مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره چهاردهم، شمارهٔ ۵، شهریور ۱۳۹۱، صفحه ۱۹-۱۳

تاثیر 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)[۲]،
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 تاثیر 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 سویه‌های استاندارد اشریشیاکلای و پسودوموناس آئروژینوزوا از باکتریهای گرم منفی، استافیلوکوک اورئوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس از باکتریهای گرم مثبت، تاثیر 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: تاثیر سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی (ZnO) بر روی کینتیک مرگ باکتریها نشان داد که نسبت بقا با افزایش غلظت نانو ذرات در همه سویه‌ها 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 2x 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 (۲و۱). عوامل مهم عفونت های بیمارستانی اعضاء خانواده انتروباکتریاسه از جمله اشریشیا کلای و کلبسیلا، گونه های پسودوموناس، استافیلوکوکوس، اسینتوباکتر 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 سویه 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 باکتریمی، عفونتهای مجاری ادراری، گاستروآنتریت، مننژیت نوزادان و عفونتهای درون شکمی است. اعضای جنس پسودوموناس 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 دانشجو ادریس حسین زاده دانشجو رشته بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی همدان می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: همدان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه میکروبشناسی پزشکی، تلفن: ۰۸۱۱-۸۳۸۰۰۲۵و۲۶
e-mail: alikhani43@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.2.6]

کف زمین، تجهیزات درمانی سیستم تنفسی و دیالیز و حتی محلولهای ضد عفونی کننده وجود دارند. این ارگانیسمها 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 پسودوموناس دارای بسیاری از فاکتورهای ساختاری، آنزیمها و توکسینها می‌باشند که سبب ویرولانس و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیکها و گندزداها شده است. پسودوموناس 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 (۸-۴). 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 می شود (۴). اکسید روی در شرایط متعارف دارای ساختار هگزاگونال (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 محورهای شش گوشی می‌شود که باعث خواص پیزوالکتریکی و پولاریزاسیون خود بخودی این ماده شده و همچنین یک فاکتور کلیدی در رشد بلور است (۹و۸).

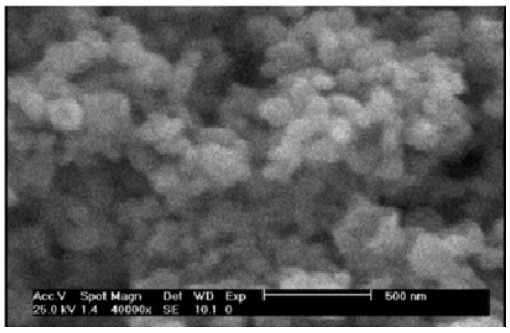
اکسید روی دارای فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی در محدوده pH طبیعی (pH=۷) می‌باشد و یکی از عناصر معدنی ضروری برای انسان محسوب می‌شود، محققین ویژگی ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی، ایمن بودن آن برای انسان و عدم آلودگی محیط در اثر استفاده از آن را به عنوان عامل ضد میکروبی مهم و مورد علاقه ذکر کرده‌اند (۴). Sawai و همکارانش در مطالعه‌ای کینتیک مرگ باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلای در تماس با محلول پودر آهک حرارت داده شده را بررسی کردند که برای مطالعه کینتیکی از فرم درجه اول آن استفاده شده است و تغییرات غلظت پودر آهک و زمان تماس، متغییرهای 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 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.

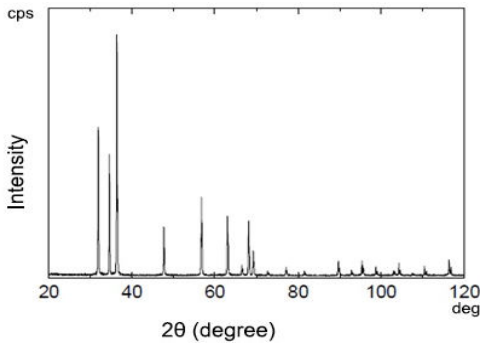
مواد و روشها

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 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 اندازه نانو ذرات، از سوی شرکت سازنده بررسی و تعیین گردید (تصویر ۱). بر اساس نتایج SEM، نانو ذرات تقریبا 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 ۱۹۶ °C− (BET; BELSORPmini) ۹۰m2/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 هینتون 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).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.2.6]

نمونه‌های باکتریایی: باکتریهای مورد استفاده جهت انجام بررسی کینتیک مرگ شامل اشریشیاکلای (ATCC 25922) و پسودوموناس آئروژینوزوا (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.

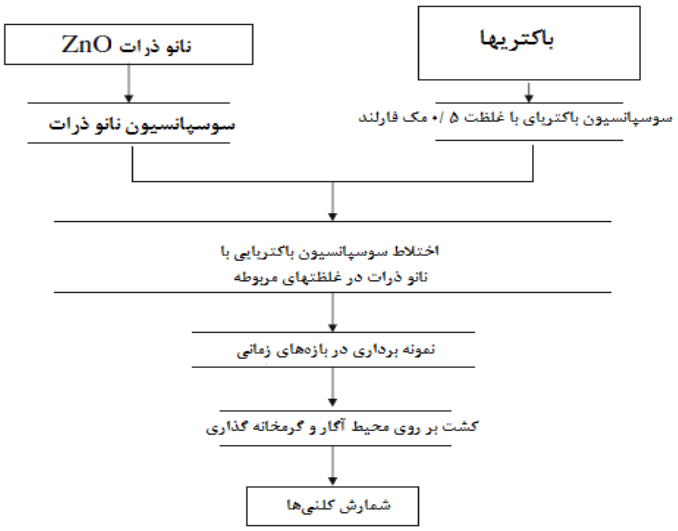
کشت نمونه باکتریهای مورد آزمون: سویه‌های استاندارد باکتریهای مذکور روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه (RAD Production.co) با دمای ۳۷°C نگهداری گردیدند. پس از طی مدت انکوباسیون، از این باکتریها برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی استفاده شد (۱۴و۱۳). به منظور تهیه سوسپانسیون 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 PBS:) استریل مخلوط گردید تا سوسپانسیونی معادل با کدورت نیم مک فارلند (۱۰۸× ۱/۵ عدد باکتری در هر میلی لیتر (Colony-Forming Unit (CFU)) تهیه شود. برای اطمینان از ایجاد کدورت مذکور، جذب آن به وسیله اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش (UNICO-2100؛ USA) 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 براث 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 (N_0) محاسبه شد. برای بررسی کینتیک مرگ باکتریها از کینتیک مرگ درجه اول استفاده شد. شکل کلی این نوع کینتیک بدین صورت می باشد(۱۷و۱۱و۱۰و۳):

$$dN/dt = -kN_0$$

در این رابطه (k) ثابت میزان مرگ درجه اول، N_0 تعداد کلنی های 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.



تصویر ۲: شماتیک مراحل انجام مطالعه کینتیکی

یافته ها

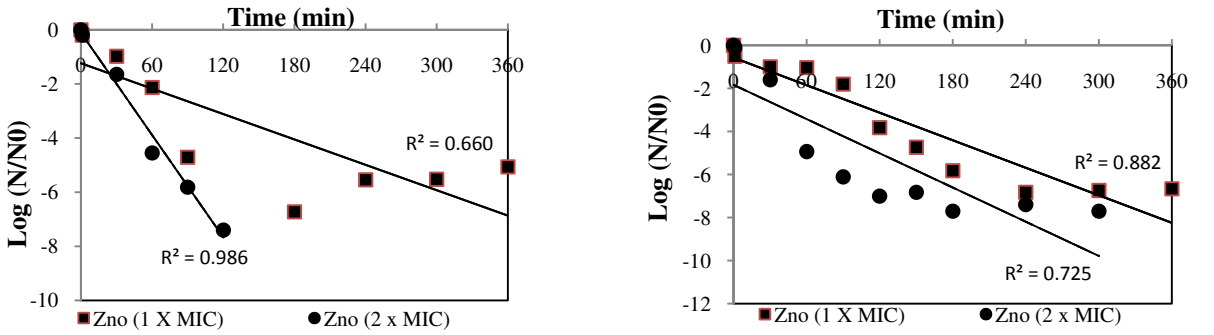
در این مطالعه ابتدا غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) برای هر یک از سویه‌های استاندارد باکتریایی مورد استفاده بدست آورده شد. کمترین غلظت مهاری برای باکتری پسودوموناس آئروژینوزوا ۱۵۶/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و MIC به صورت مشترک برای اشریشیا کلای و استافیلوکوک اورئوس ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و برای استافیلوکوک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

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

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

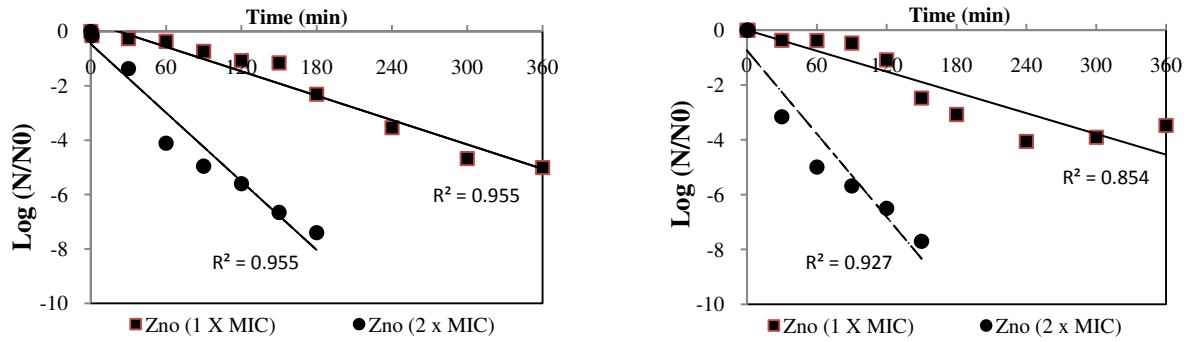
برای بررسی اثر غلظت و زمان تماس بر روی کینتیک مرگ باکتریها از حالت لگاریتمی تعداد باکتریها نسبت به زمان استفاده شد. در هر دو غلظت مورد بررسی با افزایش زمان تماس برای همه باکتریها نسبت بقا کاهش یافت. همچنین با افزایش غلظت نانو ذرات از 1x MIC به 2x MIC نسبت بقای باکتریها کاهش نشان داده است. بیشترین و کمترین 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 پسودوموناس آئروژینوزوا 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 ۴و۳).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.2.6]



(الف) (ب)

شکل۳: اثر غلظت ۱,۲ x MIC نانو ذرات اکسید روی و زمان تماس بر کینتیک مرگ باکتریهای گرم منفی الف) اشریشیاکلای ب) پسودوموناس آئروژینوزوا



(الف) (ب)

شکل۴: اثر غلظت ۱,۲ x MIC نانو ذرات 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

زمان تماس (دقیقه)	یک برابر غلظت ممانعت کنندگی رشد				دو برابر غلظت ممانعت کنندگی رشد			
	اشریشیاکلی	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	استافیلوکوک اورئوس	پسودوموناس آئروژینوزوا	اشریشیاکلی	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	استافیلوکوک اورئوس	پسودوموناس آئروژینوزوا
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱	۲/۱۶۲	۰/۴۱	۰	۰/۵۸	۰/۲۶	۰/۴۱	۰	۰/۵۸
۳۰	۸/۸۵۴	۰/۸۳	۱/۳۱	۸/۴۸	۳۸/۲۳	۲۲	۱۴۳۶/۷	۴۳
۶۰	۹/۷۶۷	۱/۳۳	۱/۴	۱۳۴	۸۶۵۷۹	۱۲۷۸۵	۹۷۶۵۵	۳۵۱۹۸
۹۰	۹۱/۶۹	۴/۴۷	۱/۹۷	۵۰۸۹۰	۱/۳×۱۰۶	۹۰۵۷۹	۴۷۶۱۸۹	۶/۵×۱۰۵
۱۲۰	۶۵۶۴/۱۲	۱۰/۷	۱۱/۲۱	–	۹/۹×۱۰۷	۳۹۳۷۰۰	۳/۱۲×۱۰۶	۲/۵×۱۰۷
۱۵۰	۵۴۶۴۳	۱۳/۴۷	۲۹۶/۴	–	۱×۱۰۸	۴/۵×۱۰۵	۵×۱۰۷	–
۱۸۰	۶۵۷۸۹۴	۲۰۱/۶۷	۱۱۹۴	۵/۲۶×۱۰۶	۵×۱۰۷	۲/۵×۱۰۷	–	–
۲۴۰	۲/۵×۱۰۷	۳۴۲۱/۳۱	۱۱۳۹۲	۳/۴×۱۰۵	۶/۶×۱۰۷	–	–	–
۳۰۰	۵×۱۰۷	۴۷۰۵۸	۸۰۳۴	۳/۳×۱۰۵	۵/۵×۱۰۷	–	–	–
۳۶۰	۴/۵۵×۱۰۷	۹۹۹۹۹	۲۹۷۳	۱/۱۵×۱۰۵	–	–	–	–

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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.2.6]

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 ذارت 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 پسودوموناس آئروژینوزوا 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 سویه‌ها وجود دارد که این حالت برای باکتری پسودوموناس آئروژینوزوا 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 سویه‌ها همواره منفی بوده است و با افزایش غلظت میزان شیب تندتر نیز شده است. کاهش شیب نسبت بقا ($\mathrm{Log}\frac{N}{N_0}$) در باکتری پسودوموناس آئروژینوزوا نسبت به 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 اشریشیا 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 کاملا 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 استافیلوکوس اورئوس و اشریشیا 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 باکترهای از حالت خطی پیروی نموده است (۱۱). با توجه به معنی‌دار بودن مرگ باکتریها با زمان مواجهه، سویه‌های باکتری و غلظت نانو ذرات در سوسپانسیون می‌توان گفت که اثر ضد میکروبی نانو ذره اکسید روی برای هر سویه اختصاصی بوده و برای کاربرد نانو ذره اکسید روی جهت کنترل باکتریها، مطالعات اختصاصی برای هر سویه مورد نیاز است و افزایش زمان تماس و غلظت عامل ضد میکروبی، فاکتورهای موثر برای کاهش تعداد باکتریها می باشند.

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 اشریشیاکلای 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 میکروبشناسی بخاطر همکاریهایشان تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.2.6]

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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.2.6]

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 hydroalcoholoic 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, Duttagupta 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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.5.2.6]