

بررسی ضریب حساسیت و کینتیک مرگ اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس

ادریس حسین‌زاده^۱، دکتر محمدرضا سمرقندی^۲، دکتر محمد یوسف علیخانی^۳، دکتر حاتم گودینی^۴،
دکتر قدرت‌اله شمس خرم‌آبادی^۵

چکیده

مقدمه: افزایش مقاومت به عوامل ضد میکروبی معمول یکی از مشکلات عمده‌ی بخش مراقبت‌های بهداشتی می‌باشد. در این مطالعه فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس علیه باکتری‌های اشرشیاکلی ATCC25922 و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC25923 بررسی شد.

روش‌ها: در این مطالعه خاصیت ضد میکروبی نانو ذرات با استفاده از تکنیک‌های محاسبه‌ی ضریب حساسیت و کینتیک مرگ باکتری‌ها بررسی گردید. آزمایشات باکتریولوژیکی با استفاده از غلظت اولیه‌ی 10^8 واحد کلنی تشکیل شده در میلی‌لیتر (CFU/ml) هر یک از باکتری‌ها انجام شد. ابتدا حداقل غلظت ممانعت‌کننده‌ی رشد (Minimum inhibitory concentration یا MIC) تعیین گردید. برای بررسی کینتیک مرگ و محاسبه‌ی ضریب حساسیت از غلظت‌های یک و دو برابر MIC در زمان تماس صفر تا ۳۶۰ دقیقه استفاده شد.

یافته‌ها: در واکنش نانو ذرات اکسید روی و مس با اندازه‌ی ذرات ۲۰ و ۶۰ نانومتر، بیشترین ضریب حساسیت برای استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نانو ذره‌ی اکسید روی ($Z = 0.033 \text{ ml}/\mu\text{g}$) و کمترین مقدار این پارامتر برای استافیلوکوکوس اورئوس در تماس با اکسید مس ($Z = 0.032 \text{ ml}/\mu\text{g}$) وجود داشت. فرآیند مرگ اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در تماس با سوسپانسیون نانو ذرات از واکنش کینتیک درجه‌ی یک پیروی کرد و نسبت بقای باکتری‌ها با افزایش زمان تماس، کاهش یافت. با افزایش غلظت نانو ذرات، فعالیت باکتری‌کشی نانو ذرات افزایش نشان داد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج آزمایشات، ضریب حساسیت تعیین گردید و حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس از اشرشیاکلی بیشتر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که نانو ذرات اکسید روی نسبت به اکسید مس از اثر ضد میکروبی قوی‌تری برخوردار است.

واژگان کلیدی: حساسیت ضد میکروبی، کینتیک، اکسید روی، اکسید مس، نانو ذرات، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس

مقدمه

مشکلاتی جدی شود. عفونت‌های بیمارستانی (HAI) یا Hospital-acquired infections) یکی از مشکلات عدیده در سراسر دنیا است و کنترل گسترش این عفونت‌ها به خصوص در بیمارستان‌ها یک چالش جدی می‌باشد (۱-۲). در تحقیقات انجام شده برخی از اکسیدهای سرامیکی، اکسید کلسیم، اکسید منیزیم و

به موازات توسعه‌ی سریع زندگی بشری، کنترل میکروارگانیسم‌های مضر هم امری غیر قابل اجتناب است (۱). طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها در تعادل با محیط زندگی انسان‌ها می‌باشند، اما رشد سریع و کنترل نشده‌ی آن‌ها می‌تواند منجر به بروز

^۱ عضو هیأت علمی، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

^۲ دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط و عضو مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۳ دانشیار، گروه میکروپزشناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۴ استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

^۵ دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

همچنین بسیاری از اکسید نانو ذرات چون نانو ذرات اکسید روی و مس فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی از خود نشان داده‌اند (۷-۳). ویژگی ضد میکروبی نانو ذرات توجه محققین و صاحبان صنایع را به خود جلب کرده است که از این مواد به عنوان جایگزین گندزدهای آلی چون ترکیبات چهارتایی آمونیوم و ترکیبات کلرینه جهت کنترل باکتری‌های مضر در محیط‌هایی چون بیمارستان‌ها استفاده شود (۳).

یون‌های مس و روی از جمله موادی هستند که به طور سنتی از دیرباز خواص ضد میکروبی آن‌ها شناخته شده است و مورد تأیید می‌باشد. برخی مطالعات نشان داده‌اند که یون این گونه فلزات از طریق اتصال به گروه‌های سولفیدریل (SH-) موجود در آنزیم‌ها، با پروتئین‌ها واکنش ایجاد می‌کنند و در نهایت پروتئین‌ها غیر فعال می‌شوند (۸). اگر این گونه فلزات در اندازه‌های بسیار کوچک موجود باشند به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم، خواص ضد میکروبی بهتری از خود نشان خواهند داد (۹). با توسعه علم نانو تکنولوژی، نانو ذرات مس و روی با روش‌های مختلف شیمیایی و الکتریکی تولید می‌شوند و خواص ضد میکروبی آن‌ها در این مطالعه و بسیاری از دیگر مطالعات مشابه بررسی شده است.

Sondi و Salopek-Sondi اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره علیه اشرشیاکلی (۶) و Hsiao و همکاران (۱۰) فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات مس علیه برخی باکتری‌ها را بررسی کرده‌اند. نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده با عکس‌های TEM و تحقیقات پروتئومیک (تحقیقات مربوط به ساختار و عملکرد پروتئین‌ها) نشان داده است که نانو ذرات نقره با مواد موجود در غشای باکتری‌ها بر هم‌کنش دارد و از طریق

ایجاد تغییرات ساختاری، از بین رفتن نیروی محرکه‌ی پروتون و در نهایت باعث مرگ سلولی می‌شود (۱۱). از نانو ذرات فلزی می‌توان برای پوشش‌دار کردن برخی قطعات، به منظور ایجاد خاصیت ضد میکروبی در تجهیزات پزشکی و فیلترهای تصفیه‌ی آب استفاده کرد. برای بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات از دو نوع مطالعات کمی و کیفی استفاده می‌شود (۸). مطالعات کمی اندکی به منظور مقایسه‌ی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات فلزی گزارش شده است. در کاربردهای صنعتی مواد ضد میکروبی، مدل‌های عددی و پارامترهای کمی جهت استفاده از نانو ذرات برای استفاده‌ای خاص، ارزیابی عملکرد باکتری‌کشی نانو ذرات و همچنین تعیین زمان مرگ باکتری‌های در تماس با نانو ذرات ضروری است (۸). یکی از پارامترهای کمی برای بررسی میزان حساسیت در مدل‌های عددی، ضریب حساسیت باکتری نسبت به عامل ضد میکروبی می‌باشد (۸).

این مطالعه به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات تجاری اکسید مس و روی علیه اشرشیاکلی (ATCC 25922) و استتافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و همچنین تعیین ضریب حساسیت باکتری‌ها و کینتیک مرگ آن‌ها انجام شد.

روش‌ها

این پژوهش تجربی و از نوع بنیادی کاربردی بود که در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی لرستان و همدان در سال ۱۳۹۱ انجام شد. بدین منظور نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس تجاری برای بررسی فعالیت ضد میکروبی با درجه‌ی خلوص بیش از ۹۹ درصد از شرکت Nano Amor ایالات متحده

زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد. جهت جلوگیری از عدم بروز خطا همزمان با اجرای آزمایشات میکروبی سوسپانسیون نانو ذرات تهیه شدند.

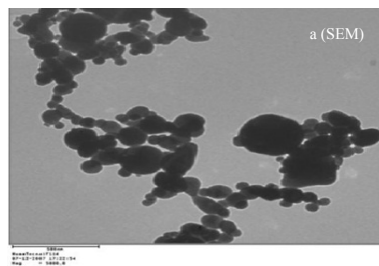
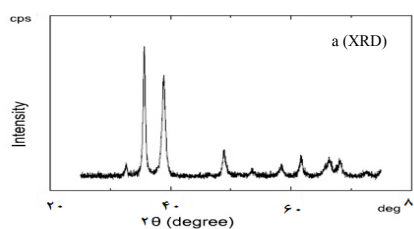
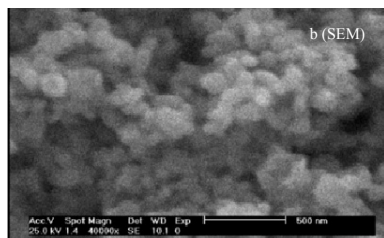
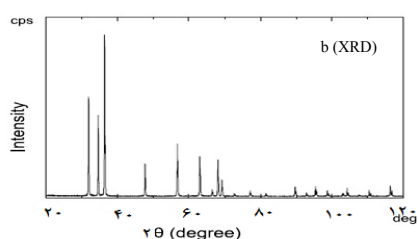
باکتری‌های مورد استفاده جهت انجام آزمایشات ضد باکتریایی شامل اشرشیاکلی (ATCC 25922)، از انواع گروه منفی و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) باکتری گرم مثبت بودند که به صورت فریز خشک نگهداری شده بودند. این باکتری‌ها از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده‌ی پزشکی تهیه گردید. با توجه به این که ممکن بود فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی تحت تأثیر دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها قرار گیرد، آزمایشات بر روی هر دو گروه گرم مثبت و گرم منفی انجام شد.

سویه‌های استاندارد باکتری‌های مذکور روی محیط کشت آگار خون‌دار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه (RAD Production Co.) با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از طی مدت انکوباسیون، از نمونه‌ی باکتری‌ها برای تهیه‌ی سوسپانسیون باکتریایی استفاده شد (۱۲-۱۳).

تهیه شد. حالت بلوری و میزان ناخالصی موجود در نانو ذرات اکسید روی با استفاده از پراش اشعه‌ی ایکس (X-ray diffraction یا XRD) و شکل و اندازه‌ی نانو ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (Scanning electron microscope یا SEM)، از سوی شرکت سازنده بررسی و تعیین شد (شکل ۱).

بر اساس نتایج SEM، نانو ذرات دارای شکل کروی بود و قطر نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس به ترتیب در حدود ۲۰ و ۶۰ نانومتر به دست آمد. همچنین میزان سطح ویژه‌ی نانو ذرات با اندازه‌گیری ایزوترم جذب مولکول‌های گاز نیتروژن در دمای ۱۹۶- درجه‌ی سانتی‌گراد (BET; BELSORPmini) برای نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس به ترتیب ۹۰ و ۸۰ گرم در مترمربع بود.

برای تهیه‌ی محلول استوک نانو ذرات، ۱۰ گرم نانوذره در یک لیتر محیط کشت استریل به صورت سوسپانسیون در آورده شد. برای پراکنده شدن مناسب آن‌ها از دستگاه اولتراسونیک (Bandelin Sonorex RK 31 H) به مدت



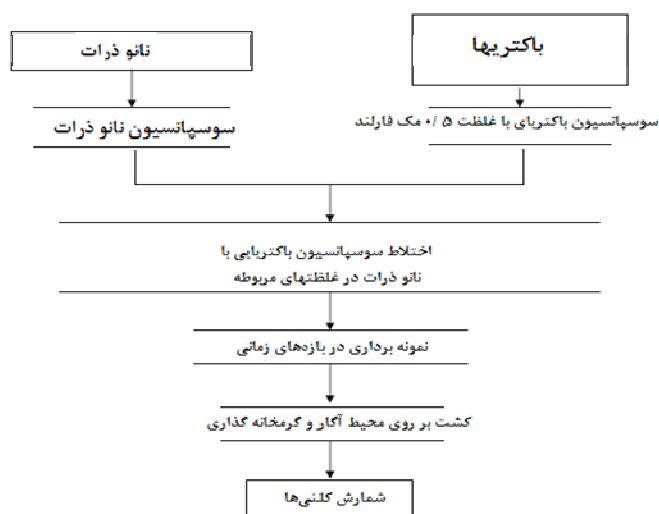
شکل ۱. عکس‌های (X-ray diffraction) XRD (a: نانو ذره اکسید مس و b: نانو ذره اکسید روی) و SEM (a: نانو ذره اکسید مس و b: نانو ذره اکسید روی)

به منظور تهیه‌ی سوسپانسیون باکتریایی جهت انجام آزمایشات، ابتدا سلول‌های باکتریایی از سطح محیط کشت آگار خونی به کمک لوپ استریل جمع‌آوری شد و در یک میلی‌لیتر بافر سالین فسفات (Phosphate-buffered-salin یا PBS) استریل مخلوط گردید تا نمونه‌های با کدورت نیم McFarland ($10^8 \times 1/5 - 1$ عدد باکتری در هر میلی‌لیتر) تهیه شد. برای اطمینان از ایجاد کدورت مذکور، جذب آن به وسیله‌ی اسپکتروفتومتر مرئی فرابنفش (UNICO-2100؛ ایالات متحده) در محدوده‌ی طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و میزان جذب در محدوده‌ی ۰/۱۰-۰/۰۸ تنظیم گردید (۱۴).

قبل از بررسی کینتیک مرگ باکتری‌ها، با استفاده از روش استاندارد پیشنهادی توسط کمیته‌ی ملی استانداردهای آزمایشگاه‌های بالینی (CLSI یا Clinical and laboratory standards institute)، حداقل غلظت ممانعت‌کننده‌ی رشد (MIC یا Minimum inhibitory concentration) برای هر یک از باکتری‌های در تماس با سوسپانسیون نانو ذرات به دست آمد. MIC به عنوان کمترین غلظت نانو ذرات که از رشد ارگانیسم‌ها در محیط کشت ممانعت می‌کند، تعریف می‌شود (۱۲). در این مطالعه MIC بر اساس لوله‌های حاوی محیط کشت که به صورت سیستم ناپیوسته دارای غلظت‌های متفاوتی از نانو ذرات اکسید مس/اکسید روی در سوسپانسیون بودند، تعیین شد. در این روش از ۱۲ لوله که هر کدام حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط تریپتون سویا برات (TSB یا Tryptone soya broth) استریل بود، استفاده گردید. در لوله‌ی اول فقط ۴ میلی‌لیتر سوسپانسیون مورد نظر ریخته و مخلوط شد. سپس از این لوله ۲ میلی‌لیتر

برداشته و به لوله‌ی شماره‌ی ۲ اضافه شد و از این لوله ۲ میلی‌لیتر به لوله‌ی بعدی اضافه گردید و به همین ترتیب این عمل تا لوله‌ی ۱۲ تکرار شد (غلظت‌های به دست آمده از لوله‌ی اول تا دوازدهمین لوله به ترتیب ۱۰۰۰۰، ۵۰۰۰، ۲۵۰۰، ۱۲۵۰، ۶۲۵، ۳۱۲/۵، ۱۵۶/۲۵، ۷۸/۱۲۵، ۳۹/۰۶۲۵، ۱۹/۵۳، ۹/۷۶۵ و ۴/۸۸۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بود). سپس لوله‌های حاوی نانوذرات و باکتری در انکوباتور شیکردار (۲۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و حداکثر مدت زمان ۲۴ ساعت) گرم‌خانه‌گذاری شد. برای تکرارپذیری آزمایشات مربوط به تعیین MIC نانوذرات آزمایشات این قسمت ۳ بار تکرار گردید. جوابی که حداقل با ۲ تکرار تأیید شد، به عنوان نتیجه‌ی نهایی تأیید و انتخاب گردید. شکل ۲ نحوه‌ی انجام بررسی کینتیک مرگ باکتری‌های در تماس با سوسپانسیون نانو ذرات را نشان می‌دهد. محلول سوسپانسیون باکتریایی به محیط کشت حاوی نانو ذرات با غلظت‌های یک و دو برابر مقدار MIC اضافه شد و سپس در انکوباتور شیکردار (۲۰۰ دور در دقیقه، دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و حداکثر مدت زمان ۲۴ ساعت) گرم‌خانه‌گذاری گردید. در زمان‌های مورد نظر (صفر تا ۳۶۰ دقیقه) از سوسپانسیون باکتری-نانوذره نمونه‌برداری شد و بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت آگار خون‌دار کشت داده شد. کلنی‌های شکل‌گرفته برای هر زمان و باکتری و غلظت (دو غلظت برای هر باکتری) شمارش و ثبت گردید.

محاسبه‌ی نسبت بقا ($\frac{N}{N_0}$) از تقسیم تعداد کلنی‌ها در زمان‌های نمونه‌برداری (N) بر تعداد کلنی‌ها در زمان قبل از تماس با سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی/اکسید مس (N_0) محاسبه شد.



شکل ۲. مراحل انجام آزمایشات کینتیک مرگ میکروبی در این مطالعه

عبارت دیگر بیانگر این است که آن نانوذره دارای حساسیت ضد میکروبی بیشتری می‌باشد.

یافته‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایشات بررسی فعالیت ضد میکروبی سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس بر روی باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس، مقدار MIC برای هر دو باکتری نسبت به نانوذره‌ی اکسید روی ۱۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و مقدار MIC برای باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس نسبت به نانوذره‌ی اکسید مس به ترتیب ۱۲۵۰ و ۱۵۶/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

مقدار ضریب حساسیت برای هر یک از باکتری‌ها و سوسپانسیون نانو ذرات و برای هر بازه‌ی زمانی نمونه‌برداری محاسبه گردید. میانگین ضریب حساسیت باکتری‌ها نسبت به نانو ذرات مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

همان گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است

برای بررسی کینتیک مرگ باکتری‌ها از کینتیک مرگ درجه‌ی اول استفاده شد. شکل کلی این نوع کینتیک به صورت زیر است (۱۷-۱۵، ۳):

$$dN/dt = -kN_0$$

در این رابطه k ثابت میزان مرگ درجه‌ی اول، N_0 تعداد کلنی‌های اولیه‌ی باکتری و N تعداد کلنی باکتری پس از بازه‌ی زمانی مورد نظر می‌باشد.

در این مطالعه ضریب حساسیت نانو ذرات (Z) بر حسب میلی‌لیتر در میکروگرم به وسیله‌ی رابطه‌ی زیر که توسط Yoon و همکاران پیشنهاد شده است، به دست آمد (۸):

$$Z = \frac{-\ln\left(\frac{N}{N_0}\right)}{C}$$

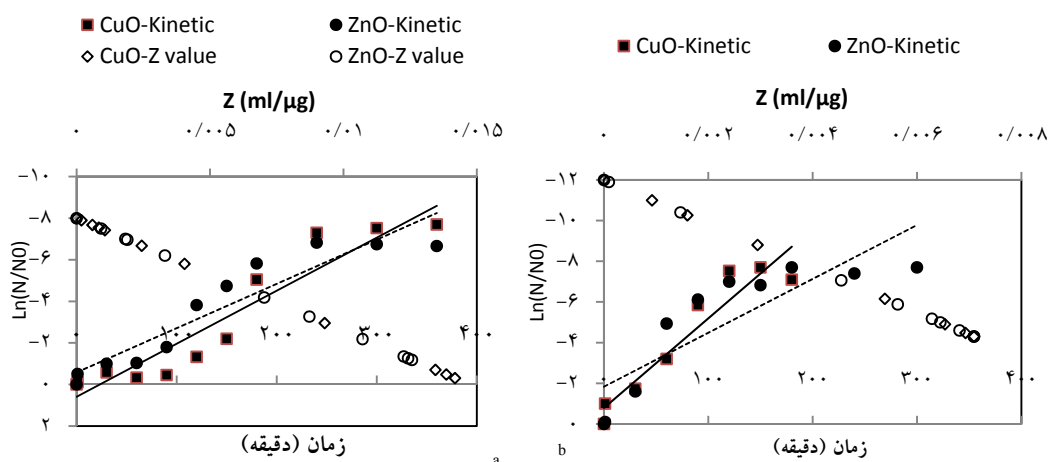
در این رابطه N تعداد کلنی‌های باکتریایی پس از تماس با نانو ذرات، N_0 تعداد کلنی‌های باکتریایی اولیه و C غلظت نانو ذرات بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. با استفاده از مقدار Z و مقادیر C ، نسبت باکتری‌های زنده مانده $\frac{N}{N_0}$ قابل پیش‌بینی است. مقدار Z بزرگ‌تر به این معنی است که باکتری‌ها نسبت به آن نانوذره از حساسیت بیشتری برخوردار هستند و به

بakterی کاهش یافته است. با ترسیم حالت لگاریتمی نسبت بقای باکتری‌ها در مقابل زمان تماس، جمعیت باکتری‌ها نسبت به زمان به طور خطی کاهش یافت. مقدار ضرب حساسیت هر دو نانوذره با افزایش زمان تماس برای استافیلوکوکوس اورئوس، افزایش نشان داده است. همان طور که در شکل ۳b قابل مشاهده است، مقدار این پارامتر همواره برای نانوذره اکسید مس نسبت به اکسید روی بیشتر بود. نتایج بررسی کینتیک نشان داد که با افزایش غلظت نانو ذرات، جمعیت باکتری‌ها کاهش یافت. در غلظت یک برابر MIC رشد مجدد باکتری‌ها وجود داشت، اما با افزایش غلظت به مقدار دو برابر MIC، پس از کاهش جمعیت باکتری‌ها، رشد مجدد آن‌ها وجود نداشت.

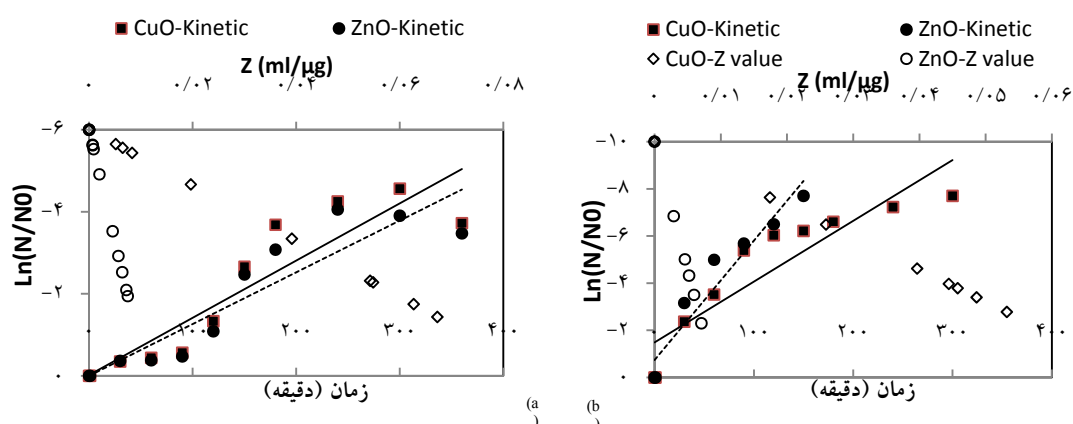
مقدار ضرب حساسیت برای هر دو نانوذره اکسید مس و اکسید روی در مورد استافیلوکوک اورئوس با افزایش غلظت نانو ذرات از یک برابر مقدار MIC به دو برابر MIC افزایش یافته است، ولی میانگین ضرب حساسیت محاسبه شده برای اشرشیاکلی برای هر دو نانوذره مورد بررسی با افزایش غلظت، کاهش نشان داده است. تغییرات جمعیت باکتری‌های در تماس با سوسپانسیون نانو ذرات نسبت به زمان‌های تماس آن‌ها و در نتیجه کینتیک مرگ آن‌ها محاسبه گردید. تغییرات جمعیت باکتری‌ها نسبت به زمان و مقدار ضرب حساسیت در شکل‌های ۳ و ۴ آورده شده است. نتایج بررسی کینتیک مرگ باکتری‌ها نشان داد نسبت بقا با افزایش غلظت نانو ذرات در هر دو

جدول ۱. میانگین ضرب حساسیت به دست آمده برای هر یک از باکتری‌ها و نانو ذرات مورد بررسی در این مطالعه

اشرشیاکلی		استافیلوکوک اورئوس		سویه باکتری	غلظت نانوذره
اکسید مس	اکسید روی	اکسید مس	اکسید روی		
۰/۰۰۵۴۵	۰/۰۰۶۵۲	۰/۰۲۸۹	۰/۰۰۳۲۳		یک برابر غلظت ممانعت کننده‌ی رشد
۰/۰۰۳۹۳	۰/۰۰۴۵۵	۰/۰۳۳۱۸	۰/۰۰۳۶۹		دو برابر غلظت ممانعت کننده‌ی رشد



شکل ۳. تغییرات جمعیت باکتری اشرشیاکلی (ATCC 25922) نسبت به زمان (کینتیک مرگ) و مقدار ضرب حساسیت
 a: غلظت یک برابر مقدار MIC و b: غلظت دو برابر مقدار MIC



شکل ۴. تغییرات جمعیت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) نسبت به زمان (کینتیک مرگ) و مقدار ضرب حساسیت (a: غلظت یک برابر مقدار MIC و b: غلظت دو برابر مقدار MIC)

گروه‌های فعال (رآکتیو) سطحی به عنوان مکان‌های فعال برای شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن رآکتیو شامل سوپراکسید، هیدروژن پروکسید و رادیکال هیدروکسیل منجر به استرس اکسیداتیو شود (۵).

نتایج تعیین مقدار MIC نشان داد که استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشرشیاکلی از حساسیت بیشتری برخوردار بود. به عبارت دیگر، اشرشیاکلی نسبت به نانو ذرات مقاوم‌تر بود. یکی از علل حساسیت پایین‌تر اشرشیاکلی می‌تواند به این دلیل باشد که غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیاکلی به طور غالب از لیپولی ساکارید مستحکم تشکیل شده است که سد مقاومی در برابر نانوذره محسوب می‌شود (۱۸). نتایج آزمایشات Yoon و همکاران نیز نشان داده است که باسیلوس سوبتیلیس در مقایسه با باکتری اشرشیاکلی از حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشد (۸). همچنین بر اساس نتایج آن‌ها اشرشیاکلی نسبت به نانو ذرات مس و باسیلوس سوبتیلیس در مقایسه با نانو ذرات نقره از حساسیت بیشتری برخوردار بوده‌اند. در مطالعه‌ی حاضر استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با نانو ذرات

بحث

اندازه‌ی نانو ذرات اکسید مس از نانو ذرات اکسید روی مورد بررسی در این مطالعه بزرگ‌تر بود (۶۰ نانومتر در مقابل ۲۰ نانومتر). به عبارت دیگر، نانو ذرات اکسید مس ۳ برابر نانو ذرات اکسید روی بودند. کاهش اندازه‌ی ذرات باعث تغییر ویژگی‌های ساختاری و فیزیکوشیمیایی آن‌ها می‌گردد. در مورد نانو ذرات کاهش اندازه سبب آسان شدن دسترسی آن‌ها برای موجودات زنده و در نتیجه منجر به افزایش سمیت آن‌ها می‌شود (۱۸). در پروفیل XRD نانو ذرات اکسید مس و اکسید روی، یک پیک اکسیژن مشاهده شد. نانو ذرات اکسید مس و اکسید روی دارای اتم‌های چگال هستند و به عنوان انواع بسیار رآکتیو برشمرده می‌شوند (۱۴). سطح مخصوص نانو ذرات اکسید روی حدود ۱/۱۲۵ برابر بزرگ‌تر از سطح مخصوص نانو ذرات اکسید مس می‌باشد. کاهش اندازه و بنابراین افزایش سطح مخصوص به عنوان عامل افزایش تعداد گروه‌های رآکتیو بر روی سطح ذرات، به عنوان مهم‌ترین فاکتورها برای افزایش سمیت نانو ذرات ذکر شده است. شاید افزایش

اکسید روی، حساسیت بیشتری نسبت به نانو ذرات اکسید مس داشت (غلظت ممانعت کننده‌ی رشد ۱۲۵۰ در مقابل ۱۵۶/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر). با توجه به وسیع الطیف و استفاده آسان کینتیک مرگ درجه‌ی اول (۱۷-۱۵)، در این مطالعه برای بیان کینتیک مرگ باکتری‌ها از نوع درجه‌ی اول استفاده شده است. همان گونه که در شکل‌های ۳ و ۴ مشهود است، وقتی که نسبت لگاریتمی باکتری‌های زنده مانده و زمان مواجهه به عنوان محورهای قائم و افقی در مقابل هم رسم شود، دیده می‌شود که جمعیت هر دو باکتری مورد بررسی به صورت خطی کاهش می‌یابد. نتایج مطالعات Sawai و همکاران با نتایج این بخش از مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی داشت (۱۷-۱۵).

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. همان گونه که از نمودارهای کینتیک مرگ باکتری‌ها (شکل ۳ و ۴) استنباط می‌شود در یک زمان خاص (مشترک برای هر دو غلظت نانو ذرات) نسبت بقا با افزایش غلظت نانو ذرات به سرعت کاهش نشان داده است که بیانگر افزایش فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات در سوسپانسیون، به دلیل افزایش غلظت آن‌ها است. این نتیجه می‌تواند به سمیت بیشتر در غلظت‌های بالاتر نانو ذرات مرتبط باشد (۱۹). البته این موضوع نمی‌تواند بیانگر رابطه‌ی خطی غلظت-قابلیت ضد میکروبی نانو ذرات باشد زیرا در غلظت‌های بالاتر احتمال ایجاد مقاومت سازگاری در باکتری وجود دارد. همچنین با افزایش زمان تماس به همراه افزایش غلظت نانو ذرات، نسبت بقای باکتری‌ها کاهش یافت.

به عبارت دیگر، فعالیت باکتری‌کشی نانو ذرات با افزایش زمان تماس و غلظت نانو ذرات علیه هر دو باکتری افزایش یافت و این مورد می‌تواند به معنی وسیع الطیف بودن ویژگی ضد میکروبی این نانو ذرات باشد (۱۸). اگر چه بررسی اثر ضد میکروبی آن‌ها علیه دیگر میکروارگانسیم‌ها نیاز است. یکی از مکانیسم‌های احتمالی باکتری‌کشی نانو ذرات، بافت ساینده‌ی آن‌ها می‌باشد. سطح نانو ذرات به دلیل شکل نامنظم سطحی دارای حالت ساینده است (۱۸) و سطح زیر نانو ذرات باعث آسیب مکانیکی غشای سلولی باکتری‌ها می‌شود. چنان چه در جدول ۱ آورده شده است با افزایش غلظت نانو ذرات از یک برابر به دو برابر مقدار MIC، مقدار پارامتر Z برای اشرشیاکلی کاهش داشت که می‌تواند به دلیل مقاومت سازگاری در غلظت‌های بالاتر باشد. شیب کاهش نسبت $(\text{Log} \frac{N}{N_0})$ در اشرشیاکلی در مقایسه با استافیلوکوکوس اورئوس با افزایش غلظت نانو ذرات کمتر بود که می‌تواند به دلیل مقاومت این باکتری نسبت به نانو ذرات مورد بررسی در این مطالعه باشد (۱۹).

Akiyama و همکاران در مطالعه‌ی خود به این نتیجه رسیدند که استافیلوکوک اورئوس به دلیل تفاوت ترکیبات دیواره‌ی سلولی نسبت به اشرشیاکلی، در مقابل استرس‌های شیمیایی چون حضور آنتی‌بیوتیک از حساسیت بالاتری برخوردار است (۲۰). در هر غلظت از نانو ذرات، ضریب حساسیت با استفاده از رابطه‌ی $Z = \frac{-\ln(\frac{N}{N_0})}{C}$ تعیین شد و مقدار Z برای محدوده‌ی غلظت تهیه‌شده‌ی نانو ذره و زمان تماس‌های متفاوت، به طور میانگین محاسبه گردید. نتایج بررسی ضریب حساسیت طی زمان و غلظت نانو ذرات نشان داد که مقدار ضریب حساسیت هر دو

نانوذره با افزایش زمان تماس، افزایش نشان داد.

همچنین اگر چه مقدار ضریب حساسیت هر دو نانوذره بسیار به هم نزدیک بود، ولی مقدار این پارامتر همواره برای نانوذره‌ی اکسید روی نسبت به اکسید مس بیشتر بود. البته همان طور که از نمودار ۳a قابل مشاهده است در زمان‌های ۲۴۰، ۳۰۰ و ۳۶۰ دقیقه مقدار ضریب حساسیت نانوذره‌ی اکسید مس بالاتر بود. مقدار ضریب حساسیت استافیلوکوکوس به دست آمده برای نانو ذرات اکسید روی نسبت به اکسید مس بیشتر بود که نشان دهنده‌ی این است که استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نانوذره‌ی اکسید روی مقاوم‌تر می‌باشد.

مقابل زمان، بیانگر اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ی نانو ذرات می‌باشد. تعیین ضریب حساسیت و کیتیک مرگ می‌تواند روشی مناسب جهت بررسی اثر ضد میکروبی عوامل ضد میکروبی مختلف یا سیستم‌های متفاوت ضد میکروبی باشد و می‌توان از این دو پارامتر بدین منظور بهره جست. در این مطالعه اثر نانو ذرات تک سایز (اکسید مس با قطر ۶۰ و اکسید روی با قطر ۲۰ نانومتر) استفاده شد. در مطالعات آتی می‌توان ارتباط اثر ضد میکروبی این نانو ذرات در اندازه‌های مختلف با کیتیک مرگ و ضریب حساسیت را مورد بررسی قرار داد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر کیتیک مرگ و ضریب حساسیت برای نانو ذرات اکسید روی و اکسید مس، تعیین و جهت ارزیابی اثر ضد میکروبی آن‌ها علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی استفاده گردید. بر اساس نتایج آزمایشات، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشرشیاکلی حساسیت بالاتری نسبت به هر دو نانوذره مورد بررسی از خود نشان داد. همچنین مطالعه‌ی کیتیک مرگ نشان داد جمعیت باکتری‌های زنده مانده در تماس با نانو ذرات، با افزایش زمان تماس و غلظت نانو ذرات به طور خطی کاهش می‌یابد. شیب منفی نسبت بقای باکتری‌ها در

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد در رشته‌ی مهندسی بهداشت محیط در سال ۱۳۸۹ با کد ۸۹۱۱۱۹۱۷۶۸۱۵ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان اجرا شده است. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های مادی و معنوی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه در اجرای این طرح تشکر نمایند. همچنین از جناب آقای مقدم کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبی‌شناسی به دلیل همکاری‌های ایشان تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Morteza-Semnan K, Saeedi M, Mahdavi MR, Rahimi F. Antimicrobial effects of methanolic extracts of some species of Stachys and Phlomis. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2007; 17(57): 57-66. [In Persian].
2. Jalali M, Abedi D, Asghari GR, Rezaie Z. A study of anti-microbial effect of pycnocyclus spinosa's fruit extracts. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2007; 17(59): 76-86. [In Persian].
3. 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.
4. Tawale JS, Dey KK, Pasricha R, Sood KN, Srivastava AK. Synthesis and characterization of ZnO tetrapods for optical and antibacterial applications. Thin Solid Films 2010; 519(3):

- 1244-7.
5. Hoseinzadeh E, Samarghand MR, Alikhani MY, Asgar G, Roshanaei G. Effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on death kinetic of gram-negative and positive bacterium. *JBUMS* 2012; 14(5): 57-66. [In Persian].
 6. 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.
 7. Hoseinzadeh E, Samargandi MR, Alikhani MY. Evaluation of synergetic effect of commercial zinc oxide and copper oxide nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria by fraction inhibitory concentration index. *J Zanzan Univ Med Sci* 2012; 20(82). [In Press].
 8. Yoon KY, Hoon BJ, Park JH, Hwang J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci Total Environ* 2007; 373(2-3): 572-5.
 9. Hoseinzadeh E, Samargandi MR, Alikhani MY, Roshanaei Gh, Asgari G. Effect of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles on Death Kinetic of Gram-Negative and Positive Bacterium. *J Babol Univ Med Sci* 2012; 14(5): 13-9.
 10. Hsiao MT, Chen SF, Shieh DB, Yeh CS. One-pot synthesis of hollow Au₃Cu₁ spherical-like and biomineral botallackite Cu₂(OH)₃Cl flowerlike architectures exhibiting antimicrobial activity. *J Phys Chem B* 2006; 110(1): 205-10.
 11. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res* 2006; 5(4): 916-24.
 12. Barry AL, Craig WA, Nadler H, Reller LB, Sanders CC, Swenson JM. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline. *NCCLS* 1999; 19(18): 1-29.
 13. Perilla MJ, Ajello G, Bopp C, Elliott J, Facklam R, Knapp JS, 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 gonorrhoeae*, *Salmonella* serotype Typhi, *Shigella*, and *Vibrio cholerae*. [Online]. 2003; Available from: URL: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16330e/s16330e.pdf>
 14. Ruparelia JP, Chatterjee AK, Duttagupta SP, Mukherji S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater* 2008; 4(3): 707-16.
 15. Sawai J, Himizu K, Yamamoto O. Kinetics of bacterial death by heated dolomite powder slurry. *Soil Biology and Biochemistry* 2005; 37(8): 1484-9.
 16. Sawai J, Shiga H, Kojima H. Kinetic analysis of death of bacteria in CaO powder slurry. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2001; 47(1): 23-6.
 17. Sawai J, Shiga H, Kojima H. Kinetic analysis of the bactericidal action of heated scallop-shell powder. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 71(2-3): 211-8.
 18. Hoseinzadeh E. Evaluation of antimicrobial propertice of copper oxide nanoparticle, zinc oxide nanoparticle and their combine against bacterial nasocomial infections Agents. [Thesis]. Hamedan: Hamedan University of Medical Sciences and Health Services. 2011. [In Persian].
 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.
 20. Akiyama H, Yamasaki O, Kanzaki H, Tada J, Arata J. Effects of zinc oxide on the attachment of *Staphylococcus aureus* strains. *J Dermatol Sci* 1998; 17(1): 67-74.

Sensitivity Coefficient and Death Kinetics of *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus* to Zinc Oxide and Copper Oxide Nanoparticles

Edris Hoseinzadeh MSc¹, Mohammad Reza Samarghandi PhD²,
Mohammad Yosef Alikhani PhD³, Hatam Godini PhD⁴,
Ghodratollah Shams Khorramabadi PhD⁵

Abstract

Background: Increasing bacterial resistance to usual antibacterial agents is a major problem of health care systems. Controlling the spread of bacteria within a hospital is thus a constant challenge. In this study, we investigated antimicrobial activity of copper oxide (CuO) and zinc oxide (ZnO) nanoparticles against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bacteria.

Methods: In this study, sensitivity coefficients and death kinetics of nanoparticles were used to evaluate the antimicrobial characteristics of ZnO and CuO nanoparticles against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial tests were performed with 108 CFU/ml of each bacterium at baseline. At first, minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. Then, nanoparticle suspension of one and two times of MIC was used to determine death kinetics and sensitivity coefficient at treatment time of 0 to 360 minutes.

Findings: In reaction with *Staphylococcus aureus*, ZnO nanoparticles (size: 20 nm) had the highest susceptibility ($Z = 0.033$ ml/ μ g) while CuO nanoparticles (size: 60 nm) had the lowest susceptibility ($Z = 0.0032$ ml/ μ g). The process of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* death in CuO and ZnO suspension was assumed to follow first-order kinetic. The survival ratio of bacteria decreased with increasing treatment time. An increase in the concentration of nanoparticles enhanced bactericidal properties.

Conclusion: The sensitivity of *Staphylococcus aureus* to ZnO and CuO nanoparticles was higher than *Escherichia coli*. The results of this study demonstrated that ZnO has a strong antimicrobial effect compared to CuO.

Keywords: Susceptibility, Kinetic, Zinc oxide, Copper oxide, Nanoparticle, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

¹ Faculty Member, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

² Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering AND Health Research Center, School of Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

³ Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

Corresponding Author: Edris Hoseinzadeh MSc, Email: hoseinzadeh@umsha.ac.ir