

Evaluation of the antimicrobial effect of ZnO nanoparticles on *Staphylococcus aureus* bacteria isolated from clinical infectious samples in Tabriz city

**Alireza Abdolhossein Zadeh^{1*}, Mahsa Hajjalilo Bonab²,
Zeynab yolgoni³, Parisa Najaf fam shabiloye sofla⁴,
Amir Mohammad Kehtari Bonab⁵, Amin Memari Bonab⁶**

1. Assistant professor, PhD in Microbiology, Department of Microbiology, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, Iran.

2. Bachelor of Microbiology, Department of Microbiology, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, Iran.

3, 4, 5, 6. Master of Pathogenic Microbes, Department of Microbiology, Bonab Branch, Islamic Azad University, Bonab, Iran.

Corresponding author: Alirezaabd189@gmail.com, Orcid : 0000-0001-7284-0402

Received: 21/02/2026 Revised: 02/03/2026 Accepted:10/03/2026

Abstract

Introduction: Increasing resistance to common antimicrobial agents is one of the major problems in healthcare sector and control of them in hospital environment is a challenge. in this study the antimicrobial activity of ZnO nanoparticles on *Staphylococcus aureus* was investigated.

Methods: This study was carried out using the techniques of computing the sensitivity and kinetic parameters of bacteria mortality and the simultaneous calculation of mic growth rate by dilution method against clinical samples is an innovative aspect. 80 clinical infectious samples were collected from Tabriz medical centers. The antimicrobial properties of zinc oxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus* bacteria were investigated using techniques for calculating the sensitivity coefficient and bacterial death kinetics. Bacteriological tests were performed using an initial concentration of 10^8 CFU/ml of each bacteria isolate. Initially, the minimum growth inhibitory concentration was determined. At the beginning, the MIC value was determined and to investigate the mortality kinetics and calculate the sensitivity coefficient, the concentrations of 1 and 2MIC concentrations in contact time of 0 to 360 minutes were used. The time of bacterial death was determined using 1 and 2MIC concentrations at the time of 0 to 540 minutes and the time of bacterial death was determined. The data were analyzed by one-way ANOVA, and SPSS software. In all of the subjects the meaning level of the test was $p < 0.05$.

Results: MIC value for the bacteria 1200 mg/ml was determined. In the reaction of ZnO nanoparticles with the size of 20 nm, the maximum sensitivity coefficient for *Staphylococcus aureus* was found to be proportional to ZnO nanoparticles 0/033 ml/μg was determined. By increasing the concentration of nanoparticles, the antibacterial activity of nanoparticles increased. *Staphylococcus aureus* was at least one population in 300 min. The average sensitivity coefficient obtained for the bacteria and the nanoparticles was 1MIC concentration of 0/00323 ml/μg and 2MIC concentration, the bacterial population reached zero in 540 min.

Conclusion: According to the results, sensitivity coefficient was determined and the maximum sensitivity was *Staphylococcus aureus*. The results of this study showed that ZnO nanoparticles have stronger antimicrobial effect and can be used to control the bacteria.

Keywords: Evaluation, Antimicrobial nanoparticles, ZnO, *Staphylococcus aureus*, Tabriz

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات ZnO علیه باکتری *Staphylococcus aureus* جدا شده از نمونه‌های عفونی بالینی شهر تبریز

علیرضا عبدالحسین زاده^{۱*}، مهسا حاجی علیلو بناب^۲، زینب یولقونی^۳،

پریسا نجف‌فام شیبیلوی سفلی^۴، امیرمحمد کهتری بناب^۵، امین معماری بناب^۶

۱. استادیار، دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، ایران.

۲. کارشناس میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، ایران.
۳، ۴، ۵، ۶. کارشناس ارشد میکروب‌های بیماری‌زا، گروه میکروبیولوژی، واحد بناب، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب، ایران.

* نویسنده مسئول: Alirezaabd189@gmail.com Orcid: 0000-0001-7284-0402

تاریخ بارگذاری: ۱۴۰۴/۱۲/۰۲ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۱۹

چکیده

مقدمه: افزایش مقاومت به عوامل ضد میکروبی معمول یکی از مشکلات عمده بخش مراقبت‌های بهداشتی است و کنترل انتشار آن‌ها در محیط بیمارستانی یک چالش موجود است. در این مطالعه فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات ZnO بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شده است.

روش کار: این مطالعه با استفاده از تکنیک‌های محاسبه ضریب حساسیت و کینتیک مرگ باکتری‌ها انجام شد و محاسبه هم‌زمان میزان حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد MIC به روش رقیق‌سازی علیه نمونه‌های بالینی جنبه نوآوری دارد. تعداد ۸۰ نمونه عفونی بالینی مراکز درمانی شهر تبریز مورد بررسی شد. آزمایشات باکتریولوژیکی با استفاده از غلظت اولیه 10^8 CFU/ml هر یک از نمونه باکتریایی انجام شد. در ابتدا مقدار MIC تعیین گردید و برای بررسی کینتیک مرگ و محاسبه ضریب حساسیت از

غلظت‌های یک و دو برابر MIC در زمان تماس صفر تا ۳۶۰ دقیقه استفاده شد. زمان مرگ باکتری با استفاده از غلظت‌های یک و دو برابر MIC در زمان اثر صفر تا ۵۴۰ دقیقه بررسی و زمان مرگ باکتری تعیین شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و آزمون آماری از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA، نرم‌افزار SPSS استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P < 0.05$ بود.

یافته‌ها: مقدار MIC برای باکتری نسبت به نانو ذره ZnO ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. در واکنش نانو ذرات ZnO با اندازه ذرات ۲۰ نانومتر، بیشترین ضریب حساسیت برای *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به نانو ذرات ZnO ($0.33 \text{ ml}/\mu\text{g}$) وجود داشت. با افزایش غلظت نانو ذرات، فعالیت باکتری‌کشی نانو ذرات افزایش نشان داد. باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در زمان ۳۰۰ دقیقه حداقل جمعیت را داشت. میانگین ضریب حساسیت به‌دست آمده برای باکتری و نانو ذره مورد بررسی یک برابر غلظت ممانعت‌کننده رشد $0.323/0$ بود. در غلظت ۲ برابر MIC جمعیت باکتری‌ها در مدت زمان ۵۴۰ دقیقه به صفر رسید.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج آزمایشات، ضریب حساسیت تعیین شد و حساسیت *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که نانو ذرات ZnO از اثر ضدمیکروبی قوی‌تری برخوردار است و می‌تواند جهت کنترل باکتری‌ها استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: بررسی، نانو ذرات ضدمیکروبی، ZnO، *استافیلوکوکوس اورئوس*، تبریز.

۱. مقدمه

به موازات توسعه سریع زندگی بشری، کنترل میکروارگانیسم‌های مضر هم امری غیرقابل اجتناب است [۱]. طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها در تعادل با محیط زندگی انسان‌ها است، اما رشد سریع و کنترل‌نشده آن‌ها می‌تواند منجر به بروز مشکلاتی جدی شود. عفونت‌های بیمارستانی یکی از مشکلات عدیده در سراسر دنیا بوده و کنترل گسترش این عفونت‌ها به‌خصوص در بیمارستان‌ها یک چالش جدی است [۱، ۲].

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 [۳-۷]. 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 شود [۳].

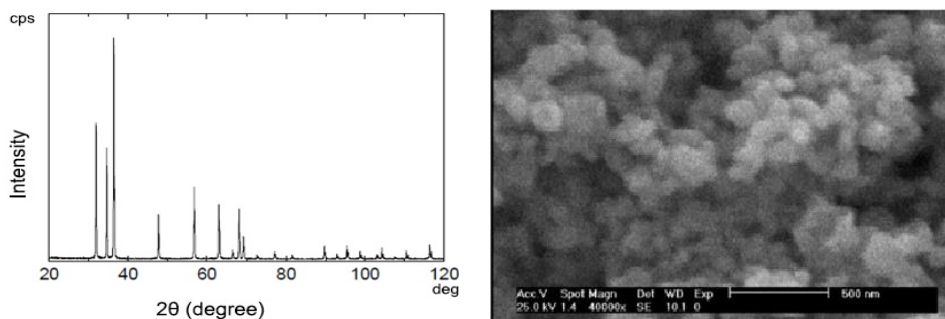
یون‌های روی از جمله موادی هستند که به طور سنتی از دیرباز خواص ضد میکروبی آن‌ها شناخته شده است و مورد تأیید می‌باشد. برخی مطالعات نشان داده‌اند که یون این گونه فلزات از طریق اتصال به گروه‌های سولفیدریل (SH-) موجود در آنزیم‌ها، با پروتئین‌ها واکنش ایجاد می‌کنند و در نهایت پروتئین‌ها غیرفعال خواهند شد [۸]. 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 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؛ برای Sondi و همکاران اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره علیه /شرشیا کلای و Hsiao فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات مس علیه برخی باکتری‌ها را بررسی کرده‌اند [۶، ۱۰]. 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 برهم کنش داشته و از طریق ایجاد تغییرات ساختاری، از بین رفتن نیروی محرکه 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 تصفیه 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 مقایسه 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 باکتری کشی 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 ZnO علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و همچنین تعیین ضریب حساسیت باکتری‌ها و کینتیک مرگ آن‌ها انجام شده است.

۲. مواد و روش کار

این پژوهش تجربی و از نوع بنیادی کاربردی بود که در آزمایشگاه انجام شد. بدین منظور نانو ذرات ZnO تجاری به صورت پودری برای بررسی فعالیت ضد میکروبی با درجه خلوص $>99\%$ درصد از شرکت برهان تهران تهیه شد. حالت بلوری و میزان ناخالصی موجود در نانو ذرات ZnO با استفاده از پراش اشعه ایکس (XRD) و همچنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) شکل و اندازه نانو ذرات، از سوی شرکت سازنده بررسی و تعیین شد (شکل ۱). براساس نتایج SEM، نانو ذرات تقریباً دارای شکل کروی بوده و قطر نانو ذرات ZnO در حدود ۲۰ نانومتر به دست آمده است. همچنین میزان سطح ویژه نانو ذرات با اندازه‌گیری ایزوترم جذب مولکول‌های گاز نیتروژن در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۱۹۶ – (BET; BELSORPmini) برای نانو ذرات ZnO $90\text{ m}^2/\text{g}$ بوده است.



شکل ۱. عکس‌های SEM و XRD برای نانو ذره ZnO

۲-۱. آماده سازی سوسپانسیون نانو ذرات

برای تهیه محلول استوک نانو ذرات، ۱۰ گرم نانو ذره در یک لیتر محیط کشت استریل به صورت سوسپانسیون در آورده شد و برای پراکنده شدن مناسب آن‌ها از دستگاه التراسونیک (Bandelin Sonorex RK 31 H) به مدت زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد. جهت جلوگیری از عدم بروز خطا هم‌زمان با اجرای آزمایشات میکروبی سوسپانسیون نانو ذرات تهیه شدند.

۲-۲. نمونه‌های باکتریایی

نمونه‌های باکتریایی مورد استفاده جهت انجام آزمایشات ضد باکتریایی / استافیلوکوکوس / اورئوس باکتری گرم مثبت بودند که به صورت فریز خشک نگهداری شده بودند. این باکتری‌ها از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم پزشکی تبریز که از نمونه‌های عفونی و بالینی بیماران مراکز درمانی شهر تبریز جداسازی شده بودند تهیه گردیدند. با توجه به این که احتمالاً فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات ZnO تحت تأثیر دیواره سلولی باکتری‌ها قرار گیرد؛ لذا آزمایشات بر روی هر دو گروه گرم مثبت و گرم منفی به عنوان شاهد جهت انجام مقایسه نهایی انجام شد.

۲-۳. کشت نمونه باکتریایی مورد آزمون

سویه‌های استاندارد باکتری‌های مذکور روی محیط کشت آگار خون دار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه (RAD Production.co) با دمای 37°C نگهداری گردیدند. پس از طی مدت انکوباسیون، از نمونه باکتریایی برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی استفاده شد [۱۲، ۱۳].

۲-۳-۱. تهیه سوسپانسیون سلول باکتریایی جهت انجام آزمایش

به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی جهت انجام آزمایشات، ابتدا سلول‌های باکتریایی از سطح محیط کشت آگار خونی به کمک لوپ استریل جمع‌آوری و در یک میلی‌لیتر بافر سالین فسفات (PBS : Phosphate-Buffered-Salin) استریل مخلوط شد تا

نمونه‌های با کدورت نیم مک‌فارلند ($10^8 \times 1/5 - 1$ عدد باکتری در هر میلی‌لیتر Colony-Forming Unit CFU) تهیه شد. برای اطمینان از ایجاد کدورت مذکور، جذب آن به وسیله اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش (UNICO-2100؛ ایالات متحده) در محدوده طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری و میزان جذب در محدوده $0/1 - 0/8$ تنظیم شد [۱۴].

۴-۲. آزمایشات کینتیک مرگ باکتریایی

قبل از بررسی کینتیک مرگ باکتری‌ها، با استفاده از روش استاندارد پیشنهادی توسط کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه‌های بالینی (CLSI)، حداقل غلظت ممانعت‌کننده رشد (MIC) برای هر یک از باکتری‌های در تماس با سوسپانسیون نانو ذرات به دست آورده شد. MIC به عنوان کمترین غلظت نانو ذرات که از رشد ارگانسیم‌ها در محیط کشت ممانعت می‌کند، تعریف می‌شود [۱۲] و براساس لوله‌های حاوی محیط کشت، به صورت سیستم ناپیوسته، دارای غلظت‌های متفاوتی از نانو ذرات ZnO در سوسپانسیون هستند، تعیین شد. در این روش از ۱۲ لوله که هر کدام حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط تربیتون سویا برات (TSB) استریل بود، استفاده گردید. بدین صورت که در لوله اول فقط ۴ میلی‌لیتر سوسپانسیون مورد نظر ریخته و مخلوط شد، سپس از لوله شماره ۱ که حاوی ۴ میلی‌لیتر سوسپانسیون نانو ذره و محیط کشت بود، ۲ میلی‌لیتر برداشته و به لوله شماره ۲ اضافه و از این لوله ۲ میلی‌لیتر به لوله بعدی اضافه و به همین ترتیب تا لوله ۱۲ این عمل تکرار گردید (غلظت‌های حاصله از لوله 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 بر میلی‌لیتر سیر نزولی دارد). سپس لوله‌های حاوی نانو ذرات و باکتری در انکوباتور شیکردار (۲۰۰ دور در دقیقه، دمای 37°C و حداکثر مدت زمان ۲۴ ساعت) گرم‌خانه‌گذاری شدند. یک لوله نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

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 37°C و حداکثر مدت زمان ۲۴ ساعت) گرم خانه گذاری شدند. برای تعیین زمان مرگ باکتری ها در تماس با نانو ذرات از غلظت های MIC و 2MIC برای هر سویه تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به آن اضافه شد. لوله ها در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و در زمان های صفر، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰، ۳۰۰، ۳۶۰، ۴۲۰، ۴۸۰ و ۵۴۰ دقیقه پس از تماس باکتری با رقت های تهیه شده به روی پلیت های محتوی محیط کشت تریپتیک سوی آگار کشت داده شدند و پس از ۱۸ ساعت نگهداری در انکوباتور نتایج مشاهده شد. پلیت های بدون رشد باکتریایی به عنوان زمان مرگ باکتری در نظر گرفته شد. از تمام لوله ها ۱۰۰ میکرولیتر روی پلیت های حاوی محیط کشت آگار برده و توسط پیت پاستور پخش شد و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ سانتی گراد در انکوباتور نگهداری گردید. پلیتی که حداکثر محتوی ۱۰ کلنی از باکتری مربوطه بود به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و پلیتی که هیچ گونه رشدی در آن دیده نشد به عنوان حداقل غلظت باکتری کشی در نظر گرفته شد. لوله ها در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و در زمان های صفر، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰، ۳۰۰، ۳۶۰، ۴۲۰، ۴۸۰ و ۵۴۰ دقیقه پس از تماس باکتری با رقت های تهیه شده به روی پلیت های محتوی محیط کشت تریپتیک سوی آگار کشت داده شدند و پس از ۱۸ ساعت نگهداری در انکوباتور نتایج مشاهده گردید. پلیت های بدون رشد باکتریایی به عنوان زمان مرگ باکتری در نظر گرفته شد.

در زمان های مورد نظر (صفر تا ۳۶۰ دقیقه) از سوسپانسیون باکتری - نانوذره نمونه برداری شده و بر روی پلیت های حاوی محیط کشت آگار خون دار کشت داده می شدند. کلنی های 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 کلنی ها در زمان های نمونه برداری (N) بر تعداد کلنی ها در زمان قبل از تماس با سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی (N_0) محاسبه شد. برای بررسی کینتیک مرگ باکتری ها از کینتیک مرگ درجه اول استفاده شد. شکل کلی این نوع کینتیک به صورت زیر است [۳، ۱۵-۱۷]:

$$dN/dt = -kN_0$$

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

باکتری پس از بازه زمانی مورد نظر می‌باشد.

۵-۲. تعیین ضریب حساسیت به نانو ذرات

در این مطالعه ضریب حساسیت نانو ذرات (Z) بر حسب (ml/μg) به وسیله رابطه زیر به دست می‌آید که توسط Yoon و همکارانش پیشنهاد شده است [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 (μg/ml) 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 نانو ذره از حساسیت بیشتری برخوردار است و به عبارت دیگر بیانگر این است که آن نانو ذره دارای حساسیت ضد میکروبی بیشتری می‌باشد.

۳. یافته‌ها

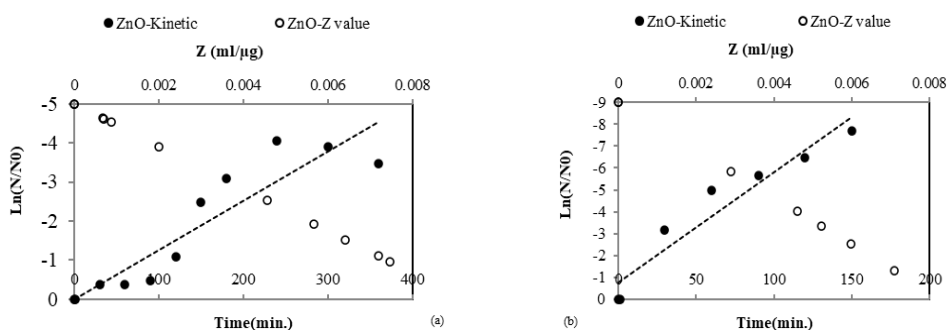
بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایشات بررسی فعالیت ضد میکروبی سوسپانسیون نانو ذرات ZnO بر روی باکتری /ستافیلوکوک/ اورئوس، مقدار MIC برای باکتری نسبت به نانو ذره ZnO ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

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

جدول ۱. میانگین ضریب حساسیت به دست آمده برای باکتری و نانو ذره مورد بررسی در این مطالعه

<i>S.aureuse</i>	سویه باکتری
ZnO	غلظت نانو ذره
0/00323	یک برابر غلظت ممانعت کننده رشد (1xMIC)
0/00369	دو برابر غلظت ممانعت کننده رشد (2xMIC)

همان گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است مقدار ضریب حساسیت برای نانو ذره ZnO در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با افزایش غلظت نانو ذرات از یک برابر مقدار MIC به دو برابر MIC، افزایش یافته است. تغییرات جمعیت باکتری‌های در تماس با سوسپانسیون نانو ذرات نسبت به زمان‌های تماس آن‌ها و در نتیجه کینتیک مرگ آن‌ها محاسبه گردید و تغییرات جمعیت باکتری‌ها نسبت به زمان و مقدار ضریب حساسیت در شکل ۲ آورده شده است. باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در زمان ۳۰۰ دقیقه حد اقل جمعیت را داشت.



شکل ۲. تغییرات جمعیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به زمان (کینتیک مرگ) و مقدار ضریب حساسیت (a: غلظت یک برابر مقدار MIC و b: غلظت دو برابر مقدار MIC)

مقدار ضریب حساسیت نانو ذره با افزایش زمان تماس برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، افزایش نشان داده است. نتایج بررسی کینتیکی نشان داد که با افزایش غلظت نانو ذرات، جمعیت باکتری‌ها کاهش می‌یابد. 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. همچنین براساس نتایج، باکتری‌های در تماس با غلظت MIC دچار مرگ کامل جمعیت نشده‌اند؛ اگرچه جمعیت آن‌ها به میزان قابل توجهی در ساعات مشخص برای هر باکتری کاهش نشان داده‌اند. در غلظت ۲ برابر MIC جمعیت باکتری‌ها در مدت زمان ۵۴۰ دقیقه به صفر رسید. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار شد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

اندازه نانو ذرات مورد بررسی در این مطالعه در محدوده ۱۰۰ نانومتر بود. کاهش اندازه باعث تغییر ویژگی‌های ساختاری و فیزیکوشیمیایی در آن ذرات می‌گردد و با کاهش اندازه ذرات، نسبت تعداد اتم‌های سطحی به اتم‌های داخلی افزایش می‌یابد. با کاهش اندازه ذرات نانومتر یا کمتر، اثرات کوانتومی پدیدار می‌شوند و این اثرات می‌توانند به مقدار زیادی ویژگی‌های مختلف مواد را تغییر دهند. در مورد نانو ذرات کاهش اندازه سبب سهل‌الوصول شدن دسترسی آن‌ها برای موجودات زنده شده و در نتیجه منجر به افزایش سمیت آن‌ها می‌شود [۱۸]. در پروفیل XRD نانو ذرات ZnO، یک پیک اکسیژن مشاهده می‌شود؛ نانو ذرات ZnO دارای اتم‌های چگال بوده و به‌عنوان انواع بسیار رآکتیو برشمرده می‌شوند [۱۴]. کاهش اندازه و بنابراین افزایش سطح مخصوص به‌عنوان عامل افزایش تعداد گروه‌های رآکتیو بر روی سطح ذرات، به‌عنوان مهم‌ترین فاکتورها برای افزایش سمیت نانو ذرات ذکر شده است.

شاید افزایش گروه‌های فعال (رآکتیو) سطحی به‌عنوان مکان‌های فعال برای شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن رآکتیو (ROS) شامل سوپراکسید، هیدروژن پروکسید و رادیکال هیدروکسیل منجر به استرس اکسیداتیو شود [۵]. نتایج تعیین مقدار MIC نشان داد که *استافیلوکوکوس/اورئوس* از حساسیت بیشتری برخوردار بوده است. همان‌گونه که در شکل ۳ مشهود است وقتی که نسبت لگاریتمی باکتری‌های زنده مانده و زمان مواجهه به‌عنوان محورهای قائم و افقی در مقابل هم رسم شود، دیده می‌شود که جمعیت باکتری مورد بررسی به‌صورت خطی کاهش می‌یابد. نتایج مطالعات ساوایی و همکاران با نتایج این بخش از مطالعه حاضر همخوانی دارد. 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 [۱۵-۱۷].

همان‌گونه که از نمودارهای کینتیک مرگ باکتری‌ها (شکل ۲) استنباط می‌شود در یک زمان خاص (مشترک برای هر غلظت نانو ذرات) نسبت بقا با افزایش غلظت نانو ذرات به‌سرعت کاهش نشان داده است که بیانگر افزایش فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات در سوسپانسیون، به‌دلیل افزایش غلظت آن‌ها است.

این نتیجه می‌تواند به سمیت بیشتر در غلظت‌های بالاتر نانو ذرات مرتبط باشد [۱۹]. البته این موضوع نمی‌تواند بیانگر رابطه 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 یافته است. به عبارتی فعالیت باکتری‌کشی نانو ذرات با افزایش زمان تماس و غلظت نانو ذرات علیه باکتری افزایش یافته است و این مورد می‌تواند به معنی وسیع‌الطیف بودن ویژگی ضد میکروبی این نانو ذرات باشد [۱۸]؛ اگرچه بررسی اثر ضد میکروبی آن‌ها علیه دیگر میکروارگانیسم‌ها نیاز است. آکی یاما و همکاران [۲۰] در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که *استافیلوکوکوس اورئوس* به دلیل تفاوت ترکیبات دیواره سلولی‌اش، در مقابل استرس‌های شیمیایی چون حضور آنتی‌بیوتیک از حساسیت بالاتری برخوردار است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. همچنین ملکوتیان و همکارانش در بررسی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی بر روی *شرشیا کلاسی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت بیشتر *استافیلوکوکوس اورئوس* را نسبت به نانو ذرات روی نشان دادند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد [۱۹]. در هر غلظت از نانو ذرات، ضریب حساسیت با استفاده از رابطه (۱) تعیین شد و مقدار Z برای محدوده غلظت تهیه شده نانو ذره و زمان تماس‌های متفاوت، به‌طور میانگین محاسبه گردید. نتایج بررسی ضریب حساسیت طی زمان و غلظت نانو ذرات نشان داد که مقدار ضریب حساسیت نانو ذره با افزایش زمان تماس، افزایش نشان داده است.

در مطالعه حاضر کینتیک مرگ و ضریب حساسیت برای نانو ذرات ZnO، تعیین و جهت ارزیابی اثر ضد میکروبی آن علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد. براساس نتایج آزمایشات، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت بالاتری نسبت به نانو ذره مورد بررسی از خود نشان داد. همچنین مطالعه کینتیک مرگ نشان داد جمعیت باکتری‌های زنده مانده در تماس با نانو ذرات، با افزایش زمان تماس و غلظت نانو ذرات به‌طور خطی کاهش می‌یابد. شیب منفی نسبت بقای باکتری‌ها در مقابل زمان، بیانگر اثر ضد میکروبی قابل‌ملاحظه نانو ذرات است.

تعیین ضریب حساسیت و کینتیک مرگ می‌تواند روشی مناسب جهت بررسی اثر

ضدمیکروبی عوامل ضدمیکروبی مختلف یا سیستم‌های متفاوت ضدمیکروبی باشد و می‌توان از این دو پارامتر بدین‌منظور بهره جست. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به تعداد قابل دسترس و تازه از نمونه‌های بالینی باکتری /ستافیلوکوکوس/ اورئوس و نانو ذرات تک‌سایز (ZnO با قطر ۲۰ نانومتر) اشاره کرد. به‌عنوان پیشنهاد در مطالعات آتی می‌توان ارتباط اثر ضدمیکروبی این نانو ذرات در اندازه‌های مختلف با کینتیک مرگ و ضریب حساسیت را حتی در مقایسه با سایر نمونه‌های باکتریایی و سایر نانو ذرات مورد بررسی و مطالعه قرار داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه علوم پزشکی و مراکز درمانی شهر تبریز که در اجرای این مطالعه و تحقیق کمک شایانی کردند، تشکر کنند. همچنین نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

منابع

1. Eriksen, H.M., Iversen, B.G. (2005). "Aavitsland P. Prevalence of nosocomial infections in hospital in Norway 2002 and 2003". *Journal of Hospital Infection*, 60:40-45.
2. Hadi, M., Shokoohi, R., Namvar, A.M.E., Karimi, M., Aminabad, M.S. (2011). "Antibiotic Resistance of Isolated Bacteria from Urban and Hospital Wastewaters in Hamadan City". *Iranian Journal of Health and Environment*, 4(1):105-14.
3. Ohira, T., Yamamoto, O., Iida, Y., Nakagawa, Z-e. (2008). "Antibacterial activity of ZnO powder with crystallographic orientation". *Mater Sci: Mater Med*, 19: 1407-12.
4. Fang, M., Chen, J-H., Xu, X-L., Yang, P-H., Hildebrand, H.F. (2006). "Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests". *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(6).
5. Tawale, J.S., Dey, K.K., Pasricha, R., Sood, K.N., Srivastava, A.K. (2011). "Synthesis and characterization of ZnO tetrapods for optical and antibacterial applications". *Thin Solid Films*, 519 (3):1244-7.
6. Soni, I., Salopek-Soni, B. (2004). "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria". *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1):177-82.
7. He, L., Liu, Y., Mustapha, A., Lin, M. (2010). "Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*". *Microbiological Research*, 166(3):207-15.
8. Yoon, K-Y., Byeon, J-H., Park, J-H., Hwang, J. (2007). "Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles". *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47:23-6.
9. Zhang, L., Ding, Y., Povey, M., York, D. (2008). "ZnO Nanofluids "A potential antibacterial agent". *Progress in Natural Science*, 18(8):939-44.
10. Hsiao, M., Chen, S., Shieh, D., Yeh, C. (2006). "One-pot synthesis of hollow Au₃Cu₁ spherical-like and biomineral botallackite Cu₂(OH)₃Cl flowerlike architectures exhibiting antimicrobial activity". *J Phys Chem B*, 110:205-10.
11. Lok, C., Ho, C., Chen, R., He, Q., Yu, W., Sun, H. (2006). "Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles". *J Proteome Res*, 5:916-24.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1999). "Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline". Document M26-A. Wayne, PA: NCCLS.
13. US Food and Drug Administration. (2005). "Division of Antiinfective and Ophthalmology Drug Products (HFD-520)—Microbiological data for antibacterial drug products—development, analysis, and presentation". FDA.

14. Ruparelia, J.P., Chatterjee, A.K., Duttagupta, S.P., Mukherji, S. (2008). "Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles". *Acta Biomaterialia*, 4(3):707-16.
15. Sawai, J., Himizu, K., Yamamoto, O. (2005). "Kinetics of bacterial death by heated dolomite powder slurry". *Soil Biology and Biochemistry*, 37(8):1484-9.
16. Sawai, J., Shiga, H., Kojima, H. (2001). "Kinetic analysis of death of bacteria in CaO powder slurry. International Biodeterioration & amp"; *Biodegradation*. 2001; 47(1):23-6.
17. Sawai, J., Shiga, H., Kojima, H. (2001). "Kinetic analysis of the bactericidal action of heated scallop-shell powder". *International Journal of Food Microbiology*, 71(2-3):211-8.
18. Malakotian, M., Hoseinzadeh, E. (2011). "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*.
19. Sawai, J. (2003). "Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay". *Journal of Microbiological Methods*, 54(2):177-82.
20. Akiyama, H., Yamasaki, O., Kanzaki, H., Tada, J., Arata, J. (1998). "Effects of zinc oxide on the attachment of Staphylococcus aureus strains". *Dermatol Sci*, 17(1):67-74.