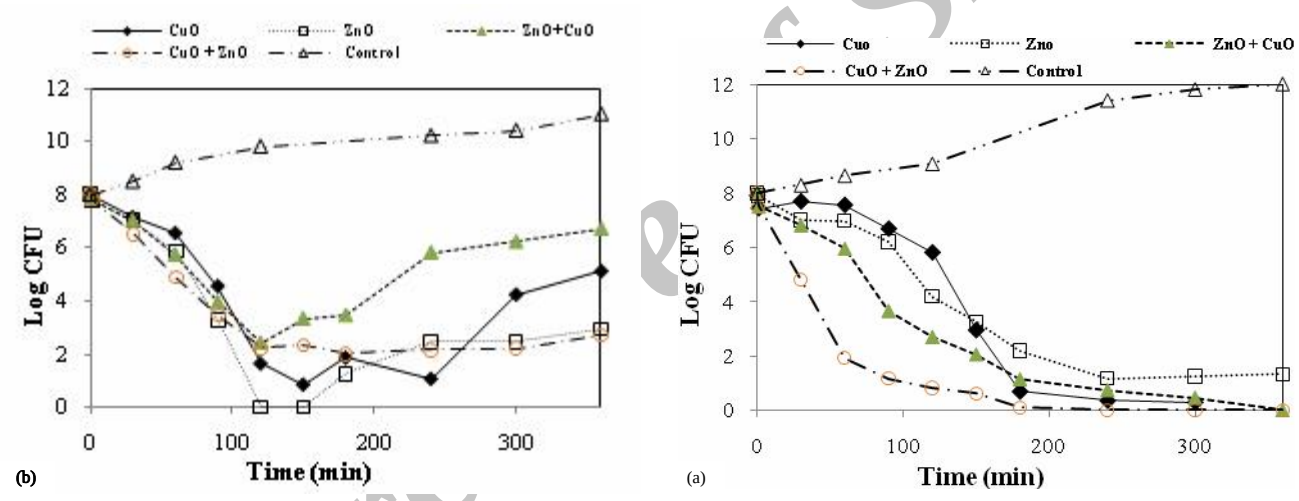
نتایج مطالعات زمان مرگ برای باکتری‌های در تماس با نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس در هر دو حالت منفرد و ترکیبی در شکل‌های ۲ و ۳ ارایه شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: نتایج مقدار غلظت مهاری رشد و غلظت مهاری نسبی نانو ذرات اکسید مس، اکسید روی و حالت ترکیبی آن‌ها

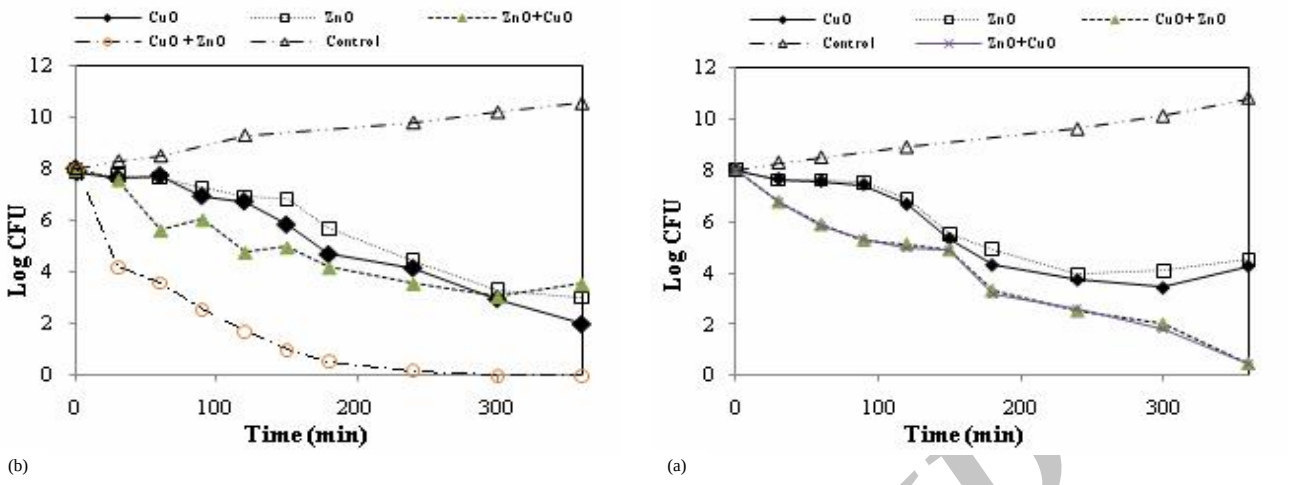
سویه‌های باکتریایی / آزمون (µg/ml)	اشریشیاکلی (ATCC ۲۵۹۲۲)	پسودوموناس آئروژینوزوا (ATCC ۲۷۸۵۳)	استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۲۵۹۲۳)	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (PTCC ۱۱۱٤)
MIC_{ZnO}	۱۲۵۰	۱۲۵۰	۳۱۲/۵	٦۲۵
MIC_{CuO}	۱۵٦/۲۵	۱۵٦/۲۵	۳۱۲/۵	٦۲۵
$MIC_{CuO+ZnO}$	۱۲۵۰	۱۵٦/۲۵	۱۲۵۰	۱۲۵۰
$MIC_{ZnO+CuO}$	۳۱۲/۵	٦۲۵	۷۸/۱۲۵	۱۵٦/۲۵
FIC	۰/۷۵	٦/۰۰	۹/۰۰	۰/٦۲۵
نتیجه FIC	سینرژیستی	آنتاگونیست	آنتاگونیست	سینرژیستی



*شکل ۲: منحنی زمان مرگ برای باکتری‌های اشریشیاکلی (**ATCC ۲۵۹۲۲**) (نمودار **a**) و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (**PTCC ۱۱۱٤**) (نمودار **b**) با استفاده از نانو ذرات در حالت منفرد و ترکیبی. برای کنترل از محیط کشت بدون نانوذره استفاده شد.*

بر اساس نتایج به‌دست آمده از مطالعات زمان مرگ (شکل ۲ و ۳)، کاهش جمعیت باکتری‌های در تماس با ترکیب نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس در پایان ۳٦۰ دقیقه، برای سه باکتری اشریشیاکلی، پسودوموناس آئروژینوزوا (فقط برای $MIC_{CuO+ZnO}$) و استافیلوکوکوس اورئوس (فقط برای $MIC_{CuO+ZnO}$) بیشتر از حالت منفرد این نانو ذرات بوده است. اما برای بیان ایجاد اثر سینرژیستی بر اساس شاخص کاهش جمعیت $\geq 2\log_{10}$ می‌توان گفت که اثر سینرژیستی علیه استافیلوکوکوس اورئوس و پسودوموناس آئروژینوزوا وجود داشته است.

www.SID.ir



شکل ۳: منحنی زمان مرگ برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۲۵۹۲۳) (نمودار a) و پسودوموناس آئروژینوزوا (ATCC ۲۷۸۵۳) (نمودار b) با استفاده از نانو ذرات در حالت منفرد و ترکیبی. برای کنترل از محیط کشت بدون نانوذره استفاده شد.

میزان pH سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی، اکسید مس و ترکیب آن‌ها در غلظت‌های تهیه شده برای به‌دست آوردن MIC اندازه‌گیری شد و نتایج آن در جدول ۲ ارایه شده است. دامنه‌ی تغییرات pH در سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی بیشتر از اکسید مس بوده است (۰/۰۰ ± ۷/۲٤ تا ۰/۰۱ ± ۸/۹ در مقابل ۰/۰۱ ± ۸/۳۵ تا ۰/۰۵ ± ۸/۸۷).

جدول ۲: تغییرات pH برای سوسپانسیون هر یک از نانو ذرات در غلظت‌های تهیه شده بر اساس تکنیک رقت‌های متوالی

غلظت (µgr/ml)	میزان pH		
	اکسید مس	اکسید روی	ترکیب نانو ذرات
۱۰۰۰۰	۸/۳۸ ± ۰/۰۳	۸/۷۱ ± ۰/۰۰	۷/۹ ± ۰/۰۱
۵۰۰۰	۸/۵ ± ۰/۰۲	۷/۹٤ ± ۰/۰۱	۸/۰۱ ± ۰/۰۱
۲۵۰۰	۸/٤۵ ± ۰/۰۰	۷/۸۹ ± ۰/۰۰	۷/۸٦ ± ۰/۰۱
۱۲۵۰	۸/٦۲ ± ۰/۰۲	۷/۸۲ ± ۰/۰۱	۸/۱۷ ± ۰/۵٦
٦۲۵	۸/۵۳ ± ۰/۰۱	۷/۸ ± ۰/۰۰	۷/۵٤ ± ۰/۰۱
۳۱۲/۵	۸/۷۲ ± ۰/۰۱	۷/۷ ± ۰/۰۱	۸/٦۲ ± ۰/۰۰
۱۵٦/۲۵	۸/۵۷ ± ۰/۰۲	۷/۵۲ ± ۰/۰۱	۷/۵۸ ± ۰/۰۲
۷۸/۱۲۵	۸/۳۵ ± ۰/۰۱	۷/۲٤ ± ۰/۰۱	۷/٤۲ ± ۰/۰۱
۳۹/۰٦۲۵	۸/۸۷ ± ۰/۰۵	۸/۷٤ ± ۰/۰۱	۷/٦۵ ± ۰/۰۱
۱۹/۵۳۱۳	۸/۷۸ ± ۰/۰۲	۸/۷۸ ± ۰/۰۰	۸/۷۸ ± ۰/۰۰
۹/۷٦۵٦۳	۸/۷٤ ± ۰/۰۰	۸/۹ ± ۰/۰۱	۸/۵۱ ± ۰/۰۰
٤/۸۸۲۸۱	۷/٤ ± ۰/۰۰	۷/٤ ± ۰/۰۰	۷/٤ ± ۰/۰۰

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین آنالیز آماری برای تغییرات pH در غلظت نانو ذرات تفاوت معنی‌داری نشان داد (ANOVA ،P=۰/۰۱۹). بر اساس نتایج تحلیل آماری تعداد باکتری‌ها یا به عبارتی مرگ باکتری‌ها با زمان در مواجهه، سویه‌های باکتری، اثر همزمان باکتری و زمان مواجهه و نوع نانو ذرات (اکسید مس، اکسید روی یا ترکیب دو نانو ذره) دارای اختلاف معنی‌داری بوده است (P<۰/۰۰۱).

بحث

در این مطالعه کارآیی فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس در حالت منفرد و ترکیبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی گردید. در این مطالعه غلظت اولیه باکتری‌ها ثابت بود (۱/۵ × ۱۰۸ CFU/ml) و فقط سویه‌های باکتری‌های مورد بررسی و نانو ذرات متغیر بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس علیه هر چهار باکتری دارای اثر مهار کننده‌ی رشد بوده است. فعالیت هر دو نانو ذره اکسید روی و اکسید مس در آزمایشات حداقل غلظت مهاری رشد علیه دو باکتری اشرشیاکلای و پسودوموناس آئروژینوزوا یکسان بوده است (جدول ۱)، ولی حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس به اکسید مس و حساسیت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به اکسید روی بیشتر بوده است. میزان آسیب‌پذیری دیواره‌ی سلولی در سویه‌های مختلف باکتریایی به دلیل تفاوت نفوذپذیری غشا، متفاوت از هم می‌باشد؛ لذا میزان حساسیت باکتری‌های مختلف در شرایط یکسان غلظت نانو ذره و زمان تماس می‌تواند نسبت به هم بسیار متفاوت باشد (۱۷). برخی باکتری‌ها نسبت به O۲- بسیار آسیب پذیرند در حالی‌که برخی دیگر از باکتری‌ها چون اشرشیا کلای نسبت به H۲O۲ از حساسیت بالایی برخوردارند و نوع اکسیژن‌های فعال تولیدی از سطح هر نانو ذره متفاوت و اختصاصی است (۱۷). ترکیب نانو ذرات اکسید روی با نانو ذرات اکسید مس و بررسی اثر مهاری آن‌ها با شاخص FIC، برای باکتری‌های اشرشیاکلای و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس اثر سینرژیستی و برای دو باکتری پسودوموناس آئروژینوزوا و استافیلوکوکوس اورئوس اثر آنتاگونیستی نشان داد. جعفری و همکاران (٤) در مطالعه‌ی خود نانو ذرات نقره و اکسید روی را سنتز و خواص ضدمیکروبی آن را در حالت منفرد و ترکیب با یکدیگر بررسی نمودند. نتایج مطالعه‌ی این محققین نشان داد سویه‌های گرم منفی نسبت به سویه‌های گرم مثبت در مقابل ترکیب دو نانو ذره حساسیت بیشتری دارند و در این مطالعه شاخص FIC برای هر دو گروه گرم مثبت و گرم منفی (به‌ترتیب استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و اشرشیا کلای) اثر سینرژیستی نشان داده که البته بر اساس مقدار عددی شاخص FIC میزان حساسیت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (گرم مثبت) بیشتر بوده است. همچنین آن‌ها پیشنهاد کردند ترکیب نانو ذرات اکسید روی و نقره باعث افزایش فعالیت باکتری‌کشی آن‌ها علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها خواهد شد. بر اساس نتایج ارایه شده در جدول ۱، کارآیی ضدمیکروبی نانو ذرات اکسید مس و اکسید روی علیه دو باکتری پسودوموناس آئروژینوزوا و استافیلوکوکوس اورئوس با ترکیب این دو نانو ذره کاهش می‌یابد ولی علیه دو باکتری دیگر افزایش می‌یابد. یانگ و همکارانش (۱۸) در مطالعه‌ی خود عنوان کردند که توانایی فتوکاتالیکی نانو ذرات اکسید روی در حالت ترکیبی با نانو ذرات نقره، اکسیداسیون نانو ذرات نقره را افزایش و بهبود می‌بخشد، همچنین توانایی احیای نانو ذرات نقره به دلیل خواص فتوکاتالیکی نانو ذرات اکسید روی افزایش می‌یابد و این موجب مهار رشد باکتری‌ها می‌شود. این تئوری برای اثر سینژیستی ترکیب نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس در مطالعه حاضر هم محتمل بوده و می‌تواند به‌عنوان مکانیسم احتمالی در حالت سینرژیستی ذکر گردد. همچنین این محققین این تئوری را مطرح کردند که نانو ذرات نقره، سطح نانو ذرات اکسید روی را پوشانده، باعث

Archive of SID

www.SID.ir

تولید الکترون آزاد از طریق واکنش فتوکاتالیکی نانو ذرات اکسید روی می‌شود که جداسازی الکترون را افزایش می‌دهد و شکاف‌هایی در غشای سلولی باکتری‌ها ایجاد می‌کند که در نهایت مجبور به افزایش فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات در حالت ترکیب دو نانو ذره می‌شود. بر اساس آنچه مندل و همکاران (۱۹) در مطالعه‌ی خویش ذکر کرده‌اند، در صورتی‌که در مطالعات زمان مرگ تعداد باکتری‌های در تماس با ترکیب دو عامل ضدمیکروبی نسبت به حالت منفرد آن‌ها کاهش جمعیت باکتریایی در حدود ۲log۱۰≥ را سبب شود، حالت ترکیبی دو عامل ضدمیکروبی دارای اثر سینرژیستی خواهد بود. بر این اساس در مطالعه‌ی حاضر ترکیب دو نانو ذره‌ی اکسید روی و اکسید مس علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و پسودوموناس آئروژینوزوا دارای اثر سینرژیستی بوده است در حالی‌که برای باکتری اشرشیا کلی تنها در ۱۸۰ دقیقه ابتدایی اثر سینرژیستی مشهود بود. با توجه به نتایج شاخص FIC و مطالعات زمان مرگ می‌توان گفت این دو شاخص دارای نتیجه‌ی یکسان نبوده و تقریبا بیان اثر سینرژیستی ترکیب دو نانو ذره‌ی مخالف با همدیگر می‌باشد که مندل و همکاران نیز در مطالعه‌ی خود به همین نتیجه رسیدند. بایستی به این نکته دقت شود که مبنای حصول اثر سینرزیستی در دو روش زمان مرگ (محاسبه بر اساس کاهش جمعیت میکروبی به مقدار حداقل ۲log) و FIC (محاسبه بر اساس مقدار MICها) با یکدیگر متفاوت است. چانگ و همکارانش (۲۰) پیشنهاد کرده‌اند که میزان تجمع بار منفی بر روی سطح سلولی باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. بر هم کنش بین نانو ذرات دارای بار مثبت و دیواره‌ی سلولی دارای بار منفی منجر به نشت محتویات درون سلول باکتری می‌شود. این اتفاق ناشی از جابجایی اتم‌های هیدروژن دارای بار مثبت با کاتیون‌های دو ظرفیتی می‌باشد که به استحکام غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی از طریق هم پایه کردن لیپوپلی ساکارید (LPS) کمک خواهد نمود. با توجه به pH_{ZPC} نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس مورد استفاده در این مطالعه (به ترتیب ۷/۵۱ و ٦/۹٦) و pH سوسپانسیون نانو ذرات می‌توان گفت بار موجود بر روی نانو ذرات اکسید مس منفی بوده است، لذا تمایل به جذب بر روی سطح سلول باکتری‌های گرم مثبت داشته است، در حالی‌که با توجه به pH_{ZPC} نانو ذرات اکسید روی و pH سوسپانسیون آن، بار الکتریکی موجود بر روی سطح نانو ذرات اکسید روی بین مثبت و منفی در تغییر بوده است و این حالت در نتایج MIC نیز مشهود است.

میداندر و همکارانش (۲۱) در نتیجه‌ی مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که مقداری یون مس دو ظرفیتی از سوسپانسیون نانو ذرات اکسید مس به محیط رها می‌شود که متناسب با آن در ایجاد سمیت و پتانسیل باکتری‌کشی نانو ذرات اکسید مس دخیل هستند. در حالی‌که استفانیا و همکارانش عنوان کردند اگرچه مقدار بسیار اندکی یون مس از نانو ذرات اکسید مس به محیط رها می‌شود اما غلظت آن در حدی نیست که بتواند آسیب جدی سلولی ایجاد نماید، لذا مکانیسم اصلی باکتری‌کشی نانو ذرات اکسید مس با خود نانو ذرات مرتبط است و به یون‌های رها شده احتمالی از نانو ذرات مرتبط نمی‌باشد. بر اساس تئوری مطرح شده توسط آن‌ها یون‌های مس رها شده در محیط به سرعت با سوپراکسید واکنش داده، در نتیجه روبیدن (Scavenging) آن را مشکل نموده، احتمالا در چرخه‌ی احیا شرکت کرده که منجر به تحمل استرس اکسیداتیو از سوی سلول می‌شود و به‌عبارت دیگر باعث کاهش اثر باکتری‌کشی نانو ذرات می‌شود (۹). نانو ذرات به علت جذب درون ذره‌ای ناشی از نیروهای واندروالس و الکترواستاتیک دارای انرژی سطحی بسیار بالایی هستند، لذا ذرات در سوسپانسیون به حالت مجتمع خواهند شد؛ بنابراین بر هم کنش نانو ذرات و باکتری‌ها کاهش یافته و در نتیجه کارآیی باکتری کشی آن‌ها کمتر خواهد شد. یامامتو و همکارانش (۲۲) در مطالعه‌ی خود مشاهده کردند که

Archive of SID

www.SID.ir

با افزایش غلظت نانو ذرات به بیش از ۱۰۰۰ppm، مجتمع شدن ذرات اتفاق می‌افتد در حالی‌که مکل‌هالف معتقد است مجتمع شدن ذرات در هر غلظتی در داخل سلول باکتری اتفاق می‌افتد (۲۳). نظر به اینکه در مطالعه‌ی حاضر غلظت مهاری برخی از سویه‌ها در غلظت‌های بیشتر از ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمده است، لذا با مجتمع شدن ذرات خاصیت اصلی باکتری‌کشی نانو ذرات به‌دست نمی‌آید. pH سوسپانسیون اکسید روی، اکسید مس و ترکیب دو نانو ذره نزدیک به خنثی بوده است، لذا انحلال آن‌ها کاهش یافته و مقدار یون دو ظرفیتی روی و مس که احتمالا به محیط آزاد می‌شود، بسیار ناچیز است و می‌توان گفت اثر ضدمیکروبی نانو ذرات منحصرا به خود نانو ذرات مربوط است و به یون‌های دو ظرفیتی رها شده از آن‌ها مربوط نمی‌باشد. فیلیت و پرافالوگ در مطالعه‌ی خود اثر تغییرات pH بر روی رشد باکتری S.cerevisiae را مطالعه نمودند. نتایج مطالعه‌ی آن‌ها نشان داد که رشد این باکتری در pH=۸ مهار می‌شود. زمانی که سوسپانسیون نانو ذرات دارای pH خنثی یا اندکی اسید باشد، انواع اکسیژن فعال در سوسپانسیون نانو ذرات به راحتی شکل می‌گیرد (۲۴). در مطالعه‌ی حاضر با توجه به دامنه‌ی تغییرات pH سوسپانسیون نانو ذرات، می‌توان گفت تغییرات pH هم اثر مثبتی بر پتانسیل باکتری‌کشی نانو ذرات مورد استفاده داشته است.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ترکیب نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس باعث افزایش اثر ضدمیکروبی هر یک از نانو ذرات می‌شود و به‌طور کلی ترکیب نانو ذرات می‌تواند باعث افزایش اثر ضدمیکروبی شده و استفاده از آن جهت کنترل جمعیت باکتریایی مورد توجه قرار گیرد. با توجه به نتایج غیر همسوی دو شاخص FIC و مطالعات زمان مرگ برای بررسی اثر سینرژیستی ترکیب نانو ذرات، مطالعات بیشتر با تعداد بیشتری از سویه‌های باکتریایی نیاز می‌باشد و یا توسعه مدل‌های جدید مورد نیاز باشد. برای مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود اثر سینرژیستی ترکیب نانوذرات در حضور دیگر عوامل ضدمیکروبی نیز بررسی گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط می‌باشد؛ لذا نویسندگان مقاله‌ی حاضر بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های مادی و معنوی معاونت تحقیقات و فناوری و مرکز تحقیقات علوم بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی همدان تشکر و قدردانی نمایند.

References

1- Yang WT, Gong HLY, Chen WY, Gaiadu C. Preparation of silver nanoparticles of enhanced antibacterial effect with benzalkonium bromide. *J Optoelecttronics Advanced Materials*. 2011; 13: 661-5.

2- Ruden S, Hilpert K, Berditsch M, Wadhwani P, Anne S. Ulrich1. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane permeabilizing antimicrobial peptides. *J Antimicrobial agents Chemotherapy*. 2009; 53: 3538-40.

3- Dorsthorst DTAT, Verweij PE, Meis JFGM, Punt NC, Mouton JW. Comparison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of in vitro interaction of antifungals against itraconazole

Archive of SID

www.SID.ir

susceptible and resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Antimicrobial agents Chemotherapy*. 2002; 46: 702-7.

4- Jafari A, Ghane M, Arastoo S. Synergistic antibacterial effects of nano zinc oxide combined with silver nanocrystales. *African J Microbiol Research*. 2011; 5: 5465-73.

5- Reddy K, Feris K, Bell J, Wingett D, Hanley C, Punnoose A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *J Appl Phys Lett*. 2007; 90: 2139021-3.

6- Ren G, Hu D, Cheng EWC, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Inter J Antimicrobial agents*. 2009; 33: 587-90.

7- Emami-Karvani Z, Chehrazi P. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on gram-positive and gram-negative bacteria. *African J Microbiol Res*. 2011; 5: 1368-73.

8- Hoseinzadeh E. Evaluation of antimicrobial propertice of copper oxide nanoparticle, zinc oxide nanoparticle and their combine against bacterial nasocomial infections agents. Hamedan: Hamedan University of Medical Sciences and Health Services; 2011.

9- Fahmy B, Stephania AC. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *J Toxicol in Vitro*. 2009; 23: 1365-71.

10- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. Document M26-A. Wayne, PA: NCCLS; 1999. Available from: isoforlab.com/phocadownload/csli/M26-A.pdf

11- Sharafati-chaleshtori R, Sharafati-chaleshtori F, Rafieian M. Antibacterial effects of ethanolic extract of Walnut leaves (*Juglans Regia*) on propionibacterium acnes. *J Zanjan Univ Med Sci*. 2010; 18: 42-49.

12- Ruparelia J, Chatterjee A, Duttagupta S, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *J Acta Biomaterialia*. 2008; 4: 707-16.

13- Ghadiri K, Ahmadi P, Abiri R, et al. The MIC study of antibiotics used in the treatment of children with urinary tract infections caused by *E.coli* using E-test and its comparison with disk diffusion. *J Zanjan Univ Med Sci*. 2009; 17: 89-98.

14- Mulet-Powell N, Lacoste-Armynot AM, Viñas M, Simeon de Buochberg M. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. *J Food Protection*. 1998; 61: 1210-2.

15- Tuomanen E, Durack D-T, Tomasz A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *J Antimicrob Agents Chemother*. 1986; 30: 521-7.

16- Vijay N, Shailesh K, Sanjay-Mohan S, Naveen P, Manu C. Time-kill curve studies of Acnano against *Staphylococcus aureus* & *Staphlococcus epidermidis*. *Inter J Drug Development Res*. 2010; 2: 129-33.

17- Jin T, Hey. Antibacterial activities of magnesium oxide (Mgo) nanoparticles against

Archive of SID

www.SID.ir

foodborne pathogens. *J Nanoparticle Res*. 2011; 13: 6877-85.

18- Yang L, Mao J, Zhang X, et al. Preparation and characteristics of Ag/nano-ZnO composite antimicrobial agent. *J Nanosciences*. 2006; 1: 44-8.

19- Mandal S, Pal N, H.Chowdhury I, Debmandal M. Antibacterial activity of ciprofloxacin and trimethoprim, alone and in combinittion, against *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor serotype Ogawa isolate. *Polish J Microbiol*. 2009; 58: 57-60.

20- Chung Y, Su Y, Chen C, Jia G, Wang H, Lin JWJ. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *J Acta Pharmacol Sinica*. 2004; 25: 932-6.

21- Midander K, Cronholm P, Karlsson HL, et al. Surface characteristics, copper release and toxicity of nano and micrometer sized copper and copper(II) oxide particles: A cross-disciplinary study. *J Small*. 2009; 5: 389-99.

22- Yamamoto O, Sawai J, Sasamoto T. Change in antibacterial characteristics with doping amount of ZnO in MgO, ZnO solid solution. *Inter J Inorganic Materials*. 2000; 2: 451-4.

23- Makhluf S, Dror R, Nitzan Y, Abramovich Y, Jelinek R, Gedanken A. Microwave assisted synthesis of nanocrystalline MgO and its use as a bacteriocide. *J Advanced Functional Materials*. 2005; 15: 1708-15.

24- Praphailong W, Fleet GH. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *J Food Microbiol*. 1997; 14: 459-68.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of Synergistic Effect of Commercial Zinc Oxide and Copper Oxide Nanoparticles against Gram Positive and Gram Negative Bacteria by Fraction Inhibitory Concentration Index

Hoseinzadeh E[1], Alikhani MY[2], Samarghandy MR[3,4]

[1]Dept. of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

[2]Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

[3]Dept. of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

[4]Heath Research Center, Faculty of Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

Corresponding Author: Samarghandy MR, Dept. of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

E-mail: mrsamarghandy@umsha.ac.ir

Received: 28 Feb 2012 **Accepted:** 28 May 2012

Background and Objective: This study aimed to determine the antibacterial activity of either zinc oxide or copper oxide nanoparticles alone or combined against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Materials and Methods: In this experimental study *Escherichia coli* (*E. coli* ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (*S.aureus* ATCC 25923), *Pesudomonas aueroginosa* (*P. aueroginosa* ATCC 27853) and *Staphylococcus Epidermidis* (*S. Epidermidis* PTCC 1114) were used as test microorganisms. The Zinc and copper oxide nanoparticles were prepared commercially. The antibacterial activity of nanoparticles were studied using bacteriological tests such as minimum inhibitory concentration (MIC) and time kill study. Time kill studies were done using MIC nanoparticle concentration in mono and combined together mood for all the test microorganisms. The fractional inhibitory concentration (FIC) index used to define or to describe nanoparticle interactions at combined together mood of two nanoparticles. The ANOVA test (SPSS ver. 16) was used to compare the antibacterial activity of nanoparticles alone and combined. A *P*-value of ≤ 0.05 was considered significant.

Results: The MIC value for *E. coli* and *S.epidermidis* against the combined nanoparticles had a lower concentration than mono metallic nanoparticles. By contrast, the MIC value for *P.aeroginusa,* and *S. aureus* against the combined mood of the nanoparticles had higher concentration. The fractional inhibitory concentration (FIC) index for *E. coli*, *S.aureus, P. auroginosa* and *S. epidermidis* were 0.75, 9, 6, and 0.625, respectively. The results show that the Gram-negative bacteria seem to be more resistant to ZnO nanoparticles than the Gram-positive bacteria. Moreover, the antibacterial effect of nanoparticles in both mono and combined modes were time dependent ($P<0.0001$).

Conclusion: The used commercial CuO/ZnO nanoparticles have great antibacterial potential against all of the strains, and the combination of zinc oxide and Copper oxide nanoparticles increases their bactericidal effect only for certain strains but not all.

Keywords: Fraction Inhibitory Concentration Index, Zinc oxide nanoparticle, Copper oxide nanoparticle, Antibacterial activity

Archive of SID

www.SID.ir