



Original Article

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات CrO و CoFe_2O_4 روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوسصابر ایمانی^{۱*}، زهرا زاغری^۲، سعید رضایی زارچی^۳، علی محمد زند^۴، محمد دورودیان^۵، حسین بری ابرقوی^۶، فاطمه لطفی^۶

۱- مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) و مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، یزد، ایران.

۴- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.

۵- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران.

۶- گروه پلیمر، دانشکده مواد، دانشگاه تهران، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۸/۲۹

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۸/۲

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از نانوذرات اکسید فلزی جهت مقابله با عفونت‌های باکتریایی به عنوان روش جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند موثر باشد. در این تحقیق خواص ضد باکتریایی نانومواد CrO و CoFe_2O_4 علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، به عنوان یکی از باکتری‌های بیماری‌زای مهم و شایع، برای رسیدن به ظروف استریل نانویی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها: در مرحله اول غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ درصد از هر کدام از نانوذرات با بررسی OD محیط کشت به طور جداگانه بررسی شد. جهت دستیابی به بهترین ترکیب باکتری کشی درصدهای مختلفی از هر دو نانوذره نیز با هم بررسی شدند. سینتیک کشندگی نانوذرات در دوره‌های زمانی ۲ ساعته محاسبه شده و با قدرت سایر آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقایسه گردید. نسبت حداقل غلظت مهارکنندگی رشد به حداقل غلظت کشندگی (MIC/MBC) برای نشان دادن قدرت باکتری کشی نانوذرات به روش رقیق سازی میکروبی (Microdilution) محاسبه شد.

نتایج: بهترین غلظت از نانوذره که بالاترین خاصیت باکتری کشی را دارد در حضور غلظت ۱٪ از CrO بدست آمد که چگالی نوری محیط کشت استافیلوکوکوس اورئوس را نسبت به گروه کنترل ۴/۶ برابر کاهش داده بود ($p < 0.001$). نسبت ۷۰٪ کروم به ۳۰٪ اکسید آهن بهترین خاصیت باکتری استاتیکی را داشت که کاهش ۳/۳ در OD در مقایسه با گروه کنترل داشت ($p < 0.05$). بهترین سینتیک کشندگی با نرخ زنده ماندن در حضور ۱٪ CrO و CoFe_2O_4 ، به ترتیب ۲۴ و ۳۶ ساعت به‌دست آمد. قدرت باکتری کشی نانوذرات CrO و CoFe_2O_4 در غلظت بحرانی ۱٪ به ترتیب حدود ۶۷ و ۵۶ درصد به‌دست آمد. نسبت MIC/MBC برای دو نانوذره CrO و CoFe_2O_4 به ترتیب حدود ۰/۲ و ۰/۴ به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که نانوذره CrO در مقایسه با نانوذره CoFe_2O_4 از قدرت باکتری کشی بالاتری برای مقابله با استافیلوکوکوس اورئوس برخوردار است؛ لذا در صورت تکمیل این آزمایشات از تلفیق نانوذرات اکسید فلزی در محیط‌هایی حساسی چون ظروف نگهداری مواد خوراکی و ... می‌توان استفاده نمود.

کلمات کلیدی: نانوذرات فلزی CrO و CoFe_2O_4 ، اثر ضد باکتریایی، استافیلوکوکوس اورئوس

مقدمه

یک روش نوظهور در پیشرفت علم داروسازی مدرن به حساب می‌آیند که به علت داشتن پتانسیل بالا جهت انجام فرآیندهای درمانی اختصاصی، در مطالعات زیست‌شناسی و داروسازی، کاربرد فراوان دارند. برای مثال، آن‌ها قادرند در زمانی کمتر از ۴ ساعت، ۶۵۰ سلول سرطانی را از بین ببرند (۷ و ۸).

نانومواد در چرخه حیات و اکوسیستم، پایین‌ترین سطح سمیت را از خود نشان داده‌اند لذا استفاده از این مواد برای مبارزه با میکروب‌های بیماری‌زا می‌تواند انتخاب مناسبی باشد. در مطالعات صورت گرفته نشان داده شده است که نانوذراتی چون Zn، Ti، Ag و Cr و اکسید آن‌ها خاصیت باکتری کشی بالایی دارند (۹).

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (S. aureus) یکی از باکتری‌های

این باور که نانو تکنولوژی عصر دیگری از علوم است و تلفیقی از مهندسی و زیست‌شناسی، شیمی، پزشکی و فیزیک می‌باشد را عموم دانشمندان پذیرفته‌اند (۱). بررسی‌ها نشان داده است که هر چه اندازه نانوذرات کوچک‌تر باشد، خصوصیات و فعالیت‌های جدید و متفاوت‌تری از خود نشان می‌دهند. این ویژگی‌ها باعث شده است که امروزه سرعت استفاده از نانومواد بسیار سریع گسترش پیدا کند به طوری که در تمام ابعاد زندگی همچون سیستم‌های الکتریکی، مبارزه با میکروب‌ها، تشخیص و درمان بیماری‌ها کاربرد آن شناخته شود (۲، ۳ و ۴).

از گذشته نانوذرات در دو بخش فلزی و غیر فلزی مورد بحث قرار می‌گرفته‌اند (۵). نانوذرات فلزی در حشره کش‌ها و باکتری کش‌ها سال‌هاست مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶). برخی از نانوذرات به عنوان

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱ ۸۲۴۸۲۵۰۲
Email: Imani.saber@yahoo.com

مواد و روش‌ها

مواد و سوش باکتری مورد بررسی: برای این مطالعه سوش باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29213) استفاده گردید. جهت رشد از محیط‌های کشت آگار مغذی (E. Merck Co; Darmstadt, Germany)، برای غنی سازی باکتری از تریپتوز سوی براث (E. Merck Co; Darmstadt, Germany) و جهت شمارش کلنی از محیط کشت Plate Count Agar (E. Merck Co; Darmstadt, Germany) استفاده شد.

تهیه نانوذرات: نانوذرات مورد بررسی از شرکت Nanoshell آمریکا خریداری شدند. جهت بررسی سایزبندی نانوذرات، عکس TEM به وسیله میکروسکوپ الکترونی فیلیپس مدل H987 گرفته شد تا سایز نانوذرات برای ما تایید شود. جهت توزیع نانوذرات در محیط کشت، محلول نانوذرات قبل از مصرف روی شیکر قرار داده می‌شدند و بعد از تلقیح نیز در انکوباتور شیکر دار کشت صورت می‌گرفت. همچنین مقدار نانوذرات مورد تلقیح در حدی نبود که رسوب بدهد یا توزیع یکنواخت نداشته باشد.

بررسی غلظت بحرانی و تأثیرگذاری نانوذرات: در کل از سه روش مختلف برای بررسی تأثیر این نانوذرات بر روی باکتری هدف استفاده شد. ابتدا اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات CoFe₂O₄ و CrO بررسی شد. بعد از اضافه نمودن نانوذرات، چگالی نوری (OD) باکتری‌ها در شاهد و تست در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (MILTON ROY Co; Spectrum 21) اندازه گیری شد. در ابتدا ۲ میلی لیتر از کشت شبانه استافیلوکوکوس اورئوس از محیط منبع (Stock) به ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت دارای ۰/۲٪، ۰/۴٪، ۰/۶٪، ۰/۸٪ و ۱٪ از هر کدام از نانوذرات CoFe₂O₄ و CrO به طور جداگانه تلقیح گردید. با درصدهای مختلفی (30% 70% CrO) CoFe₂O₄ + و برعکس) از هر دو نانوذره نیز این کار انجام شد. هر ۵ رقت از غلظت‌های مختلف نانوذرات دارای سه نمونه بود. البته در کنار آن، در نمونه‌های شاهد که فاقد نانوذرات فوق بودند نیز عمل تلقیح انجام گرفت. سپس نمونه‌ها جهت رشد در گرم خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. این آزمایش سه مرتبه تکرار شد و میانگین نتایج گزارش گردید. نسبت حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) به حداقل غلظت کشندگی (MBC) از رشد باکتری برای هر دو نانوذره به روش رقیق سازی میکروبی انجام گرفت.

بررسی سینتیک کشندگی نانوذرات: در روش دیگر، اثرات باکتری کشی نانوذرات در محیط مایع بررسی شد. کشت محلول شبانه از استافیلوکوکوس اورئوس را سانتریفیوژ نموده و سلول‌های ته نشین شده را سه بار با آب دو بار تقطیر شستشو داده و سپس برای پیدا نمودن غلظت اولیه سلول‌ها از رابطه $6/3 \log cfu/ml$ استفاده گردید. در هر نمونه فلاسک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و غلظت نهایی باکتری در آب دو بار تقطیر به حالت معلق درآورده شد و سپس مقدار متفاوت از نانوذرات CoFe₂O₄ و CrO (۰/۲٪، ۰/۴٪، ۰/۶٪، ۰/۸٪ و ۱٪) جداگانه به سلول‌های باکتری معلق شده افزوده شد و در گرم خانه شیکردار در دمای

بیماری‌زای مهم و موثر در عفونت‌های بیمارستانی است. این باکتری در همه سطوح بیمارستان شناخته شده است (۱۰) و بیماری‌های زیادی مانند، عفونت‌های پوستی، دمل، کورک، زرد زخم، آندوکاردیت، مننژیت و آبسه‌های مغزی را به وجود می‌آورند. مقاومت آنتی بیوتیکی یکی از مشکلاتی است که برای از بین بردن این باکتری‌ها بسیار مطرح است لذا نانومواد به عنوان مواد مناسب برای مهار و از بین بردن این باکتری می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (۱۱).

نانوذرات اکسید فلزی، بر اساس نسبت سطح به حجم، خاصیت ضد باکتریایی متفاوتی از خود نشان می‌دهند. باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی در مقابل نانوذرات فلزی، مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند که این می‌تواند به ساختار دیواره سلولی ارتباط داشته باشد.

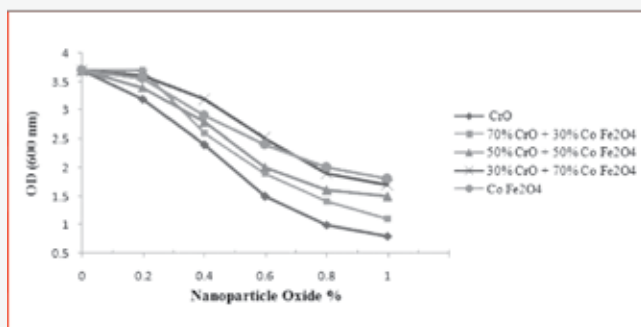
تحقیقات متعدد، مبتنی بر واکنش‌های احتمالی بین نانوذرات با ماکرومولکول‌های موجودات زنده انجام گرفته است. اختلاف بین بار منفی میکروارگانیسم و بار مثبت نانوذره، به صورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذره عمل کرده و باعث اتصال نانوذره به سطح سلول شده و در نتیجه می‌تواند باعث مرگ سلول شود. در نهایت تعداد زیادی از این تماس‌ها منجر به اکسید شدن مولکول‌های سطحی میکروب‌ها و مرگ سریع آن‌ها می‌شوند. احتمال داده می‌شود یون‌های آزاد شده از نانومواد با گروه‌های تیول (-SH) پروتئین‌های سطحی سلول‌های باکتریایی واکنش دهند. تعدادی از این پروتئین‌های غشای سلول‌های باکتریایی عمل انتقال مواد معدنی از سطح دیواره را به عهده دارند؛ که نانومواد با اثر بر روی این پروتئین‌ها باعث غیر فعال شدن و نفوذ ناپذیری غشاء می‌شوند (۱۷). غیر فعال شدن تراوایی غشاء در نهایت باعث مرگ سلول می‌شود. همچنین نانومواد چسبیدن سلول باکتری و تشکیل بیوفیلم را به تأخیر می‌اندازند که این عمل باعث می‌شود گروهی از باکتری‌ها نتوانند تثبیت شوند و تکثیر یابند (۱۸).

تغییرات ضد میکروبی که از رشد باکتری بیماری‌زا ممانعت می‌کنند، یک هدف مطلوب محسوب می‌شود. عوامل ایجاد کننده عفونت‌ها می‌توانند متعدد باشند. تشکیل کلنی، رشد سلول باکتری و تشکیل ماتریکس‌های بیوفیلمی فشرده میکروبی، باکتری‌ها را در مقابل سیستم دفاعی میزبان مقاوم می‌کند؛ که نانوذرات از تشکیل این عوامل دفاعی میکروب در برابر سیستم ایمنی میزبان جلوگیری می‌کند. نانومواد که پایه آن‌ها از یون‌های فلزی است، دارای فعالیت سلول کشی گسترده‌ای هستند که علیه باکتری، قارچ و ویروس فعالیت دارند. نانومواد و به خصوص نانومواد فلزی به علت داشتن بار سطحی و نسبت سطح به حجم خود، آنزیم‌ها و DNA میکرو ارگانیسم‌ها را با تعادل الکترون بین گروه‌های دهنده الکترون مثل تیول، کربوکسیلات، آمید، ایمیدازول، اندول و هیدروکسیل غیر فعال می‌نمایند (۲۳ و ۲۴).

در این مقاله فاکتورهایی مثل کم‌ترین زمان اثر، نسبت MIC/MBC جهت فرموله نمودن فعالیت‌های کلینیکی جهت درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری، مقایسه گردید تا بتوان در آینده نه چندان دور با استفاده از این نانوذرات در صنعت بسته بندی، نگهداری و حمل و نقل مواد غذایی علیه باکتری‌های بیماری‌زای مهم بهره جست.

CoFe_2O_4 ، چگالی نوری باکتری مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل تقریباً ۱/۹ بار کمتر شده است. اما این کاهش برای حالت‌های ترکیب از هر دو نانوذره متفاوت بوده است به صورتی که در حضور ترکیب برابر از هر دو ذره در غلظت ۱٪ مخلوط نسبت به گروه کنترل کاهش ۲/۴ برابری OD را در بر داشت ولی همین کاهش برای ترکیب ۷۰٪ کروم به ۳۰٪ اکسید آهن کاهش ۳/۳ برابری و برای ترکیب ۳۰٪ کروم به ۷۰٪ اکسید آهن ۲/۱ برابر کاهش را در بر داشت ($p < 0.05$). این آزمایش برای غلظت‌های مورد مطالعه سه مرتبه تکرار شد و میانگین نتایج گزارش گردید. نسبت حداقل غلظت مهارکنندگی رشد به حداقل غلظت کشندگی از رشد باکتری (MIC/MBC) برای دو نانوذره مس و نقره به روش رقیق سازی میکروبی انجام گرفت. جهت به دست آوردن این نسبت، نمونه‌ها با درصد‌های مشابه تلقیح و بعد از کشت ۴۸ ساعته در محیط کشت آگاردار با دستگاه کلنی کانتر شمارش کلنی انجام گرفت. این نتایج در جدول ۱ آورده شده است. همان گونه که در این جدول مشخص است این نسبت برای نانوذره نقره برابر با ۱٪ بوده است ولی نانوذره مس خاصیت اسپورکشی نداشته و در غلظت ۱ مولار دارای خاصیت اسپوراستاتیکی می‌باشد.

شکل ۲: غلظت‌های استافیلوکوکوس اورئوس در ارتباط با غلظت‌های مختلف از نانوذرات CrO و CoFe_2O_4 در محیط کشت.



جدول ۱: نتایج MIC/MBC

نوع میکروب	نوع نانوذره	غلظت MIC	غلظت MBC	نسبت MIC/MBC
استافیلوکوکوس اورئوس	CrO	۰/۴٪	۰/۸٪	۰/۵
	CoFe_2O_4	۰/۶٪	۱٪	۰/۶

در مطالعه دوم، تعداد سلول‌های باکتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای دوره‌های مختلف زمانی در حضور ۱٪ از نانوذره CoFe_2O_4 و CrO و حالت‌های ترکیب از هر دو نانوذره تخمین زده می‌شود. در سایر مطالعات مشابه با این کار، از بالاترین غلظتی از نانوذره که بیشترین اثر باکتری کشی را از خود نشان داده به عنوان غلظت کار استفاده شده است؛ لذا ما نیز غلظت ۱٪ را برای این آزمایش انتخاب نمودیم. این آزمایش‌ها برای هر دو نانوذره سه مرتبه تکرار شد و نتایج از تکرار پذیری آن حکایت داشت. میانگین نتایج گزارش گردید. نتایج این بررسی در شکل ۳ آمده است. همان گونه که در این شکل نشان داده

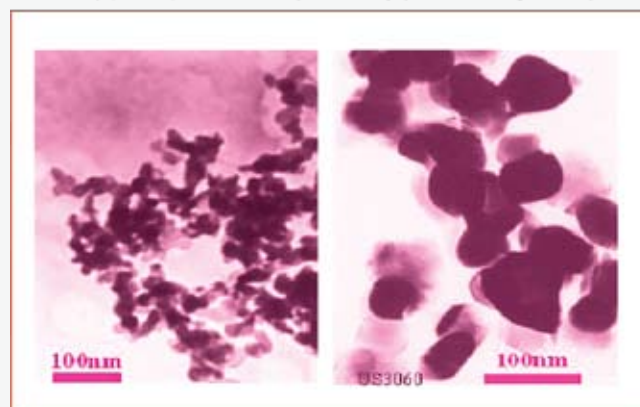
۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت به شدت تکان داده شد. OD نمونه‌ها در کنار نمونه شاهد که فاقد نانوذرات فوق بود، به عنوان نتیجه ثبت شد. OD نمونه‌ها که حاوی آب، باکتری و نانوذره بودند، در دوره‌های زمانی ۲ ساعته در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. این آزمایش سه مرتبه تکرار شده و میانگین نتایج گزارش گردید.

بررسی سینتیک کشندگی نانوذرات در محیط آگاردار: برای بررسی اثرات نانوذرات CrO و CoFe_2O_4 بر روی رشد استافیلوکوکوس اورئوس، باکتری در محیط آگاردار (محیط کنترل) با ۱٪ نانوذره CrO و CoFe_2O_4 (پلیت تست) به طور جداگانه و با نسبت‌های مختلف از هر دو نانوذره (۳۰٪ CoFe_2O_4 + ۷۰٪ CrO) و برعکس) رشد داده شد. به روش کشت چمنی محیط کشت دارای ۱٪ از نانوذرات جداگانه برای کشت سوش مورد مطالعه آماده گردید. ۳۰ میکرو لیتر از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی را از محیط منبع برداشته و بعد از ۱۰^۵ بار رقیق نمودن، با میله شیشه‌ای سر کج باکتری‌ها در سطح محیط کشت پخش شدند. بعد از ۲۴ ساعت کشت در گرم خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی باکتری‌ها قابل مشاهده بودند. اختلاف تعداد کلنی در گروه کنترل و تست به خوبی قابل مشاهده بود. عکس‌های مورد نیاز به وسیله دوربین دیجیتال تهیه و تعداد کلنی با کلنی کانتر شمارش گردید. روش تی-تست استیودنت (T-test student) برای تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شد ($p < 0.05$).

نتایج

برای بررسی قطر نانوذرات و نسبت سطح به حجم این نانوذرات، عکس TEM این نانوذرات گرفته شد که در شکل ۱ آمده است. از روی عکس‌های گرفته شده اثبات شد که نانوذره CrO دارای قطر ۴۰-۶۰ نانومتر و CoFe_2O_4 دارای سایزی به قطر ۵۰-۳۰ نانومتر می‌باشد.

شکل ۱: عکس‌های TEM نانوذرات (سمت راست CoFe_2O_4 و سمت چپ CrO).



اثرات غلظت نانوذرات CrO و CoFe_2O_4 بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در شکل ۲ نشان داده شده است. غلظت ۱٪ از نانوذره CrO در مقایسه با گروه کنترل ۴/۶ بار کمتر از چگالی نوری رشد باکتری‌ها در نمونه شاهد است ($p < 0.05$). در صورتی که در حضور ۱٪ از نانوذره

اثبات شده است که اکسیدهای مختلف فلزی کروم دارای تأثیرات تخریبی زیستی، همچون تخریب DNA هستند (۱۸ و ۱۹). در مجموع آزمایش‌های مینی بر بررسی سمیت نانوذرات CrO بر روی باکتری‌های گرم مثبت، سلول‌های ایمنی انسانی و باکتری‌های گرم منفی مثل شیگلا انجام شده است که نتایج آن‌ها حاکی از طبیعت سمی نانوذره CrO برای سیستم‌های میکروبی مختلف و لنفوسیت‌های T انسانی است (۲۰).

برای ذرات اکسید آهن ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Fe}_2\text{O}_3$) و کادمیوم سمیت بسیار کمی مشاهده شده است ولی در صورت ترکیب این مواد با سایر نانوذرات فلزی سمیت آن دچار تغییر می‌شود (۲۱). از کریستال‌های اکسید آهن به همراه مولکول‌های آنتی بادی و پپتیدها برای متصل شدن به سلول‌های توموری استفاده می‌شود. این نانوذرات می‌توانند آنتی ژن‌های توموری و یا مشکلات عروقی را با خاصیت اتصال اختصاصی مورد هدف قرار داده و به آن متصل شوند (۲۲). نتایج این تحقیق، نیز این نتایج را تایید می‌کند.

نتایج تست‌های MIC/MBC ما تایید نمود اکسید کروم دارای خاصیت باکتری کشی قوی‌تری نسبت به CoFe_2O_4 می‌باشد که شاید این قدرت اسپورکشی بیشتر به مکانیسم تأثیر آن بر روی متابولیسم باکتری و تحریک هیدروژن پراکسیدها بر گردد، تا تأثیر بر روی ساختار دیواره باکتری که توسط نانوذره اکسید آهن صورت می‌گیرد.

مشخص شده است که اتصال قوی نانوذرات به غشای بیرونی باکتری‌ها می‌تواند مانع از عملکرد آنزیم دهیدروژناز گردد. جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های پری پلاسمیک باکتری و در نتیجه جلوگیری از فعالیت و عملکرد DNA، RNA و سنتز پروتئین نیز دیده شده است. در مجموع این مهار فعالیت‌ها منجر به لیز سلولی خواهد شد (۱۳).

در مطالعات صورت گرفته نشان داده شده است که اگر غلظت نانوذرات CrO در محیط کشت افزایش یابد مقدار واکنش اکسیژن و دهیدروژناز لاکتات افزایش می‌یابد (۱۴). در مطالعات انجام شده در مورد تأثیر نانوذرات بر گیاهان، نتایج متفاوتی به دست آمده است که مهم‌ترین آن‌ها در مجموع تأثیر نانوذره CrO بر فتوسنتز و متابولیسم به صورت مانعی گزارش شده است (۱۵ و ۱۶).

اغلب برای بررسی و فرموله نمودن قدرت باکتری کشی نانوذات می‌توان از فرمول زیر بهره جست بر اساس این فرمول نیز قدرت کشندگی نانوذره CrO نسبت به CoFe_2O_4 بیشتر است

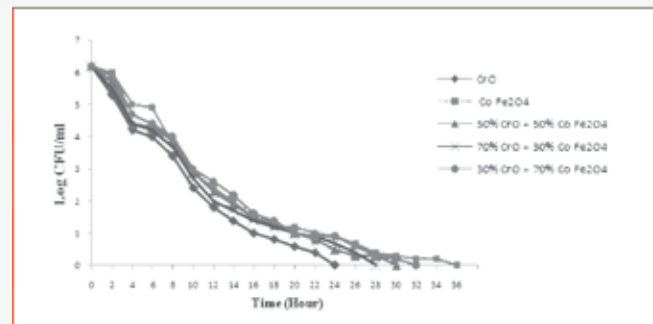
$$\text{bactericidal efficacy (\%)} = \frac{\text{alive number in reference group} - \text{alive number in experiment group}}{\text{alive number in reference group}} \times 100\%$$

با توجه به این فرمول قدرت کشندگی نانوذرات CrO و CoFe_2O_3 در غلظت بحرانی ۱٪ به ترتیب حدود ۶۷ و ۵۶ درصد به دست می‌آید. این قدرت کشندگی برای نانوذره کروم مناسب بوده و این ذره یک کاندید مناسب به عنوان میکروب کش معرفی می‌شود. بررسی سنتیک کشندگی نانوذرات به خوبی نشان داد که نانوذره کروم در غلظت‌های مختلف دارای اثرات متفاوتی بوده که کم‌ترین زمان لازم برای از بین بردن میکروب زمانی بود که تمامی مخلوط ما نانوذره کروم خالص باشد (۲۴ ساعت) ولی همین سرعت برای نانوذره اکسید آهن حدود ۳۶ ساعت می‌باشد. این نتایج گواه بر قدرت کشندگی نانوذرات مورد بررسی است.

در یک آزمایش کمی، فعالیت سلول باکتری با تغییر در نرخ زنده

شده است در صورت اضافه نمودن ۱٪ نانوذرات به محیط کشت باکتری، نرخ زنده مانی (survival rate) در تماس با ۱٪ نانوذرات مورد مطالعه به طور جداگانه در محلول حاوی نانوذره CrO بعد از ۲۴ ساعت به صفر رسیده ولی در حضور نانوذره CoFe_2O_4 بعد از ۳۶ ساعت به صفر رسیده است.

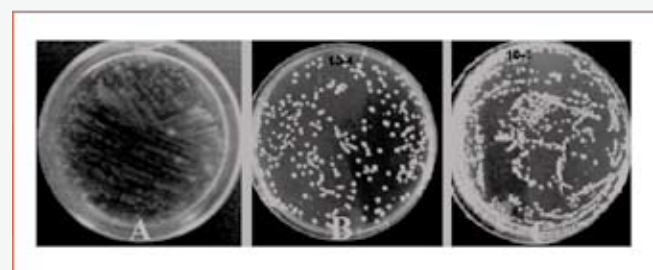
شکل ۳: محاسبه سنتیک کشندگی ۱٪ از نانوذرات CrO و CoFe_2O_4 بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس.



تأثیر غلظت ۱٪ نانوذرات CoFe_2O_4 و CrO در محیط آگاردار بر روی باکتری مورد مطالعه در شکل ۴ نشان داده شده است. در این شکل، تعداد کمتری از کلنی‌های باکتری در محیط آگاردار حاوی نانوذرات CoFe_2O_4 (پلیت C)، CrO (پلیت B) بعد از مقایسه با گروه کنترل (پلیت A) مشاهده شد. بعد از انجام شمارش کلنی، در پلیت کنترل تعداد (793 ± 75) کلنی میکروب مشاهده شد. در حالی که در پلیت حاوی ۱٪ از نانوذره CrO (25 ± 260) کلنی و در حضور ۱٪ از نانوذره CoFe_2O_4 (350 ± 72) کلنی شمارش گردید. این آزمایش برای هر دو نانوذره سه مرتبه تکرار شد. از این رو نانوذره CrO رشد باکتری‌ها را ۳/۱ برابر نسبت به گروه کنترل کاهش می‌دهد ($p < 0.05$) ولی نانوذرات CoFe_2O_4 در محیط آگار، نسبت به گروه کنترل ۲/۳ برابر کاهش نشان داد ($p < 0.05$).

شکل ۴: رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آگاردار.

A: بدون نانوذرات CrO و CoFe_2O_4 ; B: ۱٪ نانوذره CrO; C: نانوذره CoFe_2O_4



بحث

در این تحقیق فعالیت ضد میکروبی غلظت‌های مختلفی از نانوذرات CrO و CoFe_2O_4 بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۲۹۲۱۳) مطالعه گردید به این امید که بتوان در آینده از این مواد در پاک سازی سطوح و فضای بیمارستانی و پوشش‌هایی که احتمال آلودگی در آن‌ها می‌رود، استفاده نمود. این دو نانوذره با نسبت‌های متفاوت نسبت به ممانعت از رشد باکتری عملکرد مناسبی داشتند.



زا مورد استفاده قرار گیرند و از اپیدمی‌های انسانی در مقابل بیماری‌های نوپدید و بازپدید جلوگیری نمود (۱۲).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، غلظت‌های مختلفی از نانوذرات CoFe_2O_4 و CrO جهت پیدانمودن غلظتی از نانو که بیشترین خاصیت باکتری کشی داشته باشد، آزمایش و بررسی گردید و در نهایت مشخص شد که خاصیت ضد میکروبی نانوذرات CrO نسبت به نانوذرات CoFe_2O_4 بیشتر می‌باشد هر چند سمیت آن نیز برای سلول‌های هسته دار بیشتر است. امید است که در آینده با استفاده از این نانوذرات به صورت‌های ترکیبی یا خالص بتوان با میکروب‌های بیماری زا در موارد خاص مانند همه گیری‌ها یا در صورت شیوع باکتری‌ها یا میکروب‌های بازپدید و یا نوپدید به راحتی مقابله کرد و شرایط خطرناک را پشت سر گذاشت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز پژوهش‌شکده معلم کرج و مرکز پژوهش‌شکده نانوفناوری پیام نور یزد به علت حمایت از این تحقیق تشکر کرده و نیز کاستی‌های این مطالعه را قبول می‌نمایند.

References

- Hatchett DW, Josowicz M. Composites of intrinsically conducting polymers as sensing nanomaterials. *J Chem Rev.* 2008;108:746-769.
- Kumar A, Jakhmola A. RNA-mediated fluorescent Q-Pb nanoparticles. *Langmuir.* 2007;23:2915-2918.
- Aslan K, Geddes CD. Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology. *Curr Opin Biotech.* 2005;16:55-62.
- Sosa I O, Noguez C, Barrera R G. Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes. *J Phys Chem.* 2003;107:6269-6275.
- Sun Y G, Mayers B, Herricks T, Xia Y N. Polyol synthesis of uniform silver nanowires: a plausible growth mechanism and the supporting evidence. *J Nano Lett.* 2003;3:955-960.
- Te-Hsing W, Yi-Der T, Lie-Hang S. The novel methods for preparing antibacterial fabric composites containing nanomaterial. *J Solid State Phenomena.* 2007;124:1241-1244.
- Hardman R A. Toxicological review of quantum dots: Toxicity depends on physic-chemical and environmental factors. *Environ Health Perspect.* 2005;114:165-172.
- Dreher K L. Health and environmental impact of nanotechnology: Toxicology calassessment of manufactured nanoparticles. *Toxicol Sci.* 2004;77:3-5.
- Li P, Li J, Wu C, Wu Q. Synergistic antibacterial effects

مانی که حاصل از تغییر در تعداد باکتری بوده، تخمین زده شد. همچنین این تخمین از روی پلیت آگاردار نیز قابل تشخیص بود. نتایج نشان داد که نانوذره CrO در مقایسه با نانوذره CoFe_2O_4 دارای اثر باکتریوسیدی قوی‌تری می‌باشد (۲۵)؛ لذا این داده اثبات می‌کند که فرموله نمودن زیستی نانوذرات CrO و CoFe_2O_4 می‌تواند برای درمان عفونت‌های حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس و به خصوص گونه اورئوس مفید واقع شود.

از طرفی دیگر اثبات شده است که کبالت و آهن (در مقایسه با سایر نانوذرات اکسید فلزی مثل نقره) دارای اثرات زیست سازگاری بهتری هستند و نیز قدرت اثرگذاری مناسبی را از خود نشان می‌دهند لذا یک عامل انتخابی مناسب برای کاربردی نمودن این نانوذرات جهت مقابله و پیشگیری از این عامل بیماری زا می‌باشند (۲۶).

مطالعات قبلی نشان دادند نانوذره اکسید کروم و آهن از رشد اکثر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری زا مانند سودوموناس آئروژنا، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشاکلی تأثیر گذاشته و از رشد باکتری ممانعت می‌کنند (۲۲). میزان غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری‌ها بسته به مقاومت نوع باکتری‌های مطالعه شده متفاوت بوده است. برای مثال مطالعات قبلی ما در سال ۱۳۸۸ به خوبی نشان دادند که استفاده از نانوذرات می‌تواند باعث مهار رشد باکتری‌های بیماری زایی چون شیگلا، *E. coli* و استافیلوکوکوس اورئوس که از عوامل اصلی آلودگی مواد غذایی و اسهال‌های خونی فصلی اند، شود (۲۲).

بر اساس این نتایج انتظار می‌رود که با استفاده از این نانوذرات بتوان لباس‌هایی طراحی و تهیه کرد که بتوانند در مقابل میکروب‌های بیماری

- of Lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *J Nanotechnol.* 2005;16:1912-1917.
- Barati B, Saadati M, Bahmani M Kh. Isolation and detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* type A by multiplex PCR. *Mil Med Journal.* 2006;8:119-128.
- Fortner J D, Lyon D Y, Sayes C M, Boyd A M, Falkner J C, Hotze E M, et al. Nanocrystal formation and microbial response. *Environ. Sci Technol.* 2005;39:4307-4316.
- Raffi M, Hussain F, Bhatti T M, Akhter J I, Hameed A, Hasan M M. Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*. *Annals of Microbiology.* 2008;60:75-80.
- King M D, Humphrey B J, Wang Y F, Kourbatova E V, Blumberg H M. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as The predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Ann Intern Med.* 2006;144:309-317.
- Yang F, Hong F S, You W J, Liu C, Gao F Q, Wu C, et al. Influences of nano-anatase CrO on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biol. Trace Elem Res.* 2006;110:179-190.
- Hong F S, Zhou J, Liu C, Yang F, Wu C, Zheng L, et al. Effect of nanoparticles on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biol Trace Elem Res.* 2005;105:269-279.



16. Doshi R, Braida W, Christodoulatos C, Wazne M, Connor G. Nano-aluminum: Transport through sand columns and environmental effects on plants and soil communities. *Environ Res.* 2008;106:296-303.
17. Lin D H, Xing B S. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root elongation. *Environ. J Pollut.* 2007;150:243-250.
18. Martel S. Method and system for controlling micro-objects or micro-particles. United States patent US 20100215785. 2005; Appl. 11/145,007.
19. Ray P C, Darbha G K, Ray A, Walker J, Hardy W, Perryman A. Gold nanoparticle based FRET for DNA detection. *J Plasmonics.* 2007;2:173-183.
20. Ghosh S K, Pal T. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of cobalt nanoparticles: From theory to applications. *Chem Rev.* 2007;107:4797-4862.
21. Rezaei-Zarchi S, Javed A, Javeed Ghani M, Mirjalili H, Moghaddam B. Pathogenic strain of *Escherichia coli*. *Ir. J of Pathology.* 2010;5:83-89.
22. khani P H, Zand A M, Imani S, Rezayi M, Rezaei-Zarchi S. Determining the antibacterial effect of ZnO nanoparticle against the pathogenic bacterium, *Shigella dysenteriae* (type 1). *Int J Nano Dim.* 2010;4:279-285.
23. Jones G L, Muller C T, O'Reilly M, Stickler D J. Effect of Triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:266-272.
24. Amanda S, Mohammad F, John J, Schlager D, Syed A. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *J Nanomed Nanobiotechnol.* 2010;2:544-568.
25. Griffin J, Singh A K, Senapati D, Rhodes P, Mitchell K, Robinson B, et al. Size and distance dependent NSET ruler for selective sensing of hepatitis C virus RNA. *Chem Eur J.* 2008;online early view.
26. Kawata K, Okabe S. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to epG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol.* 2009;43:6046-6051.



Original Article

Antibacterial Effect of CrO and CoFe₂O₄ Nanoparticles upon *Staphylococcus aureus*

Imani S^{1*}, Zagari Z², Rezaei-Zarchi S³, Zand AM⁴, Dorodiyani M⁵, Bariabarghoyi H³, Lotfi F⁶

1- Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences and Department of Biology, IHU, Tehran, Iran.

2- Department of Biology, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran.

3- Department of Biology, Payam-e-Noor University, Yazd, Iran.

4- Department of Biology, Imam Houssein University, Tehran, Iran.

5- Young Researchers Club, Islamic Azad University, Tehran- Markaz Branch, Tehran, Iran.

6- Department of Polymer, Material faculty, Tehran University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objective: The use of metal oxide nanoparticles can be effective to eliminate the bacterial infections, as an alternative to antibiotics. In this study, antibacterial properties of nonmaterials of CrO and CoFe₂O₄ are investigated against *Staphylococcus aureus* as a major and prevalent pathogenic bacterium to achieve sterile nano-containers.

Materials & Methods: Different concentrations of CrO and CoFe₂O₄ nanoparticles, (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1%) of each, were examined with respect to their optical density (OD) culture separately. Different percentages of each nanoparticles were also examined together for the best antibacterial combination. Kinetics of Bactericidal of nanoparticles were calculated in two-hour periods and were compared with the power of other common antibiotics. Ratios of MIC/MBC were calculated by Micro dilution method, to demonstrate the bactericidal power of nanoparticles.

Results: The best concentration of the nanoparticles with the highest effect of bactericidal was obtained in the presence of 1% concentration of CrO that the OD of *S. aureus* culture medium had reduced 4.6 times than the control group ($p < 0.001$). Ratio of 70% CrO to 30% CoFe₂O₄ was the best of the bacteriostatic properties that OD was reduced 3.3 times than the control group ($p < 0.05$). Best kinetics of bactericidal with survival rate in the presence of 1% CrO and CoFe₂O₄ were obtained in 24 and 36 hours respectively. In critical concentration of 1% CrO and CoFe₂O₄ bactericidal power was about 67 and 56 % respectively. The MIC/MBC rate for CrO and CoFe₂O₄ was obtained 0.2 and 0.4 respectively.

Conclusion: The results showed that CrO nanoparticle compared with CoFe₂O₄ has a higher bactericidal power for *S. aureus* infection. Therefore, by completion of these experiments and the use of metal oxide nanoparticles complex in sensitive environments such as food storage containers, etc. are suggested.

Keywords: Metal nanoparticles of CrO and CoFe₂O₄, Bactericidal, *Staphylococcus aureus*.

* **Corresponding author:** Imani Saber, Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Tel: +989126407588

Email: imani.saber@yahoo.com