

سنتز نانو ذرات اکسید روی با فعالیت ضد میکروبی و آنتی بیوفیلمی علیه کلبسیلا پنومونیه

راضیه احمدی نسب، سید سهیل آقائی*، محمد علی قاسم زاده

گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۰۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۱۳)

چکیده

سابقه و هدف: کلبسیلا پنومونیه یک باکتری گرم مثبت، غیرمتحرک، کپسول دار، تخمیر کننده قندلاکتوز، بی هوازی اختیاری و میله‌ای شکل است. این باکتری از مهمترین اعضای جنس کلبسیلا در خانواده انتروباکتریاسه می باشد. در سال‌های اخیر، گونه‌های کلبسیلا از جمله پاتوژن‌های مهم در عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده اند. این باکتری بخشی از میکروفلور طبیعی بدن انسان است و در آب، فاضلاب و خاک یافت شده و قسمتی از فلور دهان، فارنکس و روده می باشد. کلبسیلا همچنین می تواند عفونت‌های دستگاه ادراری، دستگاه صفراوی و محل زخم جراحی را ایجاد کند. این باکتری همچنین یک پاتوژن فرصت طلب برای بیماران مبتلا به بیماری‌های مزمن ریه، بیماری‌های زونا، آتروفی مخاطی بینی و رینوسکلروم است. این ارگانسیم می تواند باعث مسمومیت غذایی و گاستروانتریت شود. تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری در سطوح مختلف، یکی از مهمترین مشکلات در صنایع غذایی است. نانوذرات فلزی ترکیبات ضد میکروبی موثری برای کنترل و حذف بیوفیلم‌های باکتریایی از سطوح مواد غیرزنده می باشند. هدف اصلی این تحقیق سنتز نانوذرات اکسید روی در شرایط آزمایشگاهی و ارزیابی خواص ضد میکروبی آنها برای مهار تشکیل بیوفیلم و ریشه کن سازی بیوفیلم کلبسیلا پنومونیه (ATCC 700603) می باشد.

روش کار: در این تحقیق نانوذرات اکسید روی به روش مکانوشیمیایی سنتز شدند و با استفاده از روش‌های EDX، FT-IR، UV-Vis و میکروسکوپ الکترونی رویی مورد تایید قرار گرفتند. خاصیت ضد میکروبی و آنتی بیوفیلم نانوذرات سنتز شده با استفاده از روش چاهک گذاری بر روی آگار و با روش رقت در میکروپلیت ۹۶ خانه ای به صورت متوالی تعیین شدند.

نتایج: نانوذرات اکسید روی سنتز شده دارای ساختار کروی با ابعاد حدود ۳۰ نانومتر بودند. فعالیت آنتی بیوفیلم و حذف بیوفیلم توسط نانوذرات اکسید روی به ترتیب در ۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

بحث: بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق نانوذرات اکسید روی می تواند به عنوان عامل ضد میکروبی موثر برای مهار تشکیل بیوفیلم کلبسیلا پنومونیه در صنایع غذایی استفاده شود.

کلیدواژگان

آنتی بیوفیلم، فعالیت ضد میکروبی، کلبسیلا پنومونیه، نانوذرات اکسید روی.



مقدمه

باکتری کلبسیلا پنومونیه یک باسیل گرم منفی روده ای و از اعضاء خانواده انتروباکتریاسه می باشد و جزیی از میکروفلور طبیعی بدن انسان را تشکیل می دهد. حدود یک سوم افراد سالم، ناقل روده ای این میکروب هستند و امروزه به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از مهم ترین باکتری های دخیل در عفونت های بیمارستانی مطرح می باشد. میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا می باشد و باعث بیماری های مختلفی مانند عفونت دستگاه ادراری، سپتی سمی، پنومونی و عفونت های داخل شکمی در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان می شود. عفونت های حاصل از این باکتری در خارج از بیمارستان کمتر دیده می شود. مقاومت ضد میکروبی همواره به عنوان یک مشکل جدی برای سلامت انسان مطرح بوده و بیماران را در سراسر بیمارستان های جهان تحت تأثیر قرار می دهد. هم چنین تغییر فلور میکروبی به وسیله آنتی بیوتیک ها باعث تهاجم باکتری های فرصت طلب و قارچ ها می شود (۱).

این ارگانیسرها در آب، فاضلاب و خاک یافت شده و قسمتی از فلور دهان، فارنکس و روده می باشد. در دانه ها و غذاهای تازه و یخ زده پیدا شده اند. تصور می شود که کلبسیلاها ارگانیسرها های بیماری زای فرصت طلبی هستند که باعث علائمی مانند پنومونی و عفونت قسمت های بالای سیستم تنفسی می شود. کلبسیلاها عامل بیماری و جزو اعضای گروه کلی فرم بوده و می توانند باعث فساد در مواد غذایی شوند. این باکتری ها از طریق غذا منتقل شده و ایجاد گاستروآنتریت می نماید (۲).

در حقیقت بیوفیلیم، گروهی از سلول های میکروبی است که با شبکه ای از کانال های داخلی در ماتریکس گلیکوپروتئینی و پلی ساکارییدی خارج سلولی به نام ماده پلی مریک خارج سلولی در ارتباط هستند. ماده

پلی مریک خارج سلولی نقش انتقال مواد غذایی، اتصال به سطوح و افزایش مقاومت به عوامل باکتری کش را دارد (۳). بیوفیلیم در سیستم های آب صنعتی، تجهیزات پزشکی و صنایع غذایی تشکیل می گردد (۴). بیوفیلیم ها با عوامل ضد باکتریایی مثل ضد عفونی کننده ها، حرارت، خشک کردن از بین نمی روند و بر روی سطح باقی می مانند و خصوصا در بیمارستان ها سبب آلودگی و انتقال بیماری های عفونی می گردند و به طور فیزیکی از باکتری ها در برابر سیستم ایمنی میزبان و آنتی بیوتیک ها محافظت می کنند این پدیده یکی از علل عود بیماری های عفونی می باشد (۵). با توجه به مشکلات گفته شده نانوذرات فلزی به عنوان عوامل ضد میکروبی موثرند و از آن ها برای نگهداری مواد غذایی و محافظت در محیط صنعتی استفاده می شود. نانوذرات با طراحی سطوحی می توانند از تشکیل بیوفیلیم جلوگیری کنند که این سطوح می تواند کلنی شدن باکتری ها و تشکیل بیوفیلیم را محدود کند (۶). عملکرد نانویی این سطوح با پوشش مواد نانویی بستر می تواند از چسبندگی باکتریایی و تشکیل بیوفیلیم جلوگیری نماید. بسیاری از نانوذرات دارای خواص ضد میکروبی هستند و فعالیت هایی ضد تشکیل بیوفیلیم را انجام و نمایش می دهند (۷).

اکسید روی ماده ای سفید رنگ است و یکی از غنی ترین نانو ساختارها می باشد. استفاده از نانو ذرات اکسید روی به عنوان یک عامل ضد باکتریایی در سیستم های غذا و پزشکی در مهار پاتوژن های خاص موثر است (۸). نانو ذرات اکسید روی که غیر سمی و سازگار با بدن هستند، فوایدی برای حمل دارو و مواد پزشکی دارند. نانو ذرات اکسید روی معمولا باعث نابودی چربی ها و سلول های باکتری با غشای قوی می شود و در نتیجه باعث تراوش محتوای درون سلولی و سرانجام مرگ سلول های باکتری ها می شود (۹).

از آنجایی که از بین بردن بیوفیلیم باکتریایی تشکیل شده روی سطوح، بسیار مشکل است و بیوفیلیم ها منبع



۵۰ میکرولیتر در شرایط استریل درون چاهک‌ها ریخته شد و پلیت‌ها به مدت ۱ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. در صورت مشاهده هاله عدم رشد باکتری، قطر هاله اندازه گیری شد (۱۱).

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC^۳) با استفاده از میکرودايلوشن

تهیه سوسپانسیون باکتریایی

برای تهیه سوسپانسیون $1/5 \times 10^6$ ابتدا ۱۰ میکرولیتر از کدورت نیم مک فالند را در ۱۹۰ میکرولیتر آب مقطر حل کرده و سپس ۲۰ میکرولیتر از رقت دوم را در ۱۸۰ میکرولیتر آب مقطر ریخته تا کدورت $1/5 \times 10^6$ به دست آمد.

MIC پایین ترین غلظت دارویی است که در آن هیچ رشد قابل مشاهده باکتریایی بعد از انکوباسیون دیده نمی شود. ولی رشد در محیط کنترل باید دیده شود. در این مطالعه از پلیت‌های ۹۶ خانه ای استفاده گردید. در داخل میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ای ۱۰ تا از خانه‌های ردیف اول با ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات پر شد. خانه ۱۱ با ۱۵۰ میکرولیتر محیط و سوسپانسیون باکتریایی پر شد و خانه ۱۲ با ۱۵۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات بدون باکتری و بدون نانوذرات پر شد.

سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات در خانه اول ریخته شد و بعد از خانه اول ۱۰۰ میکرولیتر بر داشته شد و در خانه دوم ریخته شد و به همین ترتیب تا خانه ۱۰ پیش رفتیم و ۱۰۰ میکرولیتر آخر را دور ریختیم. سپس به خانه‌های ردیف اول تا دهم ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی اضافه کردیم. سپس به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه قرار دادیم و بعد از گذشت زمان مورد نظر، رشد میکروبی از طریق طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری شد و کمترین

بالقوه آلودگی منجر به فساد مواد غذایی و انتقال عوامل بیماری‌ها می باشند، بنابراین ممانعت از تشکیل و یا حذف آن‌ها از سطوح در صنایع غذایی برای سلامت عمومی جامعه حائز اهمیت می باشد که در نتیجه در این تحقیق سعی شد با سنتز نانوذرات اکسید روی از تشکیل بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنمونیه جلوگیری شود.

مواد و روش کار

تهیه نانوذرات روی اکسید به روش مکانوشیمیایی^۱

۳ گرم استات روی و ۲ گرم اگزالیک اسید را درهاون ریخته و به مدت یک ساعت ساییده شد سپس در کوره ۴۵۰ درجه به مدت یک ساعت گذاشته شد، پودر سفیدی که به دست آمد نشان دهنده نانوذرات روی بود که برای اطمینان از حضور و ویژگی‌های نانو ذرات به بنیاد علوم کاربرد رازی در تهران فرستاده شد و نتایج بررسی گردید (۱۰).

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده اکسید روی

در این تحقیق بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی به دو روش چاهک گذاری و حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) انجام شد.

چاهک گذاری^۲

در این روش از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. ابتدا سوآب استریل را با سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک فالند به خوبی آغشته نموده و در سطح پلیت کشت چمنی داده شد. سپس با انتهای پیپت پاستور، چاهکی به قطر ۶ میلی متر ایجاد کرده و مقدار 5×10^5 میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذرات اکسید روی و در اندازه‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰ و

1. Mechanochemical
2. Well diffusion

3. Minimum Inhibitory Concentration



استفاده شد پلیت‌ها با استفاده از آب مقطر استریل تا خارج شدن کامل رنگ شست و شو داده شدند و در مجاورت هوا خشک شدند، سپس با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ متصل شده به باکتری‌های موجود در بیوفیلم را از آن‌ها جدا کرده و در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELIZA Reader حداکثر طول موج جذبی (OD)، هر چاهک خوانده شد (آزمایش سه بار تکرار شد) (۱۴ و ۱۵).

بررسی اثر مهار کنندگی از تشکیل بیوفیلم در باکتری کلبسیلا پنمونیه با روش میکروپلیت

روش اندازه گیری میزان تأثیر ضد بیوفیلمی به این صورت بود که ابتدا از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ای از جنس پلی استایرن استفاده شد به این ترتیب که مقدار ۲۰۰ میکرولیت از محیط کشت در داخل چاهک‌ها ریخته شد مقدار ۴۰ میکرولیت از رقت‌های مختلف نانو به چاهک‌ها اضافه شد و در نهایت مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی هم اضافه شد یکی از چاهک‌ها به عنوان شاهد دارای ۲۵۰ میکرولیت محیط و باکتری و یک چاهک دیگر به عنوان شاهد منفی دارای ۲۵۰ میکرولیت محیط بدون باکتری و بدون نانوذرات انتخاب شد.

سپس میکروپلیت‌ها در دو زمان متفاوت ۲۴ و ۴۸ ساعت در داخل انکوبه ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد و بعد از گذشت زمان‌های متوالی میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج و محتویات آن‌ها را به آرامی خالی کرده و برای حذف باکتری‌های متصل نشده، چاهک‌ها با استفاده از آب مقطر یک بار شست و شو داده شدند. در مرحله بعد باکتری‌های بیوفیلم در کف چاهک‌ها با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر متانول به مدت ۲۰ دقیقه ثابت شدند، سپس متانول باقی مانده را از پلیت‌ها خارج کرده و برای رنگ آمیزی از ۲۵۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه

غلظتی از نانو ذرات که مانع رشد باکتری مورد آزمایش شد به عنوان MIC گزارش گردید (آزمایش سه بار تکرار شد). غلظت مورد استفاده برای نانوذرات اکسید روی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. به این ترتیب که برای نانوذرات اکسید روی، 0/025 گرم از نانو ذرات اکسید روی در ۵۰ سی سی آب مقطر استریل حل شد تا رقت ۵۰۰ به دست آمد (۱۲ و ۱۳).

توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری کلبسیلا پنمونیه به روش میکروپلیت

توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری کلبسیلا پنمونیه با روش میکروپلیت انجام شد. به صورت خلاصه، ۱۸۰ میکرولیتر از سه محیط مختلف (برین هرت ایفیوژن براث، لوریا برتانی براث، تریپتون سوی براث) با سمپلر استریل درون چاهک‌های میکروپلیت ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت $1/5 \times 10^6$ در هر سه محیط به هر چاهک اضافه شد طوری که حجم محتویات هر چاهک به ۲۰۰ میکرولیتر رسید. از چاهک‌های ردیف آخر به عنوان شاهد منفی (بلانک) استفاده شده که حاوی فقط ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون باکتری در نظر گرفته شده بود. (به منظور کاهش خطا و ارائه تجزیه تحلیل قابل اعتماد نتایج، برای باکتری مورد آزمون حداقل سه چاهک در نظر گرفته شد).

سپس پلیت‌ها در ۵ متوالی روز و در دمای ۳۷ درجه بررسی شدند. بعد از گذشت زمان‌های متوالی میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج و محتویات آن‌ها را به آرامی خالی کرده و برای حذف باکتری‌های متصل نشده، چاهک‌ها با استفاده از آب مقطر یک بار شست و شو داده شدند. در مرحله بعد باکتری‌های بیوفیلم در کف چاهک‌ها با استفاده از ۱۵۰ میکرولیتر متانول به مدت ۲۰ دقیقه ثابت شدند، سپس متانول باقی مانده را از پلیت‌ها خارج کرده و برای رنگ آمیزی از ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه



چاهک‌ها با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر متانول به مدت ۲۰ دقیقه ثابت شدند، سپس متانول باقی مانده را از پلیت‌ها خارج کرده و برای رنگ آمیزی از ۲۵۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد پلیت‌ها با استفاده از آب مقطر استریل تا خارج شدن کامل رنگ شست و شو داده شدند و در مجاورت هوا خشک شدند، آن گاه با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اتانل ۹۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ متصل شده به باکتری‌های موجود در بیوفیلیم را از آن‌ها جدا کرده و در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELIZA Reader حداکثر طول موج جذبی (OD)، هر چاهک خوانده شد (آزمایش سه بار تکرار شد) رقت‌های استفاده شده در مهار بیوفیلیم برای نانوذرات روی اکسید ۲۵۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود (۱۳ و ۱۶). سپس نتایج مهار بیوفیلیم در رقت‌های مختلف نانوذرات بررسی شد.

بررسی اثر نانوذرات در حذف بیوفیلیم باکتری کلبسیلا پنمونیه با روش میکروپلیت

برای سنجش اثر این نانوذرات به منظور حذف و یا کشتن سلول‌های مولد بیوفیلیم، از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ای استفاده شد به این ترتیب که مقدار ۲۰۰ میکرولیت از محیط کشت در چاهک‌ها ریخته شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل $10^6 \times 1/5$ اضافه شد یکی از چاهک‌ها به عنوان شاهد دارای ۲۵۰ میکرولیت محیط و باکتری و یک چاهک دیگر به عنوان شاهد منفی دارای ۲۵۰ میکرولیت محیط بدون باکتری و بدون نانوذرات در نظر گرفته شد. سپس میکروپلیت‌ها در گرمخانه ۳۷ گذاشته شدند. بعد از گذشت مدت زمان معین برای تشکیل بیوفیلیم پاتوژن‌ها، میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج و مقدار ۴۰ میکرولیت از رقت‌های مختلف نانوذرات به آنها اضافه شد و بعد دوباره به مدت ۲۴ ساعت در انکوبه گذاشته شدند. سپس میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج و محتویات آن‌ها را به آرامی خالی کرده و چاهک‌ها با استفاده از آب مقطر یک بار شست و شو داده شدند تا تمامی باکتری‌های پلانکتونیک حذف گردند. در مرحله بعد باکتری‌های بیوفیلیم در کف

چاهک‌ها با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر متانول به مدت ۲۰ دقیقه ثابت شدند، سپس متانول باقی مانده را از پلیت‌ها خارج کرده و برای رنگ آمیزی از ۲۵۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد پلیت‌ها با استفاده از آب مقطر استریل تا خارج شدن کامل رنگ شست و شو داده شدند و در مجاورت هوا خشک شدند، آن گاه با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اتانل ۹۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ متصل شده به باکتری‌های موجود در بیوفیلیم را از آن‌ها جدا کرده و در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELIZA Reader حداکثر طول موج جذبی (OD)، هر چاهک خوانده شد (آزمایش سه بار تکرار شد) رقت‌های استفاده شده در حذف بیوفیلیم برای نانوذرات اکسید روی ۲۵۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد (۱۳ و ۱۷).

سنجش میزان تشکیل بیوفیلیم

وضعیت تشکیل بیوفیلیم در چاهک‌ها نیز طبق فرمول زیر محاسبه گردید که در آن ODC میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل و ODT میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار شده می باشد (۱۹).

عدم تشکیل بیوفیلیم $OD \leq ODC$

قدرت تشکیل بیوفیلیم ضعیف $ODC < OD \leq (2 \times ODC)$

قدرت تشکیل بیوفیلیم متوسط $(2 \times ODC) < OD \leq (4 \times ODC)$

قدرت تشکیل بیوفیلیم قوی $(4 \times ODC) < OD$

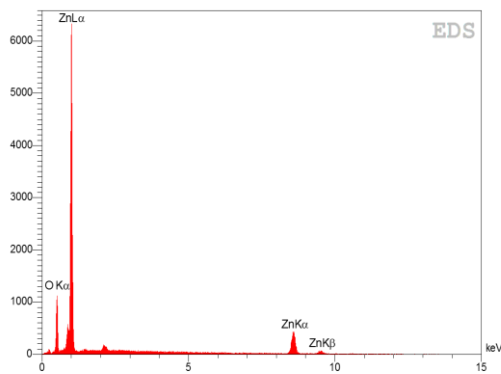
سنجش درصد کاهش تشکیل بیوفیلیم

سنجش کارایی ترکیب ضد میکروبی یا درصد کاهش بیوفیلیم را می توان از طریق جذب نوری چاهک‌های تیمار شده، کنترل و شاهد با توجه به رابطه زیر محاسبه نمود که در این رابطه ODC، میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل ODB، میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد و ODT میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار شده است (۱۹).



تأیید نانوذرات روی اکسید به روش طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)^۳

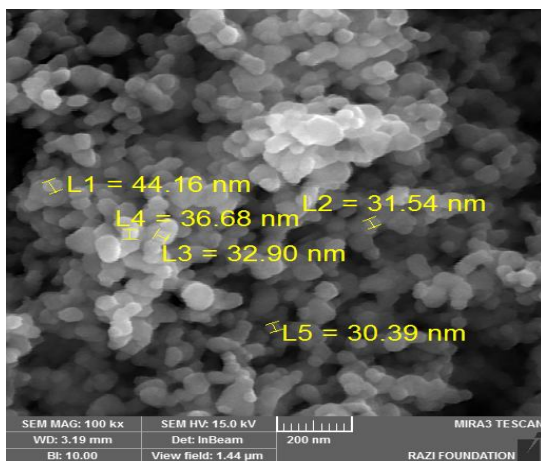
شکل ۳ طیف EDX را نشان می دهد که نانوذرات روی اکسید بیشترین ترکیب را در بین مواد ساخته شده دارد.



شکل ۳- طیف EDX نانوذرات روی اکسید

تأیید نانوذرات روی اکسید توسط میکروسکوپ الکترونی ریشی (SEM)^۴

بعد از آماده سازی نانوذرات روی اکسید نتایج آن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ریشی تأیید گردید که بنابر نتایج به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی ریشی نانوذرات دارای ساختار کروی با ابعاد حدود ۳۰ نانومتر می باشند.



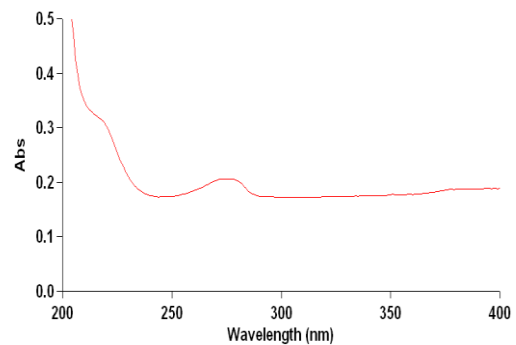
شکل ۴- نانوذرات روی اکسید توسط میکروسکوپ الکترونی ریشی SEM

$$\% \text{ بیوفیلیم میزان کاهش} = \frac{((\text{ODC}-\text{ODB}) - (\text{ODT}-\text{ODB}))}{(\text{ODC}-\text{ODB})} \times 100$$

نتایج

تأیید نانوذرات روی اکسید به روش طیف نگاری جذبی فرابنفش و مرئی (UV-Vis)^۱

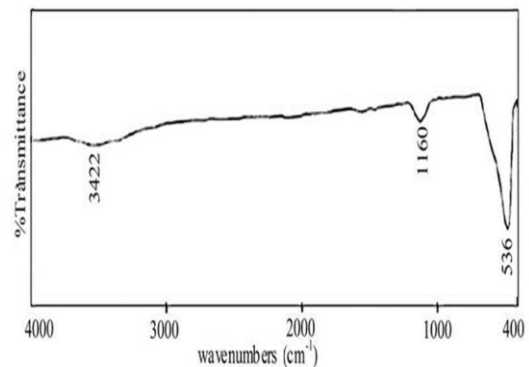
شکل ۱ طیف UV نانوذرات روی اکسید را نشان می دهد که در ۲۷۵ نانومتر پیک داده است و یکی از مشخصه های نانوذرات روی اکسید می باشد.



شکل ۱- طیف UV نانوذرات روی اکسید

تأیید نانوذرات روی اکسید به روش طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)^۲

شکل ۲ نوار جذبی موجود در ۵۳۶ را نشان می دهد که مربوط به فرکانس جذب پیوند Zn-O می باشد که این نوار جذبی از مشخصه های نانوذرات روی اکسید می باشد.



شکل ۲- طیف FT-IR نانوذرات روی اکسید

3. Energy dispersive x ray (EDX)
4. Scanning Electron Microscop (SEM)

1. Ultra violet|visible spectroscopy (UV-Vis)
2. Fourier transformation infrared (FT-IR)



فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی

فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی بر روی باکتری بیماریزای کلبسیلا پنمونیه به دو روش چاهک گذاری و حداقل غلظت مهارکنندگی مورد بررسی قرار گرفت.

روش چاهک گذاری

روش چاهک گذاری برای نانوذرات اکسید روی با غلظت 5×10^5 میکروگرم بر میلی لیتر در اندازه‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر انجام شد.

چاهک گذاری نانوذرات اکسید روی

جدول ۱ نتایج حاصل از چاهک گذاری نانوذرات اکسید روی و اندازه قطر هاله ی عدم رشد را نشان می‌دهد که باکتری بیماریزا کلبسیلا پنمونیه در بهترین حالت، بیشترین قطر هاله عدم رشد آن ۱۹ میلی متر مشاهده شد.

جدول ۱- قطر هاله ی عدم رشد توسط نانو ذرات روی اکسید

مقدار نانو ذرات	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰
میکرولیتر	۱۷	۱۸	۱۸	۱۹
میکرولیتر	۱۷	۱۸	۱۸	۱۹
میکرولیتر	۱۷	۱۸	۱۸	۱۹
میکرولیتر	۱۷	۱۸	۱۸	۱۹
کلبسیلا پنمونیه	۱۷ mm	۱۸ mm	۱۸ mm	۱۹ mm

روش حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) توسط نانوذرات اکسید روی

روش حداقل غلظت مهار کنندگی توسط نانوذرات اکسید روی بر روی باکتری کلبسیلا پنمونیه انجام شد. در این تحقیق غلظت مورد استفاده برای نانوذرات اکسید روی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد (علامت مثبت نشان دهنده رشد باکتری و علامت منفی نشان دهنده عدم رشد باکتری می باشد)(۲۰).

جدول ۲- نتایج حاصل از حداقل غلظت مهار کنندگی توسط نانوذرات روی اکسید

چاهک	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
کلبسیلا پنمونیه	0/150	0/165	0/184	0/235	0/255	0/286	0/303	0/318	0/355	0/356	0/378	کنترل شده
باکتری بیماریزا	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	کنترل شده

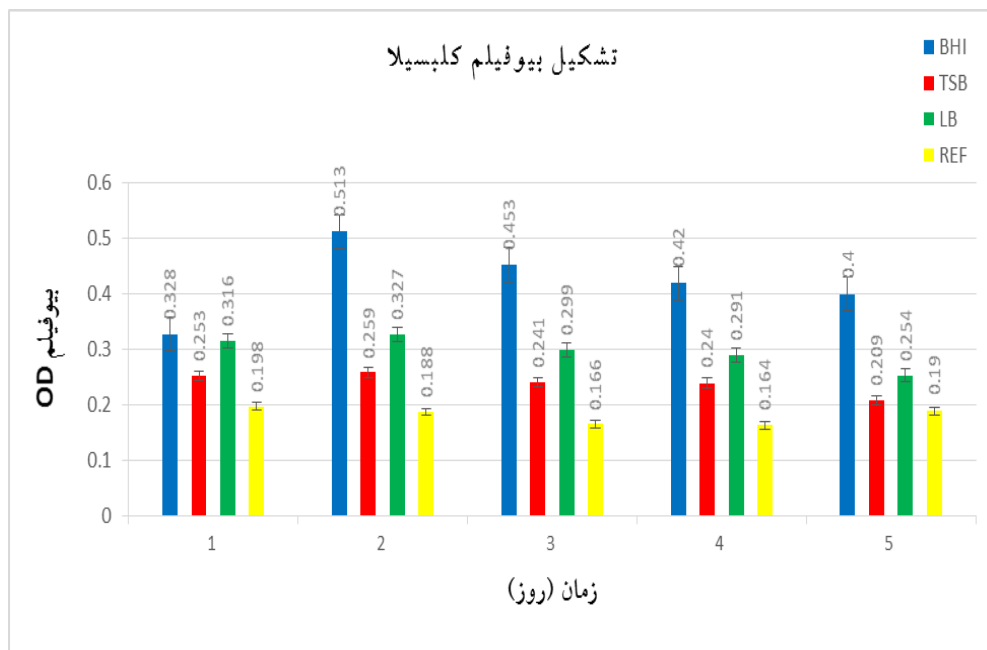
تشکیل بیوفیلم در باکتری کلبسیلا پنمونیه

تشکیل بیوفیلم در ۵ روز متوالی و در سه محیط کشت (برین هرت ایفیوژن براث، تریپتون سوی براث، لوریا برتانی براث) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بر روی باکتری کلبسیلا پنمونیه انجام شد که بهترین شرایط تشکیل بیوفیلم در کلبسیلا پنمونیه در محیط کشت برین هرت ایفیوژن براث و مدت زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد.

جدول ۳- تشکیل بیوفیلم کلبسیلا پنمونیه در ۵ روز متوالی و سه محیط کشت مختلف

محیط	روز	۱	۲	۳	۴	۵	کنترل شده
برین هرت ایفیوژن براث	0/328	0/513	0/453	0/420	0/400	0/198	کنترل شده
تریپتون سوی براث	0/253	0/259	0/241	0/240	0/209	0/188	کنترل شده
لوریا برتانی براث	0/316	0/327	0/299	0/291	0/254	0/166	کنترل شده





شکل ۵- نمودار حاصل از تشکیل بیوفیلم کلبسیلا پنمونیه در ۵ روز متوالی و سه محیط کشت مختلف

میلی لیتر بر روی باکتری کلبسیلا پنمونیه انجام شد که در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر مهار ۹۸٪ را داشته است.

مهار بیوفیلم کلبسیلا پنمونیه توسط نانو ذرات اکسید روی

مهار بیوفیلم توسط نانوذرات روی اکسید با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر

جدول ۴- مهار بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنمونیه توسط نانوذرات روی اکسید

کنترل شده	تیمار شده	۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر	۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر	۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر	۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر	۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر	رفت
0/176	0/551	0/349	0/306	0/293	0/222	0/180	کلبسیلا پنمونیه
		٪۵۳	٪۶۵	٪۶۸	٪۸۷	٪۹۸	و درصد کاهش بیوفیلم

میکروگرم بر میلی لیتر بر روی باکتری کلبسیلا پنمونیه انجام شد که با توجه به جدول ۵ در غلظت‌های بالاتر باعث حذف ۱۰۰٪ باکتری مورد آزمون شد.

حذف بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنمونیه توسط نانوذرات اکسید روی

حذف بیوفیلم توسط نانوذرات روی اکسید با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰



جدول ۵- حذف بیوفیلم باکتری کلبسیلا پئمونه توسط نانوذرات روی اکسید

رقت	۵۰۰	۲۵۰	۲۰۰	۱۵۰	۱۰۰	۵۰	تیمار شده	کنترل شده
کلبسیلا پئمونه	میکروگرم بر میلی لیتر	میکروگرم بر میلی لیتر	میکروگرم بر میلی لیتر	میکروگرم بر میلی لیتر	میکروگرم بر میلی لیتر	میکروگرم بر میلی لیتر		
	0/174	0/177	0/206	0/243	0/368	0/402	0/543	0/197

شد و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر توانست بیوفیلم تشکیل شده را از بین ببرد.

ردی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی در برابر رشد باکتری کلبسیلا پئمونه، نانوذرات اکسید روی را به روش رسوب و اصلاح سطح سنتز کردند و ویژگی‌های آن را به روش میکروسکوپ الکترونی ریشی (SEM) و طیف سنج پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) تعیین کردند که ابعاد به دست آمده از نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط آنان، ۲۰-۴۰ نانومتر مشاهده شده است (۲۰).

حامد و همکاران در سال ۲۰۱۶ در بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی در شرایط آزمایشگاهی علیه سویه‌های اشرشیاکلی و کلبسیلا پئمونه مقاوم به آنتی بیوتیک از نوع ESBL را ارزیابی کردند که این نانوذرات را به روش ته نشینی سنتز کردند که در مواد اولیه این روش نیترات روی و هیدروکسید سدیم به کار گرفته شده بود. تأییدیه این نانوذرات را با استفاده از روش‌های میکروسکوپ الکترونی ریشی (SEM)، طیف سنج پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) و طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) تعیین کردند که ابعاد به دست آمده از نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط آنان، ۱۰ نانومتر مشاهده شده است (۲۲).

قربانی و همکاران در سال ۲۰۱۵ در بررسی سنتز نانوذرات اکسید روی به روش بارش از مواد اولیه نیترات روی و پتاسیم هیدروکسید استفاده کردند

بحث و نتیجه گیری

نانوذرات اکسید روی، یکی از مهم ترین نانوذرات سنتز شده است که در بسیاری از کشورها در مقیاس صنعتی استفاده می شود. نانوذره ی اکسید روی ترکیبی غیرآلی محلول درآب است که خواص ضد باکتری و ضد قارچی آن به اثبات رسیده است. این نانو ذره با اتصال به غشای میکروارگانیسم‌ها فاز تاخیری چرخه ی رشد را طولانی کرده و سبب طولانی شدن مدت زمان جوانه زنی ارگانیسم‌ها می شود. قارچ‌ها پس از ۱۲۰ دقیقه تماس با اکسید روی تخریب می شوند (21).

در این تحقیق نانوذرات روی اکسید به روش مکانوشیمیایی سنتز شد که در این روش از مواد اولیه اگزالیک اسید و استات روی استفاده گردید. تأییدیه این نانوذرات با استفاده از روش‌های طیف نگاری جذبی فرابنفش مرئی (UV-Vis)، طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، طیف سنج پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) و میکروسکوپ الکترونی ریشی (SEM) انجام شد که نانوذرات به دست آمده دارای ساختار کروی با ابعاد حدود ۳۰ نانومتر مشاهده شدند.

در پژوهش حاضر اثر نانوذرات اکسید روی در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم کلبسیلا پئمونه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به خوبی نشان داد که نانوذرات اکسید روی می توانند مانع تشکیل بیوفیلم این باکتری شوند. نانو ذرات اکسید روی در غلظت ۵۰ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر مانع تشکیل بیوفیلم



لیتر تشکیل بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنومونیه را به میزان ۹۸٪ مهار کند.

ردی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی در برابر رشد باکتری کلبسیلا پنومونیه، مشاهده کردند که طبق منحنی رشد استاندارد، نانوذرات اکسید روی پس از ۴ ساعت می تواند کلبسیلا پنومیه را مهار کند. نتایج آنان نشان داد که نانوذرات اکسید روی می تواند با استفاده از روش حداقل غلظت مهار کنندگی به روش رقت در لوله، باعث مهار کلبسیلا پنومونیه شود. آنان همچنین به این نتیجه رسیدند که این نانوذرات دارای کاربرد بالقوه در بیوتکنولوژی هستند (۲۰).

حذف ناقص بیوفیلم موجب رشد مجدد قسمت باقی مانده بیوفیلم روی سطوحی که هنوز دارای تعدادی سلول‌های زنده هستند، می گردد. این پدیده باعث می شود که میکروارگانیسم‌ها بعد از گذشت مدت زمان کوتاهی به حالت اولیه خود برگردند، ساختمان خود را تعمیر کنند و دوباره سبب آلودگی سیستم شوند. از این رو توجه به این نکته ضروری است که بعد از اثر عوامل ضد میکروبی چه میزان و یا چه تعداد از سلول‌های بیوفیلم هنوز زنده هستند و توانایی رشد و تکثیر را دارند (۲۴).

در پژوهش حاضر در بررسی حذف بیوفیلم، غلظت‌های مورد استفاده از نانوذرات اکسید روی ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد و اثر نانوذرات اکسید روی در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به خوبی نشان داد که نانوذرات اکسید روی می تواند مانع تشکیل بیوفیلم این باکتری شوند. نانو ذرات اکسید روی در غلظت ۵۰ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر مانع تشکیل بیوفیلم شد و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر توانست بیوفیلم تشکیل شده را از بین ببرد.

سپس تأییدیه نانوذرات اکسید روی را با روش‌های طیف نگاری جذبی فرابنفش مرئی (UV-Vis)، پراکندگی نور دینامیکی (DLS) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تعیین کردند که ابعاد به دست آمده از نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط آنان، ۳۰-۱۵ نانومتر مشاهده شده است (۲۳).

اختلاف در مقادیر به دست آمده از نانو ذرات مربوط به تفاوت در روش سنتز نانوذرات و همچنین مواد اولیه به کار برده شده در روش سنتز می باشد. هر نوع از مواد نانو با توجه به ویژگیهایی مانند اندازه، شکل، نوع ترکیب سورفکتانت، پایدار کننده و روش تهیه منحصر به خود هستند و این ویژگیهای نانوذرات بر خاصیت ضد میکروبی آنها اثر دارد. که ما در این تحقیق موفق شدیم نانوذره ای با بهترین عملکرد سنتز کنیم.

در تحقیق حاضر، ارزیابی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی سنتز شده بر روی کلبسیلا پنومونیه با استفاده از دو روش چاهک گذاری و حداقل غلظت مهار کنندگی انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که نانوذرات اکسید روی به روش چاهک گذاری با مقادیر ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر از نانوذرات بر روی کلبسیلا پنومونیه انجام شد که در بهترین حالت، بیشترین قطر هاله عدم رشد آن ۱۹ میلی متر مشاهده شد و همچنین در ارزیابی روش حداقل غلظت مهار کنندگی بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر، اثر نانوذرات اکسید روی بر کلبسیلا پنومونیه ۸/۳۳ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد که با توجه به نتایج به دست آمده از این دو روش نانوذرات اکسید روی دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی باکتری کلبسیلا پنومونیه بوده است. در بررسی فعالیت مهار کنندگی تشکیل بیوفیلم، از نانوذرات اکسید روی در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. نتایج نشان داد نانوذرات اکسید روی سنتز شده بخوبی می تواند در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی



نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد نانوذرات اکسید روی علاوه بر اینکه اثر مهاری بالایی در تشکیل بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنمونیه دارد، به خوبی میتواند به منظور حذف بیوفیلم این باکتری در صنایع غذایی و پزشکی بکار گرفته شود. طبق بررسی‌های انجام شده، تاکنون تحقیقی مبنی بر اثر ضد بیوفیلمی علیه باکتری کلبسیلا پنمونیه در داخل کشور انجام نشده بود و از آنجایی که از بین بردن بیوفیلم باکتریایی تشکیل شده روی سطوح، بسیار مشکل است و بیوفیلیم‌ها منبع بالقوه آلودگی منجر به فساد مواد غذایی و انتقال عوامل

بیماری‌ها می باشند، بنابراین ممانعت از تشکیل و یا حذف آن‌ها از سطوح در صنایع غذایی برای سلامت عمومی جامعه حائز اهمیت می باشد که در نتیجه در با توجه به بروز بودن پژوهش انجام شده سعی شد با سنتز شیمیایی نانوذرات اکسید روی از تشکیل بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنمونیه جلوگیری شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی قم انجام شده است که بدین وسیله از مسئولین محترم این دانشگاه تشکر و قدردانی می شود.



منابع و مآخذ

1. Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Yeiser, B., Bonomo, M. D., Rice, L. B., & Bonomo, R. A. (2003). Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(11), 3554-3560.
2. Guo, Y., Zhou, H., Qin, L., Pang, Z., Qin, T., Ren, H., ... & Zhou, J. (2016). Frequency, Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of *Klebsiella pneumoniae* in Food Samples. *PloS one*, 11(4), e0153561.
3. Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
4. Trachoo, N. (2003). Biofilms and the food industry. *Biofilms*, 25(6), 808.
5. Hoyle, B. D., & Costerton, J. W. (1991). Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. In *Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques* (pp. 91-105). Birkhäuser Basel.
6. Aswathanarayan, J. B., & Vittal, R. R. (2013). Microbial biofilms and their control by various antimicrobial strategies. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Microbial Pathogens and strategies for combating them: Science, Technology and Education* (pp. 124-133). Formatex Badajoz.
7. Lellouche, J., Friedman, A., Gedanken, A., & Banin, E. (2012). Antibacterial and antibiofilm properties of yttrium fluoride nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 7, 5611-5624.
8. Mirhosseini, M., & Firouzabadi, F. B. (2013). Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens. *International Journal of Dairy Technology*, 66(2), 291-295.
9. Liu, Y., He, L., Mustapha, A., Li, H., Hu, Z. Q., & Lin, M. (2009). Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of applied microbiology*, 107(4), 1193-1201.
10. Shen, L., Bao, N., Yanagisawa, K., Domen, K., Gupta, A., & Grimes, C. A. (2006). Direct synthesis of ZnO nanoparticles by a solution-free mechanochemical reaction. *Nanotechnology*, 17(20), 5117.
11. Lertcanawanichakul, M., & Sawangnop, S. (2011). A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 5(2), 161-171.
12. Glamoclija, J. M., Sokovic, M. D., Siljegovic, J. D., Ristic, M. S., Ciric, A., & Grubisic, D. V. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Echinophora spinosa* L.(Apiaceae) essential oil. *Records of Natural Products*, 5(4), 319.
13. Khiralla, G. M., & El-Deeb, B. A. (2015). Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1001-1007.
14. Palanisamy, N. K., Ferina, N., Amirulhusni, A. N., Mohd-Zain, Z., Hussaini, J., Ping, L. J., & Durairaj, R. (2014). Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of nanobiotechnology*, 12(1), 2.
15. Kalpana, B. J., Aarthy, S., & Pandian, S. K. (2012). Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(6), 1778-1794.
16. Duarte, A., Alves, A. C., Ferreira, S., Silva, F., & Domingues, F. C. (2015). Resveratrol inclusion complexes: antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. *Food Research International*, 77, 244-250.
17. Mortazavi, H., Nakhaei Moghaddam, M., & Abadi, N. S. (2015). Study of the Effect of Silver



- Nanoparticles on Biofilms Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 14(2), 125-136.
18. Dheilly, A., Soum-Soutéra, E., Klein, G. L., Bazire, A., Compère, C., Haras, D., & Dufour, A. (2010). Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. *Applied and environmental microbiology*, 76(11), 3452-3461.
19. Habibipour, R., & Moradi Haghgou, L. (2015). Study on Hydro-Alcoholic Extract Effect of Pomegranate Peel on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences*, 22(3), 195-202.
20. Reddy, L.S., Nisha, M.M., Joice, M. and Shilpa, P.N., 2014. Antimicrobial activity of zinc oxide (ZnO) nanoparticle against *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmaceutical biology*, 52(11), pp.1388-1397.
21. Darabi, N., Roudbar Mohammadi, S., Naderi Manesh, H., Mostafai, A., & Vahidi, M. (2012). Antifungal effect of Zinc oxide nano_particles of the standard strains of *Candida albicans* biofilm growth on catheters. *Ann Mil Health Sci Res*, 10(3), 207-212.
22. Hameed, A.S.H., Karthikeyan, C., Ahamed, A.P., Thajuddin, N., Alharbi, N.S., Alharbi, S.A. and Ravi, G., 2016. In vitro antibacterial activity of ZnO and Nd doped ZnO nanoparticles against ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific reports*, 6, p.24312.
23. Ghorbani, H.R., Mehr, F.P., Pazoki, H. and Rahmani, B.M., 2015. Synthesis of ZnO nanoparticles by precipitation method. *Oriental Journal of Chemistry*, 31(2), pp.1219-1221.
24. Mortazavi, H., Nakhaei Moghaddam, M. and Abadi, N.S., 2015. Study of the Effect of Silver Nanoparticles on Biofilms Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 14(2), pp.125-136.

