

## بررسی فعالیت ضدباکتریایی نانوذره اکسید روی، بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و اشرشیاکلی

پروانه محمدیگی<sup>\*</sup>، محمد سوداگر<sup>۱</sup>، محمد مازندارانی<sup>۱</sup>، سیده صدیقه حسینی<sup>۲</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** در طی سالهای اخیر، به منظور جلوگیری از استفاده بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد ضد عفونی‌کننده جایگاه ویژه‌ای یافته است. گزارشهای متعددی در رابطه با خاصیت ضد میکروبی اکسید روی بر باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها وجود دارد. در این تحقیق، اثرات ضدباکتریایی نانوذره اکسید روی بر دو باکتری گرم منفی اشرشیاکلی (به علت اهمیت سلامت انسانی) و باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی (به دلیل بیماری‌زایی بالا در ماهیان) مورد بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی:** در این مطالعه، حداقل غلظت باکتری‌کشی (Minimum Bactericidal Concentrations) و حداقل غلظت مهار رشد (Minimum Inhibitory Concentrations) این ماده با استفاده از روش‌های محیط کشت مایع (لوله‌گذاری) و دیسک‌گذاری به روش استاندارد برای سوش باکتری گرم مثبت (استرپتوکوکوس اینیایی) و سوش باکتری گرم منفی (اشرشیاکلی) تعیین گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح  $p < 0/05$  تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج این بررسی، مقادیر MBC نانوذره اکسید روی برای باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و اشرشیاکلی به ترتیب برابر با  $0/095$  و  $0/6$  میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقادیر MIC این ماده برای باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و اشرشیاکلی به ترتیب برابر با  $0/015$  و  $0/095$  میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد نانوذره اکسید روی اثر مهارکنندگی و باکتری‌کشی قابل قبولی بر باکتری‌های اشرشیاکلی و استرپتوکوکوس اینیایی دارد و می‌تواند به عنوان یک ماده ضدباکتریایی در محیط‌های آبی مورد استفاده قرار گیرد.

**کلید واژه‌ها:** نانوذره اکسید روی؛ استرپتوکوکوس، اشرشیاکلی؛ عوامل آنتی‌باکتریال.

<sup>۱</sup>دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

<sup>۲</sup>دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات:

پروانه محمدیگی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

parvanemohammadbeigi68@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۲۵

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Mohammadbeigi P, Sodagar M, Mazandarani M, Hoseini SS. An investigation of antibacterial activity of ZnO nanoparticle on *Streptococcus iniae* and *Escheria coli*. Qom Univ Med Sci J 2016;10(5):55-63. [Full Text in Persian]

## مقدمه

استفاده از مواد ضدباکتریایی مناسب همواره قادر است عوامل پاتوژن و بیماری‌زا را تا حد زیادی کنترل کند که این امر منجر به کاهش آلودگی و بیماری محصولات دامی شده و در نتیجه نیاز به مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش می‌دهد. در صنعت آبی‌پروری علاوه بر مشکل مقاومت‌های دارویی، باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی نیز همراه با مصرف محصولات به انسان منتقل می‌شود، از این رو معرفی مواد ضدعفونی‌کننده به جای آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌خصوص در محصولات آبی بسیار ضروری به نظر می‌رسد (۱).

معمولاً از ضدعفونی‌کننده‌ها برای کنترل عفونت‌های ناشی از عوامل بیماری‌زا در کارگاه‌های پرورش ماهی استفاده می‌کنند. کاربرد این ترکیبات می‌بایست در غلظت‌هایی صورت گیرد که برای ماهیان کشنده نباشد. تأثیر یک ماده ضدعفونی‌کننده، بستگی به نسبت زمان - غلظت آن ماده دارد. در این حالت باید ماهی را در آبی با نسبتی از زمان - غلظت قرار داد تا بدون اینکه به آن صدمه وارد شود، موجودات زنده عفونی را از بین ببرد (۲). از طرفی، استفاده زیاد از مواد ضدباکتریایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها در آبی‌پروری به‌عنوان یک مشکل در حال گسترش مطرح بوده و یافتن راه‌حلی برای کنترل پاتوژن‌ها نیز همواره از دغدغه متولیان این صنعت بوده است (۳). لذا ترکیبات ضدعفونی‌کننده غیردارویی می‌تواند یکی از راه‌حلهای باشد (۴).

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی شایع در اکثر مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در سالهای اخیر در بسیاری از کشورهای دنیا، استرپتوکوکوزیس بوده است (۵). مطالعات متعددی در خصوص بیماری‌زایی، شناسایی و جداسازی بیماری از مزارع تکثیر و پرورش قزل‌آلای کشور انجام گرفته (۶)، که بیانگر گسترش بیماری در مزارع قزل‌آلای کشور بوده و تاکنون موجب خسارات زیادی بر این صنعت شده است. استرپتوکوکوزیس، زیان‌های اقتصادی فراوانی را به صنعت آبی‌پروری کشور وارد کرده است (۴). امروزه، استفاده از نانو تکنولوژی و محصولات نانو در صنایع مختلف، از جمله ضدعفونی‌کننده‌ها، به‌طور وسیعی در حال گسترش است (۷). نانوذرات‌ها، رایج‌ترین مواد در علم و فناوری نانو بوده که خواص جالب توجه آنها باعث شده تا

کاربردهای بسیار متنوعی در صنایع شیمیایی، پزشکی و دارویی شیلات و کشاورزی داشته باشند. در بین نانوذرات‌ها، نانوذرات اکسید روی، جزء مهم‌ترین نانوذراتی است که در تصفیه بیولوژیکی آب و فاضلاب مورد استفاده قرار می‌گیرد. یک نانوذره، ذره‌ای است که ابعاد آن در حدود ۱۰۰-۱ نانومتر باشد. نانوذره اکسید روی یکی از موادی است که به‌علت پتانسیل بالا در کاربردهای مختلف در دو دهه اخیر بسیار مورد توجه بوده (۸)، و به‌عنوان یکی از پرکاربردترین نانوذرات‌ها، برای مقابله با باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت استفاده می‌شود (۹). درعین حال، این ترکیب علاوه بر خاصیت ضدباکتریایی، به‌عنوان یک عامل ضدقارچی نیز کاربرد دارد (۱۰). تحقیقات زیادی روی این نانوذره انجام شده است، Atmaca و همکاران (سال ۱۹۹۸)، اثر ضد میکروبی اکسید روی علیه ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و سودوموناس آئروژینوزا در محیط MHB (مولر هیتون براث) را مورد بررسی قرار دادند. براساس نتایج این تحقیق، اکسید روی دارای خاصیت ضدباکتریایی بالایی بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس نسبت به سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد (۱۱). در مطالعه‌ای دیگر، این ترکیب رشد اشرشیاکلی و سالمونلا را مهار کرده و غلظت ذرات و اندازه ذرات این ترکیب نیز در میزان مهار رشد میکروارگانیسم‌ها مؤثر بوده است (۱۲). نانوذرات اکسید روی و اکسید مس قادر به حذف ۹۹/۵-۹۰/۶٪ از آلاینده‌های میکروبی هستند (۱۳) در مطالعه دیگری مشخص گردید نانوذرات اکسید مس قادر به نابود کردن ۹۳٪ باکتری اشرشیاکلی می‌باشد (۱۴). در طی مطالعات انجام شده، غلظت بازدارنده رشد، در حدود ۵۰٪ از باکتری‌های اشرشیاکلی در غلظت ۱۰۰ppm از نانوذرات اکسید روی به دست آمده است (۱۵).

## روش بررسی

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان طی سال ۱۳۹۳ انجام شد. ابتدا پودر پیش‌ساز استات روی از شرکت Merck تهیه گردید و برای سنتز نانوذره اکسید روی مورد استفاده قرار گرفت.

با استفاده از غلظت‌های سریالی، سوسپانسیون حاوی نانوذره اکسید روی به ترتیب با غلظت‌های ۳۱/۲، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. ۵۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌های مذکور بر روی دیسک‌های کاغذی با قطر ۷ میلی‌متر اضافه شد که بدین ترتیب دیسک حاوی ماده مؤثره ۰/۲، ۰/۴، ۰/۷، ۱/۵، ۳/۷، تهیه و در گروه شاهد نیز از دیسک بلانک فاقد نانوذره استفاده شد. پس از ۳۰ دقیقه به وسیله پنس استریل، دیسک‌ها با فاصله معین بر روی سطح محیط کشت آگار قرار گرفتند. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و نتایج فعالیت ضد میکروبی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر به وسیله کولیس ثبت گردید. تمام آزمایشها با ۶ تکرار صورت گرفت.

MIC و MBC به روش ماکرودیلوشن بر اساس روش Anukoo و همکاران (سال ۲۰۰۶) انجام شد. در این مطالعه برای تعیین MIC نانوذره، سریال‌های ۲۱ تایی از محیط کشت نوترینت برات تهیه گردید که از ۱۰ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف نانوذره، ۱۰ لوله به عنوان کنترل مثبت و ۱ لوله به عنوان کنترل منفی استفاده شد. هر لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت نوترینت برات بود، برای وارد کردن نانوذره اکسیدروی، یک میلی‌لیتر از استوک محلول نانوذره (به مقدار ۱۲۳ میلی‌گرم بر لیتر نانوذره) به لوله اول وارد شد و از آن سریال‌های ۱/۶ رقت، تهیه و تا لوله دهم انجام گرفت (۱۸). برای کنترل مثبت، ۱۰ لوله در نظر گرفته شد که حاوی نانوذره، فاقد باکتری و لوله شاهد منفی، فاقد نانوذره و حاوی باکتری بود. بعد از کشت، تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. بعد از طی این مدت زمان (۲۴ ساعت)، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم‌های تلقیح‌شده به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتری، بررسی و بعد از مقایسه آن با لوله‌های شاهد، MIC نانوذره اکسید روی بر اساس کاهش رشد باکتری مشخص گردید. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی این ترکیب، مقدار ۱۰ میکرولیتر از لوله MIC و سایر لوله‌های فاقد کدورت برداشته و در محیط نوترینت آگار کشت داده شد و پس از گذشت زمان لازم (۲۴ ساعت)، شمارش کلنی انجام گرفت و MBC تعیین گردید. کمترین غلظتی که در آن رشدی مشاهده نشده یا به عبارتی، کمترین غلظتی که

سپس ۵ گرم استات روی با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه در ارلن ریخته شد و در حرارت ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۸-۷ ساعت؛ به نحوی مخلوط گردید تا به یک پنجم حجم اولیه برسد (محلول به دست آمده محلول کلونیدی بود). در ادامه، به مدت ۱۲ ساعت در فور با دمای  $100 \pm 5$  درجه سانتیگراد قرار گرفت تا به تدریج خشک شود. سپس در کوره الکتریکی در دمای  $300 \pm 5$  درجه سانتیگراد به مدت ۲۴-۱۲ ساعت قرار گرفت تا کریستال‌ها کامل شوند (۱۶). رقت‌های ۳۰-۵۰۰ میکرولیتر از محلول کلونیدی اکسید روی در آب مقطر تهیه و با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتری استریل گردید (۱۶). سوبه‌های باکتریایی مورد استفاده در این بررسی شامل باکتری گرم منفی اشرشیاکلی و باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی بود. باکتری استرپتوکوکوس اینیایی از ایزوله‌های لیوفلیزه شده باکتریایی دانشکده شیلات و محیط زیست تهیه گردید. این باکتری قبلاً از بیماری ماهیان قزل‌آلا در استان گلستان جداسازی و در سطح گونه با روش PCR تأیید شده بود. باکتری گرم منفی اشرشیاکلی به صورت لیوفلیزه با کد شناسایی PTCC1399 از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید. پس از پاساژ دادن، سوبه‌های استاندارد باکتری‌ها روی محیط کشت اختصاصی، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد گذاشته شدند، و پس از طی مدت انکوباسیون، از پاساژ سوم نمونه باکتری‌ها، برای تهیه سوسپانسیون باکتری استفاده شد.

برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی، ۲۴ ساعت پس از کشت اولیه، باکتری‌ها از سطح محیط کشت جمع‌آوری و در یک لوله آزمایش استریل (حاوی ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل)، کاملاً مخلوط شدند تا سوسپانسیون یکنواختی برای هر کدام از باکتری‌های مورد مطالعه حاصل شود. سپس لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. در ادامه، از لوله‌ها رقت سریالی تهیه گردید تا کدورتی مشابه لوله استاندارد  $0.5 \times 10^8$  مک‌فارلند ایجاد شود. این سوسپانسیون معادل  $1.5 \times 10^8$  باکتری در نظر گرفته شد. به منظور مشاهده فعالیت ضدباکتریایی این ترکیب، با استفاده از روش انتشار دیسک (۱۷)، از تمام سوبه‌های باکتریایی، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مذکور بر سطح محیط کشت نوترینت آگار به صورت یکنواخت پخش شد.

میکروگرم بر میلی لیتر)، اثر بازدارندگی بر دو باکتری داشت و اختلاف بین آنها معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). خاصیت ضدباکتریایی نانوذره اکسید روی بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نسبت به باکتری اشرشیاکلی بیشتر بود. بیشترین هاله عدم رشد مربوط به سوسپانسیون این ترکیب با غلظت  $3/7$  میکروگرم بر میلی لیتر و کمترین هاله رشد مربوط به ترکیب با غلظت  $0/2$  میکروگرم بر میلی لیتر بود. هیچ هاله‌ای در اطراف دیسک شاهد مشاهده نشد (جدول و شکل شماره ۱).

تعداد باکتری‌ها از یک هزارم تعداد اولیه کمتر باشد، به عنوان MBC در نظر گرفته می‌شود (۱۹). این آزمون با ۳ تکرار صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (جهت مقایسه میانگین‌ها) و آزمون دانکن (جهت بررسی اختلاف بین میانگین‌ها) در سطح  $p < 0.05$  استفاده گردید.

## یافته‌ها

نانوذره اکسید روی در ۵ غلظت ( $0/2$ ،  $0/4$ ،  $0/7$ ،  $1/5$ ،  $3/7$ )

جدول: تأثیر نانوذره اکسید روی بر روی باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و اشرشیاکلی، بر اساس قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر

شاهد	غلظت نانوذره (میکروگرم بر میلی لیتر)					باکتری
	$3/7$	$1/5$	$0/77$	$0/4$	$0/2$	
-	$28/5 \pm 1/87^a$	$23 \pm 1/78^b$	$13/83 \pm 2/1^c$	$9 \pm 0/89^d$	$5 \pm 1/26^e$	استرپتوکوکوس اینیایی
-	$22/56 \pm 0/65^a$	$19 \pm 1/74^b$	$12/50 \pm 1/23^c$	$8/5 \pm 1/20^d$	$4/5 \pm 1/28^e$	اشرشیاکلی

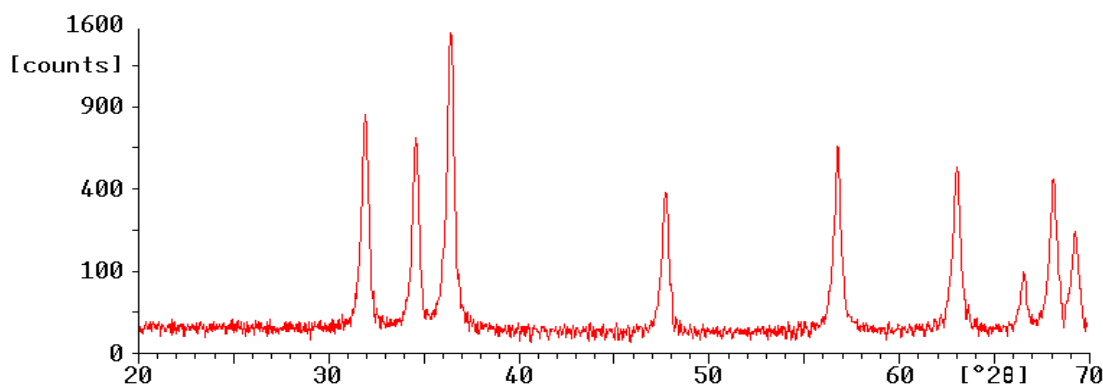
شاهد: دیسک آغشته به آب مقطر، \* (-): عدم مشاهده هاله، \* حروف مختلف در ردیف‌های افقی، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار است ( $p \leq 0.05$ )



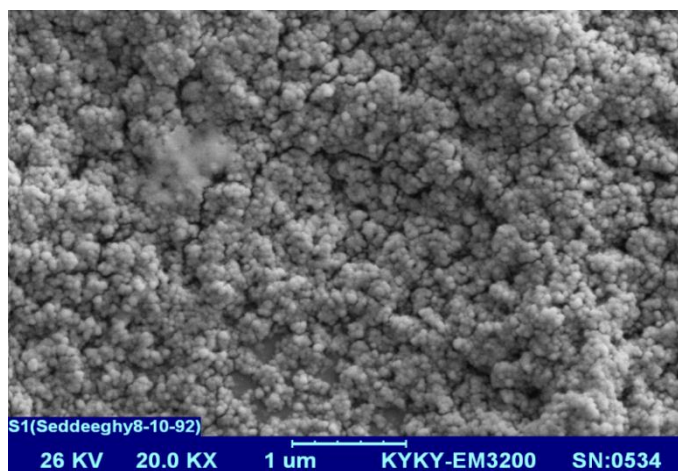
شکل شماره ۱: تست تعیین حساسیت با روش دیسک (شکل سمت راست باکتری اشرشیاکلی، شکل سمت چپ باکتری استرپتوکوکوس اینیایی)

حساسیت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی،  $0/15$  میکروگرم بر میلی لیتر و بر باکتری اشرشیاکلی،  $0/95$  میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه گردید. حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) این ماده بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی،  $0/95$  میکروگرم بر میلی لیتر و بر باکتری اشرشیاکلی،  $0/6$  میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. این نتایج نشان می‌دهد

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) این ماده بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی،  $0/15$  میکروگرم بر میلی لیتر و بر باکتری اشرشیاکلی،  $0/95$  میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه گردید. حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) این ماده بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی،  $0/95$  میکروگرم بر میلی لیتر و بر باکتری اشرشیاکلی،  $0/6$  میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. این نتایج نشان می‌دهد



نمودار: شمای XRD از نانوذره ZnO



شکل شماره ۲: میکروسکوپ الکترونی اسکیننگ روشی از نانوذره ZnO

## بحث

در مطالعه حاضر، نانوذره اکسید روی دارای خاصیت ضدباکتریایی قابل قبول و مناسبی در باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی و اشرشیاکلی بوده است و در طی این بررسی، با افزایش غلظت محلول کلونیدی نانوذره، فعالیت ضدباکتریایی افزایش یافت. اثرات ضدباکتریایی اکسید روی در بررسی‌های مختلفی مورد ارزیابی قرار گرفته است. آزمایش‌های باکتریولوژیک نشان داده‌اند اثرات باکتری‌کشی نانوذرات اکسید روی بیشتر از ذرات پودر اکسید روی بوده و با کاهش ابعاد ذرات اکسید روی، فعالیت باکتری‌کشی آنها نیز افزایش می‌یابد (۲۰). در مطالعه Khani و همکاران (سال ۲۰۱۱) نشان داده شد با استفاده از نانوذرات می‌توان رشد باکتری‌های بیماری‌زایی چون شیگلا دیستتری را مهار کرد (۲۱). براساس این بررسی، این ماده می‌تواند به‌عنوان یک ضدعفونی‌کننده مناسب مورد استفاده قرار گیرد.

در صنعت پرورش ماهیان، همواره پیشگیری و کنترل پاتوژن‌ها، آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر از درمان بوده است. به‌همین دلیل استفاده از ضدعفونی‌کننده‌ها برای کنترل جمعیت باکتری‌های پاتوژن و فرصت‌طلب، به‌خصوص در زمان شیوع بیماری در منطقه، امری معمول است. اشرشیاکلی یکی از باکتری‌هایی است که به لحاظ بهداشت انسانی و سلامت مصرف‌کنندگان، همواره مدنظر بوده است. این باکتری قادر به تولید آنزیم‌های بتالاکتازهای متنوع بوده و عامل بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی همانند سپتیسمی، گاستروانتریت، مننژیت نوزاد و به‌خصوص عفونت‌های ادراری می‌باشد (۲۲) در عین حال، این باکتری پتانسیل نسبی بالایی را برای ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد. به‌عنوان مثال در سال ۲۰۰۲ در ایالات متحده، سویه مقاوم به آمپی‌سیلین و سیپروفلوکساسین گزارش گردید (۲۳).

باکتریایی استفاده کرد. علاوه بر خاصیت ضدباکتریایی، خواص قارچ کشی نیز برای این ماده بیان شده است به عنوان مثال، Hosseini و همکاران (سال ۲۰۱۳)، اثر ضدقارچی نانوذره اکسیدروی را بر مهار رشد سویه استاندارد *کاندیدا آلیکنس* با روش میکرو برات دایلویشن در مقایسه با داروی فلوکونازول بررسی کردند و محدوده MIC برای این قارچ را بین ۲۹۶-۱/۰۱۳ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه کردند. همچنین در این بررسی از نانوذره اکسید روی به عنوان گزینه مناسب برای حذف *کاندیدا آلیکنس* در حیطه پزشکی، به ویژه در ارتباط با وسایل پزشکی استفاده شد (۱۱). در بررسی دیگری، Darabi و همکاران (سال ۲۰۱۲)، اثر ضدقارچی نانوذره اکسید روی بر مهار رشد بیوفیلم سویه استاندارد *کاندیدا آلیکنس* در کاتتر را بررسی کردند و MIC این ماده را برای قارچ مذکور، ۱/۰۲۷ میکروگرم بر میلی لیتر در کاتتر اعلام کردند (۲۸).

نتیجه بررسی حاضر نیز حاکی از این امر است که نانوذره اکسیدروی می تواند به عنوان یک ضدعفونی کننده مناسب در درمان آب پرورش ماهیان و کنترل جمعیت برخی باکتری ها مورد استفاده قرار گیرد.

### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد نانوذره اکسید روی، اثر ضدباکتریایی مناسبی بر باکتری های *استرپتوکوکوس اینیایی* و *اشرشیاکلی* دارد. بنابراین، می تواند به عنوان گزینه مناسبی برای ضدعفونی کردن محیط آکواریوم و یا درمان محیط های آبی مورد استفاده قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه علوم کشاورزی، منابع طبیعی گرگان و ستاد ویژه توسعه فناوری نانو به خاطر پرداخت هزینه های پروژه تحقیقاتی (کد ۷۸۹۳۴)، همچنین از کارشناس محترم آزمایشگاه شیمی، آقای مهندس نعیمی کمال تشکر و قدردانی را داریم.

باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* نیز از مهم ترین باکتری های پاتوژن و آسیب رسان در صنعت آبی پروری، به خصوص ماهیان سردابی است؛ به گونه ای که سالانه میلیون ها ریال خسارت در اثر آلودگی به این باکتری به مزارع قزل آلائی کشور وارد می شود که تقریباً از تمام نقاط کشور گزارش شده است (۴). بنابراین، این باکتری عمده ترین عامل بیماری *استرپتوکوکوزیس* در مزارع ماهیان مختلف در دنیا بوده که شرایط بد محیطی را به خوبی تحمل می کند و موارد بیماری زایی آن در انسان نیز گزارش شده است (۲۴). به همین دلیل کنترل جمعیت باکتری های نام برده در محیط های آبی بسیار مفید و پراهمیت است. خاصیت ضدباکتریایی اکسید روی در باکتری *اشرشیاکلی* در برخی گزارشها پیشین به اثبات رسیده است (۲۵، ۱۰)، اما در رابطه با خاصیت باکتری کشی این ماده در باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی*، اطلاعی در دست نیست، لذا در مطالعه حاضر مشخص گردید نانوذره اکسید روی خاصیت باکتری کشی بالاتری برای باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* در مقایسه با باکتری *اشرشیاکلی* دارد؛ به گونه ای که نتایج نشان داده است میزان MIC و MBC ثبت شده برای *استرپتوکوکوس اینیایی*، پایین تر از مقادیر ثبت شده برای *اشرشیاکلی* می باشد. دلیل این تفاوت را شاید بتوان مربوط به تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت دانست؛ زیرا مکانسیم عمل این ترکیب همانند سایر نانوذرات بوده و از طریق تخریب دیواره باکتری نیز عمل می کند (۸)، اما مکانسیم اصلی تأثیر نانوذرات بر روی باکتری ها از طریق آسیب به DNA، پروتئین و تخریب دیواره سلولی است (۲۶، ۲۰). در مجموع، نانوذره اکسید روی (ZnO) می تواند به عنوان یکی از کاربردی ترین ضدعفونی کننده ها در مقیاس صنعتی استفاده شود (۲۷، ۹). در مطالعه حاضر، طبق نتایج تحلیل آنالیز واریانس یک طرفه، با افزایش غلظت نانوذره اکسید روی قطر هاله عدم رشد، به طور معنی داری در سطح  $p < 0.05$  افزایش یافت. بنابراین، می توان در صورت بررسی های زیست محیطی و یا تعیین آستانه سمیت این ماده، در آبیان از دوزهای بالاتر نیز در کنترل بار

**References:**

- Hahm DH, Yeom MJ, Lee EH, Shim I, Lee HJ, Kim HY. Effect of scutellariae radix as a novel antibacterial herb on the ppk (polyphosphate kinase) mutant of Salmonella typhimurium. J Microbiol Biotechnol 2001;11(6):1061-5.
- Moshtaqi B, Nezami SH, Khara H, Pazhand Z, Shenaver Masuleh E, Halajian E, et al. Determining of fatal density of  $\text{KMnO}_4$  and  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  in acipenser persian bordin. Biology Magazine 2009;3(4):67-78.
- Reynolds GH. Environmental regulation of nanotechnology: Some preliminary observations. Environ Law Rep 2001;31(6):10681-8.
- Soltani M, Jamshidi S, Sharifpour I. Streptococcosis caused by Streptococcus iniae in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran: Biophysical characteristics and pathogenesis. Bull Eur Assoc Fish Pathol 2005;25(3):95-106.
- Austin B, Austin DA. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish. 4<sup>th</sup> ed. New York: Springer Pub; 2007.
- Akhlaghi M, Keshavarz M. Occurring Streptococcosis salmon in farms province. Iranian J Vet Res 2002;3(2):183-9.
- Bar-Ilan O, Albrecht RM, Fako VE, Furgeson DY. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. Small 2009;5(16):1897-910.
- Reeves JF, Davies SJ, Dodd NJ, Jha AN. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. Mutat Res 2008;640(1-2):113-22.
- Handy R, von der Kammer F, Lead J, Hassellöv M, Owen R, Crane M. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. Ecotoxicology 2008;17(4):287-314.
- Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Daskalakis N, Jeuken L, Povey M, et al. Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E. Coli. J Nanopart Res 2010;12(5):1625-36.
- Gül K, Çiçek R. The effect of zinc on microbial growth. Tr J Med Sci 1998;28(1998):595-7.
- Lara HH, Ayala-Núñez NV, Turrent LdCI, Padilla CR. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. World J Microbiol Biotechnol 2010;26(4):615-21.
- Mortimer M, Kasemets K, Kahru A. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa Tetrahymena thermophila. Toxicology 2010;269(2-3):182-9.
- Raffi M, Mehrwan S, Bhatti TM, Akhter JI, Hameed A, Yawar W, et al. Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against Escherichia coli. Ann Microbiol 2010;60(1):75-80.
- Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ , and ZnO water suspensions. Water Res 2006;40(19):3527-32.
- Hosseini SS, Mohammadi SH, Joshagani HR, Eskandari M. Colorimetric MTT assessment of antifungal activity of ZnO nanowires against candida dubliensis bioflm. Jondishapur Med Sci 2013;12(1):69-80.
- Hellio C, Pons AM, Beaupoil C, Bourgougnon N, Le Gal Y. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. Int J Antimicrob Agents 2002;20(3):214-9.
- Anuko U. Antimicrobial susceptibility test and assay, Clinical microbiology reviews. AMS Chiang Mai University; 2006.
- Ernst JE. Antifungal agents (Methods in Molecular Medicine). New York: Humana Press; 2005. p. 9.
- Padmavathy N, Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. Sci Technol Adv Mater 2008;9(3):035004.

21. Hosseinkhani P, Zand AM, Imani S, Rezayi M, Rezaei Zarchi S. Determining the antibacterial effect of ZnO nanoparticle against the pathogenic bacterium, *Shigella dysenteriae* (type 1). *Int J Nano Dimens* 2011;7(4):279-85.
22. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(4):657-86.
23. Karlowsky JA, Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Sahn DF, Volturo GA. Prevalence of antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2004;3:7.
24. Agnew W, Barnes AC. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Vet Microbiol* 2007;122(1-2):1-15.
25. Naddafi K, Zare MR, Younesian M, Almohammadi M, Rastkari N, Mousavi N. Bioassay for toxicity assessment of Zinc Oxide and titanium oxideto *Escherichia Coli* ATCC 35218 and *Staphylococcus aureus* ATCC25923 bacteria. *Iranian J Health Environ* 2011;4(2):171-80.
26. Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier H-C, Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 2008;71(7):1308-16.
27. Ostrowski AD, Martin T, Conti J, Hurt I, Harthorn BH. Nanotoxicology: Characterizing the scientific literature, 2000–2007. *J Nanopart Res* 2009;11(2):251-57.
28. Darabi N, Roudbar Mohammadi Sh, Naderi Manesh H, Mostafai A, Mahmood Vahidi M. Antifungal effect of Zinc oxide nano\_particlees of the standard strains of *Candida albicans* biofilm growth on catheters. *J Army Univ Med Sci* 2012;10(3):207-12. [Full Text in Persian]



## An Investigation of Antibacterial Activity of ZnO Nanoparticle on *Streptococcus iniae* and *Escheria coli*

Parvaneh Mohammadbeigi<sup>1\*</sup>, Mohammad Sodagar<sup>1</sup>, Mohammad Mazandarani<sup>1</sup>, Seyedeh Sedigheh Hoseini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Fisheries & Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>2</sup>Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

**\*Corresponding Author:**

**Parvaneh Mohammadbeigi**, Faculty of Fisheries & Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.

Email:  
parvanemohammadbeigi68@gmail.com

Received: 9 Aug, 2015

Accepted: 16 Sep, 2015

### Abstract

**Background and Objectives:** In recent years, in order to prevent excessive use of antibiotics, disinfectant agents have gained particular significance. There are several reports on the antimicrobial effect of ZnO on Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. In this study, the antibacterial effects of ZnO nanoparticles on Gram-negative bacterium *Escherichia coli* (because of importance of human health) and Gram-positive bacterium *Streptococcus iniae* (because of high pathogenicity in fishes), have been investigated.

**Methods:** In this study, minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum inhibitory concentration (MIC) of this substance were determined using standard liquid dilution and disk diffusion methods for Gram-positive strain (*S. iniae*) and Gram-negative strain (*E. coli*) have calculated according to. Data analysis was performed using one-way ANOVA and Duncan tests at the level of  $p < 0/05$ .

**Results:** According to the results of this study, MBC values of ZnO nanoparticle for *S. iniae* and *E. coli* bacteria were calculated to be 0.095 and 0.6 $\mu$ g/ml, respectively, and MIC values for *S. iniae* and *E. coli* were calculated 0.015, 0.095 $\mu$ g/ml, respectively.

**Conclusion:** The Results of this study showed that ZnO nanoparticle has acceptable antibacterial and bactericidal effects on *S. iniae* and *E. coli* bacteria, and can be used as an antibacterial agent in aqueous environments.

**Keywords:** ZnO nano-particle, *Streptococcus*; *Escherichia coli*; Anti-bacterial agents.