

تأثیر نانو ذرات اکسید روی بر کینتیک مرگ باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی

ادریس حسین زاده (MSc)^۱، محمدرضا سمرقندی (PhD)^۲، محمدیوسف علیخانی (PhD)^{۳*}، قربان عسگری (PhD)^۴

قدرت اله روشنایی (PhD)^۴

۱- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

۲- مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

۳- گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان

۴- گروه آمار زیستی دانشگاه علوم پزشکی همدان

دریافت: ۹۰/۷/۲۳، اصلاح: ۹۰/۱۱/۱۹، پذیرش: ۹۱/۲/۱۳

خلاصه

سابقه و هدف: عفونت‌های بیمارستانی یکی از مشکلات عدیده در سراسر دنیا بوده و کنترل باکتریها به خصوص در بیمارستانها یک چالش جدی می‌باشد. لذا این مطالعه به منظور بررسی تأثیر سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی بر کینتیک مرگ باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی از نانو ذرات اکسید روی تجاری، در محیط کشت مایع سوسپانسیون تهیه شد و پس از آماده سازی سوبه‌های استاندارد اشریشیاکلای و پseudomonas آئروژینوزا از باکتریهای گرم منفی، استافیلوکوک اورئوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس از باکتریهای گرم مثبت، تأثیر دو غلظت یک و دو برابر غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) نانوذرات اکسید روی بر کینتیک مرگ باکتریها در زمانها صفر تا ۳۶۰ دقیقه بررسی و روند مرگ باکتریها با غلظت نیم مک فارلند (۱۰۸Cfu/ml) در این سوسپانسیون با استفاده از کینتیک مرگ درجه اول ارزیابی شد.

یافته ها: تأثیر سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی (ZnO) بر روی کینتیک مرگ باکتریها نشان داد که نسبت بقا با افزایش غلظت نانو ذرات در همه سوبه‌ها کاهش می‌یابد. با ترسیم حالت لگاریتمی نسبت بقای باکتریها در مقابل زمان تماس، تعداد همه گونه های باکتریائی مورد آزمایش نسبت به زمان به طور خطی کاهش یافت و ثابت سرعت مرگ ($k(s^{-1})$) با افزایش زمان تماس و غلظت سوسپانسیون نانوذرات از یک به دو برابر MIC افزایش نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که میزان کاهش جمعیت اشریشیا کلای طی زمان با سرعت بالاتری نسبت به سایر گونه ها در غلظت $2 \times MIC$ صورت می‌گیرد. بنابراین می توان از نانو ذرات اکسید روی می‌تواند به عنوان یک گندزدای موثر جهت کنترل باکتریهای گرم منفی از جمله اشریشیا کلای استفاده کرد.

واژه های کلیدی: اکسید روی، کینتیک، فعالیت ضد باکتریایی، ثابت سرعت مرگ.

مقدمه

به موازات توسعه سریع زندگی بشری، کنترل اثرات مضر میکروارگانیسم‌ها هم امری غیر قابل اجتناب شده است (۱). طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها به طور همزمان در تعادل با محیط زندگی انسانها می‌باشند، اما رشد سریع و کنترل نشده آنها می‌تواند منجر به بروز مشکلات جدی شود. عفونت‌های بیمارستانی یکی از مشکلات عدیده در سراسر دنیا بوده و کنترل گسترش این عفونت‌ها به خصوص در بیمارستان‌ها یک چالش موجود می‌باشد (۱و۲). عوامل مهم عفونت های بیمارستانی اعضاء خانواده انتروباکتریاسه از جمله اشریشیا کلای و کلبسیلا، گونه های pseudomonas، استافیلوکوکوس، اسمنتوباکتر و انتروکوکها می باشند. استافیلوکوکها از جمله عوامل بیماری‌زای مهم برای انسان محسوب شده و موجب بروز گستره وسیعی از بیماریهای خطرناک

سیستمیک (عفونتهای پوستی، بافتهای نرم، استخوانها و مجاری ادراری و عفونتهای فرصت طلب) در انسان می‌شوند. گونه‌هایی که بیشتر با بیماریهای انسانی در ارتباط هستند شامل استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس می‌باشند. یکی از عوامل مهم عفونتهای بیمارستانی سوبه های مقاوم به متیسیلین استافیلوکوکوس اورئوس (MRSA) است. خانواده انتروباکتریاسه باسیلهای گرم منفی هستند که در همه جا وجود داشته و در خاک، آب و سبزیجات یافت می‌شوند، جزء فلور طبیعی روده حیوانات و انسان می‌باشند. یکی از گونه‌های بیماری‌زای این خانواده، اشریشیاکلای است. این باکتری عامل بیماریهایی چون باکتری، عفونتهای مجاری ادراری، گاستروآنتریت، مننژیت نوزادان و عفونتهای درون شکمی است. اعضای جنس pseudomonas ارگانیسم‌هایی هستند که در خاک، مواد آلی در حال فساد، گیاهان و آب یافت می‌شوند. این ارگانیسمها در محیطهای مرطوب بیمارستانی، همچون غذا، ظرفشویی، دستشویی، توالت، وسایل تمیز کننده

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجوی ادریس حسین زاده دانشجو رشته بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد.

* مسئول مقاله:

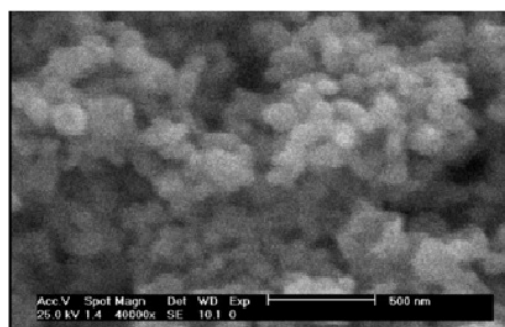
آدرس: همدان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه میکروشناسی پزشکی، تلفن: ۰۸۱۱-۸۳۸۰۰۲۵ و ۲۶

e-mail: alikhani43@yahoo.com

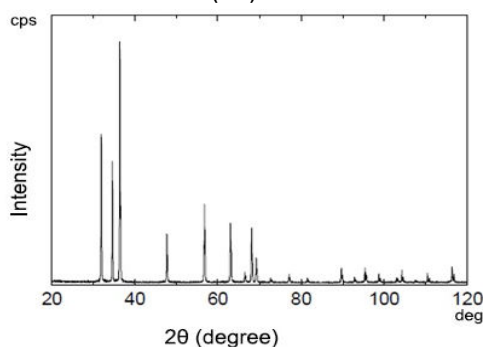
باکتری در تماس با آن می‌باشد. لذا این مطالعه به منظور بررسی تاثیر سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی بر کینتیک مرگ باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روشها

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه و بر روی سویه‌های استاندارد باکتریایی انجام شد. کلیه مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت مرک آلمان خریداری گردید. **تهیه نانو ذرات:** نانو ذرات اکسید روی تجاری برای بررسی فعالیت ضد میکروبی با درجه خلوص $>99\%$ 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 اندازه نانو ذرات، از سوی شرکت سازنده بررسی و تعیین گردید (تصویر ۱). بر اساس نتایج SEM، نانو ذرات تقریباً دارای شکل کروی بوده و قطر نانوذرات اکسید روی در حدود ۲۰ نانومتر بدست آمد. همچنین میزان سطح ویژه نانو ذرات با اندازه گیری ایزوترم جذب مولکول‌های گاز نیتروژن در دمای 196°C – 196°C (BET; BELSORPmini) $90\text{m}^2/\text{g}$ بوده است.



(الف)



(ب)

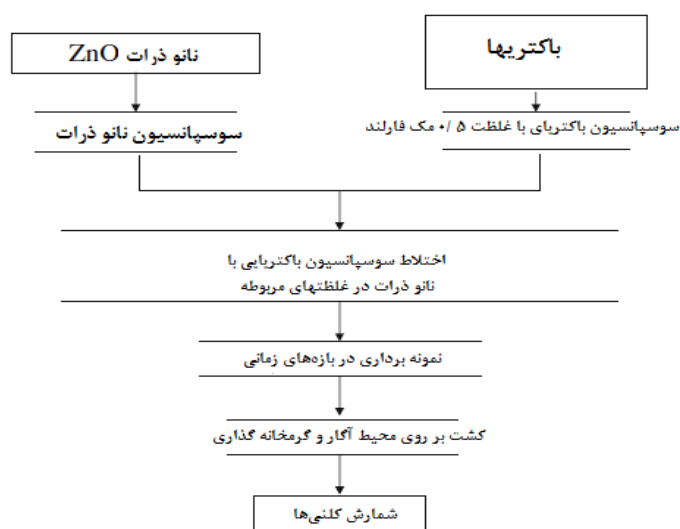
تصویر ۱: عکسهای XRD (الف) و SEM (ب) نانو ذره اکسید روی مورد استفاده

آماده سازی سوسپانسیون نانو ذرات: برای تهیه محلول استوک نانوذرات، ۱۰ گرم نانو ذره در یک لیتر محیط کشت استریل مولر هیتون براث به صورت سوسپانسیون در آورده شد و برای پراکنده شدن مناسب آنها از دستگاه اولتراسونیک (PARSONIC 7500s, 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 (۱۲).

کف زمین، تجهیزات درمانی سیستم تنفسی و دیالیز و حتی محلولهای ضد عفونی کننده وجود دارند. این ارگاناسمها قادر هستند از بسیاری از مواد آلی بعنوان منبع کربن و نیتروژن استفاده کنند و حتی قادر به رشد در آب مقطر هم می‌باشند. اعضاء جنس پseudomonas دارای بسیاری از فاکتورهای ساختاری، آنزیمها و توکسینها می‌باشند که سبب ویرولاسنس و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها و گندزداها شده است. پseudomonas آئروژینوزا شایعترین گونه این جنس بوده که عامل عفونتهای ریوی، عفونتهای اولیه پوستی، عفونتهای مجاری ادراری، عفونت گوش و عفونتهای فرصت طلب می‌باشد (۳). برخی از انواع آنتی باکتریها و گندزداها التهاب آور بوده و در نتیجه تلاش برای یافتن روشهای جدید، ایمن و ارزان قیمت گندزدایی افزایش یافته است. در تحقیقات انجام شده برخی از اکسیدهای سرامیکی، اکسید کلسیم، اکسید منیزیم و همچنین بسیاری از اکسید نانو ذرات چون نانو ذرات اکسید روی فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی از خود نشان داده‌اند (۴-۸). ویژگی ضد میکروبی نانو ذرات توجه محققین و صاحبان صنایع را به خود جلب کرده است که از این مواد به عنوان جایگزین گندزداهای آلی چون ترکیبات چهارتایی آمونیوم و ترکیبات کلرینه جهت کنترل باکتریهای مضر در محیطهایی چون بیمارستانها استفاده می‌شود (۴). اکسید روی در شرایط متعارف دارای ساختار هگزگونال (ورتسایت) می‌باشد. هر یون Zn به وسیله چهار یون اکسیژن و هر یون O به وسیله چهار یون Zn بصورت چهار وجهی احاطه شده‌اند این هماهنگی چهار وجهی باعث ایجاد تقارن قطبی در طول محورهایی شش گوش می‌شود که باعث خواص پیزوالکتریکی و پولاریزاسیون خود بخودی این ماده شده و همچنین یک فاکتور کلیدی در رشد بلور است (۸و۹).

اکسید روی دارای فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی در محدوده pH طبیعی (pH=۷) می‌باشد و یکی از عناصر معدنی ضروری برای انسان محسوب می‌شود، محققین ویژگی ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی، ایمن بودن آن برای انسان و عدم آلودگی محیط در اثر استفاده از آن را به عنوان عامل ضد میکروبی مهم و مورد علاقه ذکر کرده‌اند (۴). Sawai و همکارانش در مطالعه‌ای کینتیک مرگ باکتریهای استفیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلای در تماس با محلول پودر آهک حرارت داده شده را بررسی کردند که برای مطالعه کینتیک از فرم درجه اول آن استفاده شده است و تغییرات غلظت پودر آهک و زمان تماس، متغیرهای اصلی این مطالعه بوده‌اند (۱۰). این محققین در مطالعه مشابه دیگری که بر روی کینتیک مرگ باکتریهای در تماس با محلول CaO انجام دادند اثر تغییر غلظت و زمان تماس بر نسبت بقای سویه‌های استاندارد را مطالعه کرده و ثابت سرعت مرگ را با استفاده از رابطه فرم لگاریتمی نسبت بقا در مقابل زمان تماس محاسبه نمودند. همچنین این محققین فرم درجه اول کینتیک را به دلیل وسیع الطیف بودن، سهولت استفاده و نشان دهنده حالت خطی مرگ باکتریهای در تماس با عامل ضد میکروبی به عنوان بهترین فرم کینتیکی جهت تجزیه و تحلیل کینتیک مرگ باکتریها معرفی کرده‌اند (۱۱).

با توجه به ایمن بودن نانوذرات اکسید روی برای انسان و محیط زیست، همواره استفاده از آن برای اهداف گندزدایی رو به افزایش است و همچنین بر اساس منابع اطلاعاتی در دسترس تا بحال هیچگونه مطالعه کینتیکی بر روی باکتریهای در تماس با این نانوذره گزارش نشده است. در کاربردهای صنعتی مواد ضد میکروبی، مدلهای عددی و پارامترهای کمی جهت استفاده از نانو ذرات برای استفاده خاص، آگاهی از اثر نانوذره بر باکتریهای در تماس با آن ضروری است (۱۱): کینتیک مرگ یکی از اهم مدلهای مورد بررسی برای بررسی اثر نانو ذره بر



تصویر ۲: شماتیک مراحل انجام مطالعه کینتیک

یافته ها

در این مطالعه ابتدا غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) برای هر یک از سویه‌های استاندارد باکتریایی مورد استفاده بدست آورده شد. کمترین غلظت مهارتی برای باکتری پseudomonas آئروژینوزا ۱۵۶/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و MIC به صورت مشترک برای اشریشیا کلای و استافیلوکوک اورئوس ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و برای استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۶۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج مربوط به MIC و غلظتهای مورد استفاده برای مطالعات کینتیک سوسپانسیون نانو ذره اکسید روی

سویه‌های مورد بررسی	1xMIC(μgr/ml)	2xMIC(μgr/ml)
اشریشیا کلای ATCC 25922	۱۲۵۰	۲۵۰۰
استافیلوکوک اپیدرمیدیس PTCC 1114	۶۲۵	۱۲۵۰
استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923	۱۲۵۰	۲۵۰۰
پseudomonas آئروژینوزا ATCC27853	۱۵۶/۲۵	۳۱۲/۵

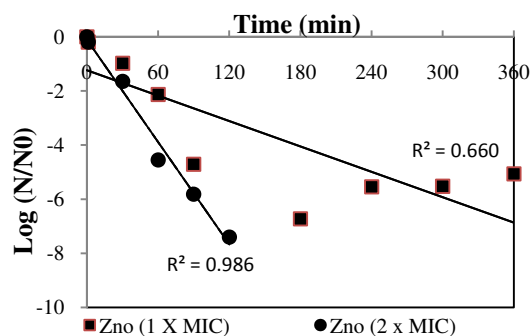
برای بررسی اثر غلظت و زمان تماس بر روی کینتیک مرگ باکتریها از حالت لگاریتمی تعداد باکتریها نسبت به زمان استفاده شد. در هر دو غلظت مورد بررسی با افزایش زمان تماس برای همه باکتریها نسبت بقا کاهش یافت. همچنین با افزایش غلظت نانو ذرات از 1x MIC به 2x MIC نسبت بقای باکتریها کاهش نشان داده است. بیشترین و کمترین مقدار ضریب تعیین (R²) برای غلظت 2x MIC و 1x MIC و برای باکتری اشریشیا کلای وجود داشته است (۰/۹۸۶ در مقابل ۰/۶۶۱). برای همه باکتریها به غیر از pseudomonas آئروژینوزا با افزایش غلظت از 1x MIC به 2x MIC مقدار ضریب تعیین افزایش نشان داده است، بطوریکه برای این باکتری مقدار ضریب تعیین با افزایش غلظت از 1x MIC به 2x MIC از R²=۰/۸۸۳ به R²=۰/۷۲۳ کاهش یافته است (تصاویر ۳ و ۴).

نمونه‌های باکتریایی: باکتریهای مورد استفاده جهت انجام بررسی کینتیک مرگ شامل اشریشیا کلای (ATCC 25922) و pseudomonas آئروژینوزا (ATCC 27853)، از انواع باکتریهای گرم منفی، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (PTCC 1114) از انواع باکتریهای گرم مثبت بودند که از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی تهیه گردیدند.

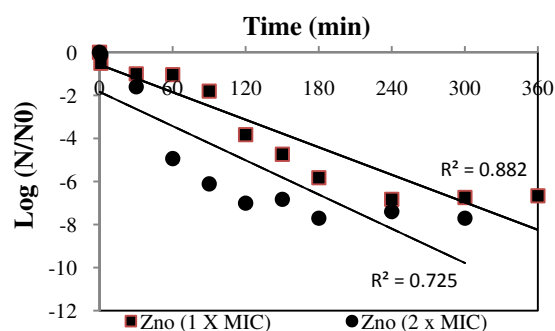
کشت نمونه باکتریهای مورد آزمون: سویه‌های استاندارد باکتریهای مذکور روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه (RAD Production.co) با دمای ۳۷°C نگهداری گردیدند. پس از طی مدت انکوباسیون، از این باکتریها برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی استفاده شد (۱۳ و ۱۴). به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی جهت انجام آزمایشات، ابتدا سلولهای باکتریایی از سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به کمک لوپ استریل جمع آوری و در یک میلی لیتر بافر سالین فسفات- (Phosphate-Buffered-Slain Colony-Forming) (PBS:) یک مک فارلند (۱۰^۸ × ۱/۵ عدد باکتری در هر میلی لیتر) با کدورت نیم وسیله اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش (USA: UNICO-2100) در محدوده طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان جذب در محدوده ۰/۱ - ۰/۰۸ تنظیم شد (۱۵).

آزمایشات کینتیک مرگ باکتریها: در این مطالعه برای بررسی اثر غلظت از دو غلظت مقدار مهار کنندگی رشد (1, 2 x MIC) مربوط به هر باکتری استفاده شد. MIC به عنوان کمترین غلظت یک عامل ضد میکروبی (در حالت منفرد) اطلاق می‌شود که از رشد ظاهری میکروارگانیسم‌های در تماس با آن ممانعت به عمل آورد (۱۶). برای بدست آوردن مقدار MIC از روش کلاسیک تهیه رقتهای متوالی کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاهی (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000) استفاده شد (۱۳). تصویر ۲، روش بررسی کینتیک مرگ باکتریها در تماس با نانو ذرات اکسید روی را نشان می‌دهد. محلول سوسپانسیون باکتریایی به محیط کشت مولر هینتون برات حاوی نانو ذرات با غلظتهای 1, 2 x MIC اضافه شد و سپس در انکوباتور شیکردار (۲۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۷ °C و حداکثر مدت زمان ۲۴ ساعت) گرمخانه گذاری شدند. در زمانهای مورد نظر (صفر تا ۳۶۰ دقیقه) از سوسپانسیون باکتری-نانوذره نمونه برداری شده و بر روی پلیتهای حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند. کلنی‌های شکل گرفته برای هر زمان و باکتری و غلظت (دو غلظت برای هر باکتری) شمارش و ثبت شدند. محاسبه نسبت بقا ($\frac{N}{N_0}$) از تقسیم تعداد کلنی‌ها در زمانهای نمونه برداری (N) بر تعداد کلنی‌ها در زمان قبل از تماس با سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی (N₀) محاسبه شد. برای بررسی کینتیک مرگ باکتریها از کینتیک مرگ درجه اول استفاده شد. شکل کلی این نوع کینتیک بدین صورت می‌باشد (۱۷ و ۱۸):

در این رابطه (k) ثابت میزان مرگ درجه اول، N₀ تعداد کلنی‌های اولیه باکتری، N تعداد کلنی باکتری پس از زمان تماس مورد نظر می‌باشد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری رگرسیون تجزیه و تحلیل شدند. همچنین در تطابق داده‌های آزمایش با مدل کینتیک مرگ، از رگرسیون ساده با متغیر مستقل زمان و ضریب تعیین (جذر آن برابر با ضریب همبستگی است) استفاده شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

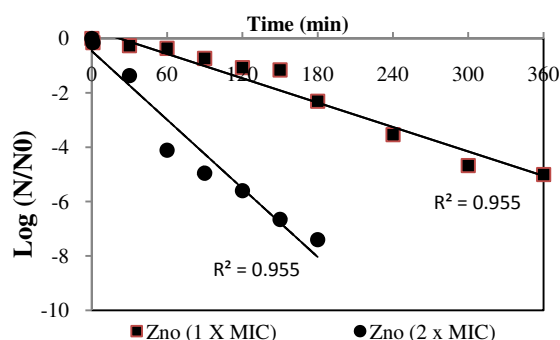


(ب)

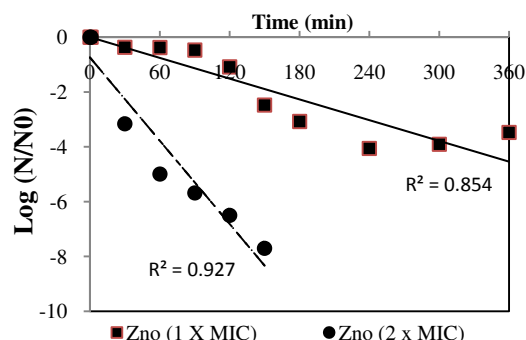


(الف)

شکل ۳: اثر غلظت ۱، ۲ x MIC نانوذرات اکسید روی و زمان تماس بر کینتیک مرگ باکتریهای گرم منفی (الف) اشریشیاکلاهی (ب) پseudomonas آئروژینوزا



(ب)



(الف)

شکل ۴: اثر غلظت ۱، ۲ x MIC نانوذرات اکسید روی و زمان تماس بر کینتیک مرگ باکتریهای گرم مثبت: (الف) استافیلوکوک اپیدرمیدیس (ب) استافیلوکوک اورئوس

جدول ۲: مقادیر بدست آمده برای ثابت سرعت مرگ ($k(s^{-1})$) سویه‌ها برای غلظتهای 1، 2x MIC و زمان تماس صفر تا ۳۶۰ دقیقه

یک برابر غلظت ممانعت کنندگی رشد				دو برابر غلظت ممانعت کنندگی رشد				زمان تماس (دقیقه)
اشریشیاکلی	استافیلوکوک	استافیلوکوک	پseudomonas	اشریشیاکلی	استافیلوکوک	استافیلوکوک	پseudomonas	
اپیدرمیدیس	اورئوس	اپیدرمیدیس	آئروژینوزا	اپیدرمیدیس	اورئوس	اپیدرمیدیس	آئروژینوزا	
۲/۱۶۲	۰/۴۱	۰	۰/۵۸	۰/۲۶	۰/۴۱	۰	۰/۵۸	۱
۸/۸۵۴	۰/۸۳	۱/۳۱	۸/۴۸	۳۸/۲۳	۱۴۳۶/۷	۴۳	۳۵۱۹۸	۳۰
۹/۷۶۷	۱/۳۳	۱/۴	۱۳۴	۸۶۵۷۹	۱۲۷۸۵	۹۷۶۵۵	۳۵۱۹۸	۶۰
۹۱/۶۹	۴/۴۷	۱/۹۷	۵۰۸۹۰	۱/۳×۱۰۶	۹۰۵۷۹	۴۷۶۱۸۹	۶/۵×۱۰۵	۹۰
۶۵۶۴/۱۲	۱۰/۷	۱۱/۲۱	—	۹/۹×۱۰۷	۳۹۳۷۰۰	۳/۱۲×۱۰۶	۲/۵×۱۰۷	۱۲۰
۵۴۶۴۳	۱۳/۴۷	۲۹۶/۴	—	۱×۱۰۸	۴/۵×۱۰۵	۵×۱۰۷	—	۱۵۰
۶۵۷۸۹۴	۲۰۱/۶۷	۱۱۹۴	۵/۲۶×۱۰۶	۵×۱۰۷	۲/۵×۱۰۷	—	—	۱۸۰
۲/۵×۱۰۷	۳۴۲۱/۳۱	۱۱۳۹۲	۳/۴×۱۰۵	۶/۶×۱۰۷	—	—	—	۲۴۰
۵×۱۰۷	۴۷۰۵۸	۸۰۳۴	۳/۳×۱۰۵	۵/۵×۱۰۷	—	—	—	۳۰۰
۴/۵۵×۱۰۷	۹۹۹۹۹	۲۹۷۳	۱/۱۵×۱۰۵	—	—	—	—	۳۶۰

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه پیک‌های حاصل از پراش اشعه ایکس در آزمون XRD بیانگر ساختار شش وجهی نانو ذرات بوده است. در الگوی پراش مقدار شاخص‌های ۱۰۰ و ۱۱۰ از بقیه شاخص‌ها بالاتر بوده است که نشان دهنده دو پلان بلوری

(۱۰۰ و ۱۱۰) در ساختار شش وجهی نانو ذرات اکسید روی مورد استفاده است. به عبارتی دیگر می‌توان نتیجه گرفت که نانو ذرات مورد استفاده در این مطالعه در ساختار شش وجهی خود به خوبی از حالت بلوری (کریستالی) برخوردار بوده است.

دیگر باکتریها با افزایش غلظت نانو ذرات کمتر بوده است که می‌تواند به دلیل مقاومت این باکتری نسبت به نانو ذرات اکسید روی باشد (۱۹).

Sawai و همکارانش در مطالعه‌ای مشابه با بررسی کینتیک مرگ استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلای در تماس با محلول پودر آهک حرارت دیده به این نتیجه رسیدند که مرگ باکتریها از کینتیک درجه اول پیروی کرده و با افزایش غلظت پودر آهک، ثابت سرعت مرگ افزایش می‌یابد (۱۰) که با نتایج مطالعه حاضر کاملاً همخوانی دارد در مطالعه آنها نیز به دلیل رشد مجدد برخی از باکتریها در فواصل زمانی نمونه‌برداری، مقادیر ثابت سرعت مرگ با زمان دارای روند افزایشی ولی نوسانی بوده است. این محققین در مطالعه دیگری که بر روی کینتیک مرگ باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلای در تماس با سوسپانسیون پودر CaO انجام دادند. نتایجی مشابه با نتایج این مطالعه مشاهده کردند که با افزایش زمان تماس و افزایش غلظت CaO همواره نسبت بقای باکتریها کاهش یافته و مرگ باکتریهای از حالت خطی پیروی نموده است (۱۱). با توجه به معنی‌دار بودن مرگ باکتریها با زمان مواجهه، سوبه‌های باکتری و غلظت نانو ذرات در سوسپانسیون می‌توان گفت که اثر ضد میکروبی نانو ذره اکسید روی برای هر سوبه اختصاصی بوده و برای کاربرد نانو ذره اکسید روی جهت کنترل باکتریها، مطالعات اختصاصی برای هر سوبه مورد نیاز است و افزایش زمان تماس و غلظت عامل ضد میکروبی، فاکتورهای موثر برای کاهش تعداد باکتریها می‌باشند.

در این مطالعه آزمایشات بررسی اثر نانو ذرات اکسید روی بر کینتیک مرگ باکتریها، با افزایش غلظت نانو ذره و زمان تماس، نسبت بقای باکتریهای مورد بررسی کاهش یافت. کینتیک مرگ باکتریها کاهش خطی جمعیت باکتریها طی زمان تماس را نشان داد. همچنین نتایج کینتیکی نشان داد میزان کاهش جمعیت اشیریشیا کلای طی زمان با سرعت بالاتری در غلظت 2x MIC صورت می‌گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان و همچنین از آقای مقدم کارشناس آزمایشگاه میکروشناسی بخاطر همکاریهایشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

Yamamoto و همکاران در مطالعه خود مقادیر اندکی ناخالصی گوگرد در بلورهای نانو ذرات اکسید روی تهیه شده با روش شیمیایی گزارش کرده‌اند (۱۸). در مطالعه حاضر به منظور بررسی ناخالصی‌های موجود بر روی بلورهای نانو ذرات اکسید روی، آنالیز عنصری با استفاده از طیف سنجی تفرق انرژی اشعه ایکس (EDX) نیز انجام شد. نتایج حاصل از این آنالیز نشان داد که هیچگونه گوگردی در ترکیب نانو ذرات مورد استفاده در این مطالعه وجود ندارد اما ناخالصی‌هایی چون مس (۳ppm)، منیزیم (۵ppm)، سرب (۹ppm) و کادمیوم (۹ppm) در مقادیر بسیار اندک تشخیص داده شد. لذا با توجه به نتایج آزمون‌های EDX و XRD، ناخالصی‌ها بر روی نتایج ضد میکروبی نانو ذرات بدون تاثیر می‌باشند.

در این مطالعه نسبت بقا با افزایش غلظت نانو ذرات به سرعت کاهش نشان داده است که بیانگر افزایش فعالیت باکتری کشی نانو ذرات در سوسپانسیون، به دلیل افزایش غلظت آنها است. برای همه باکتریها بغیر از پseudomonas آئروژینوزا با افزایش غلظت از 1x MIC به 2x MIC مقدار ضریب تعیین افزایش نشان داده است. بالا بودن مقدار ضریب تعیین در این مدل بیانگر افزایش مرگ باکتریها بصورت خطی در اثر افزایش غلظت و زمان تماس می‌باشد. این نتیجه می‌تواند به سمیت بیشتر در غلظت‌های بالاتر نانو ذرات مرتبط باشد (۳). البته این موضوع نمی‌تواند بیانگر رابطه خطی غلظت-قابلیت ضد میکروبی نانو ذرات باشد زیرا در غلظت‌های بالاتر احتمال ایجاد مقاومت سازگاری در برخی سوبه‌ها وجود دارد که این حالت برای باکتری pseudomonas آئروژینوزا وجود داشته است. همچنین با افزایش زمان تماس به همراه افزایش غلظت نانو ذرات، نسبت بقای باکتریها کاهش یافته است که این حالت با نتایج آمار استنباطی نیز بدست آمد. به عبارتی میزان مرگ باکتریها با افزایش زمان تماس و غلظت نانو ذرات در هر دو گروه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی افزایش یافته است و این مورد می‌تواند به معنی وسیع الطیف بودن ویژگی ضد میکروبی این نانو ذره باشد که با نتایج بدست آمده توسط Ohira و همکاران مطابقت دارد (۴).

در روش شمارش کلنی، زمانی که نسبت بقای باکتریها نسبت به زمان دارای شیب منفی است، می‌توان نتیجه گرفت که نانو ذرات از فعالیت ضد میکروبی قوی برخوردار هستند (۴) بر این اساس شیب مذکور برای همه سوبه‌ها همواره منفی بوده است و با افزایش غلظت میزان شیب تندتر نیز شده است. کاهش شیب نسبت بقا ($\log \frac{N}{N_0}$) در باکتری pseudomonas آئروژینوزا نسبت به

Effect of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles on Death Kinetic of Gram-Negative and Positive Bacterium

E. Hoseinzadeh (MSc)¹, M.R. Samarghandi (PhD)², M.Y. Alikhani (PhD)^{3*},
Gh. Asgari (PhD)², Gh. Roshanaei (PhD)⁴

1. Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran
2. Health Research Center, Faculty of Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
4. Department of Biostatistics, Faculty of Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

J Babol Univ Med Sci; 14(5); Sep 2012; pp: 13-19.

Received: Oct 12th 2011, Revised: Feb 8th 2012, Accepted: May 2nd 2012.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Hospital acquired infections are a major problem worldwide and controlling the spread of bacteria within a hospital is a constant challenge so this study was done to survey the effect of ZnO nanoparticles suspension on death kinetic of gram negative and gram bacteria in vitro.

METHODS: In this experimental study, suspension has been prepared from commercial ZnO nanoparticles in broth medium. After preparing standard strains E. coli ATCC 25922 and P. aeruginosa ATCC 27853 as gram-negative bacteria and S. epidermidis PTCC 1114 and S. aureus ATCC 25923 as gram-positive bacteria, death kinetic study have been evaluated with 1 and 2 times of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and death kinetic study evaluated (at zero to 360 minute of treatment time) using first-order reaction kinetic with 0.5 McFarland standard bacterial suspension (10^8 cfu/ml).

FINDINGS: Effect of ZnO suspension on death kinetic of bacteria showed the survival ratio of bacteria decreased with increasing ZnO concentration. With drawing logarithmic survival ratio and treatment time as ordinate and abscissa, respectively, the population of all strains decreased almost linearly. The apparent death rate constant (k) was found to increase with increasing time and ZnO concentration from 1xMIC to 2xMIC.

CONCLUSION: Base on the results, E. coli population at the treatment time decrease faster than others. Also, the results showed that ZnO could be a highly effective disinfect for controlling of gram negative bacteria especially E. coli.

KEY WORDS: ZnO, Kinetic, Antibacterial activity, Death rate constant.

*Corresponding Author;

Address: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Tel: +98 811 8380025-6

E-mail: alikhani43@yahoo.com

References

1. Ghahremanloo A, Sadeghian A, Bidi R. Effect of three different disinfection materials on alginate disc by immersion and spray methods. *J Babol Univ Med Sci* 2011;13(3):42-9. [in Persian]
2. Kermanshah H, Hashemi Kamangar SS, Arami S, et al. Comparison of antibacterial effect of hydroalcoholic extract of four plants against cariogenic microorganisms by two in vitro methods. *J Babol Univ Med Sci* 2011;13(6):21-9. [in Persian]
3. 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. (MSc thesis) [in Persian]
4. Ohira T, Yamamoto O, Iida Y, Nakagawa ZE. Antibacterial activity of ZnO powder with crystallographic orientation. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(3):1407-12.
5. Fang M, Chen JH, Xu XL, Yang PH, Hildebrand HF. Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27(6):513-7.
6. 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(1):1244-7.
7. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci* 2004;275(1):177-82.
8. He L, Liu Y, Mustapha A, Lin M. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiol Res* 2010;166(3):207-15.
9. Siboni MS, Samadi MT, Yang JK, Lee SM. Photocatalytic reduction of Cr(VI) and Ni(II) in aqueous solution by synthesized nanoparticle ZnO under ultraviolet light irradiation: a kinetic study. *Environ Technol* 2011;32(14):1573-9.
10. Sawai J, Himizu K, Yamamoto O. Kinetics of bacterial death by heated dolomite powder slurry. *Soil Biol Biochem* 2005;37(8):1484-9.
11. Sawai J, Shiga H, Kojima H. Kinetic analysis of death of bacteria in CaO powder slurry. *Int Biodeter Biodegr* 2001;47(1):23-6.
12. Jafari A, Ghane M, Arastoo S. Synergistic antibacterial effects of nano zinc oxide combined with silver nanocrystales. *Afr J Microbiol Res* 2011;5(30):5465-73.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved Guideline M26-A. Wayne, PA, USA: CLSI; 1999. Available at: <http://isoforlab.com/phocadownload/csli/M26-A.pdf>
14. Perilla MJ, Bopp C, Elliott J, et al. Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world: *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Salmonella* serotype Typhi, *Shigella*, and *Vibrio cholerae* (WHO/CDS/CSR/RMD/2003.6) Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003. Available at: apps.who.int/medicinedocs/documents/s16330e/s16330e.pdf.
15. Ruparelia J, Chatterjee A, Duttgupta S, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater* 2008;4(3):707-16.
16. Molana Z, Shahandeh Z. Effect of Garlic (*Allium Sativum*) and Garlic extract on growth inhibition of *Pseudomonas Aeruginosa*. *J Babol Univ Med Sci* 2003;5(3):57-66. [in Persian]
17. Sawai J, Shiga H, Kojima H. Kinetic analysis of the bactericidal action of heated scallop-shell powder. *Int J Food Microbiol* 2001;71(2-3):211-8.
18. Yamamoto O, Sawai J, Sasamoto T. Change in antibacterial characteristics with doping amount of ZnO in MgO-ZnO solid solution. *Int J Inorg Mater* 2000;2(5):451-4.
19. Sawai J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *J Microbiol Methods* 2003;54(2):177-82.