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 ارگانیسم می تواند باعث مسمومیت غذایی و گاستروآنتریت 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 پنمونیه (ATCC ۷۰۰۶۰۳) می باشد.

روش کار: در این تحقیق نانوذرات اکسید روی به روش مکانوشیمیایی سنتز شدند و با استفاده از روش‌های UV-Vis، FT-IR، EDX و میکروسکوپ الکترونی رویشی مورد تایید قرار گرفتند. خاصیت ضد میکروبی وآنتی بیوفیلم نانوذرات سنتزشده 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 ساختارکروی 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 پنمونیه در صنایع غذایی استفاده شود.

کلیدواژگان

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

* نویسنده مسئول، رایانامه: soheilaghaee@yahoo.com

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 می‌دهد. حدود یک سوم افراد سالم، ناقل روده ای این میکروب هستند و امروزه به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از مهم ترین باکتری‌های دخیل در عفونت‌های بیمارستانی مطرح می باشد. میزان مرگ و میر ناشی از آن بالا می باشد و باعث بیماری‌های مختلفی مانند عفونت دستگاه ادراری، سپتی سمی، پنومونی وعفونت‌های داخل شکمی در بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان می شود. عفونت‌های 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 بیمارستان‌های جهان تحت تأثیر قرار می دهد. هم چنین تغییر فلور میکروبی به وسیله آنتی بیوتیک‌ها باعث تهاجم باکتری‌های فرصت طلب و قارچ‌ها می شود (۱).

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

در حقیقت بیوفیلم، گروهی از سلول‌های میکروبی است که با شبکه ای از کانال‌های داخلی در ماتریکس گلیکوپروتئینی و پلی ساکاریدی 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). بیوفیلم در سیستم‌های آب صنعتی، تجهیزات پزشکی و صنایع غذایی تشکیل می گردد (۴). بیوفیلم‌ها با عوامل ضد باکتریایی مثل ضدعفونی کننده‌ها، حرارت، خشک کردن ازبین نمی روند و بر روی سطح باقی می مانند و خصوصا در بیمارستان‌ها سبب آلودگی و انتقال بیماری‌های عفونی می گردند و به طور فیزیکی از باکتری‌ها در برابرسیستم ایمنی میزبان و آنتی بیوتیک‌ها محافظت می کنند این پدیده یکی از علل عود بیماری‌های عفونی می باشد (۵). با توجه به مشکلات گفته شده نانوذرات فلزی به عنوان عوامل ضد میکروبی موثرند و از آن‌ها برای نگهداری مواد غذایی و محافظت در محیط صنعتی استفاده می شود. نانوذرات با طراحی سطوحی می توانند از تشکیل بیوفیلم جلوگیری کنند که این سطوح می تواند کلنی شدن باکتری‌ها و تشکیل بیوفیلم را محدود کند (۶). عملکرد نانویی این سطوح با پوشش مواد نانویی بستر می تواند از چسبندگی باکتریایی و تشکیل بیوفیلم جلوگیری نماید. بسیاری از نانوذرات دارای خواص ضد میکروبی هستند و فعالیت‌هایی ضد تشکیل بیوفیلم 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 سیستم‌های غذا و پزشکی در مهار پاتوژن‌های 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 چربی‌ها و سلول‌های باکتری با غشای قوی می شود و در نتیجه باعث تراوش محتوای درون سلولی و سرانجام مرگ سلول‌های باکتری‌ها می شود (۹).

از آنجایی که از بین بردن بیوفیلم باکتریایی تشکیل شده روی سطوح، بسیار مشکل است و بیوفیلم‌ها 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 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[1]

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[2]

در این روش از محیط کشت مولرهینتون آگار استفاده شد. ابتدا سوآب استریل را با سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک فارلند به خوبی آغشته نموده و درسطح پلیت کشت چمنی داده شد. سپس با انتهای پیپت پاستور، چاهکی به قطر 6 میلی متر ایجاد کرده و مقدار ۵×۱۰^{۵} میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذرات اکسید روی و در اندازه‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر در شرایط استریل درون چاهک‌ها ریخته شد و پلیت‌ها به مدت ۱ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. درصورت مشاهده هاله عدم رشد باکتری ، قطر هاله اندازه گیری شد (۱۱).

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC[3]) با استفاده از میکرودایلوشن

تهیه سوسپانسون باکتریایی

برای تهیه سوسپانسیون $1/5\times۱۰^{۶}$ 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 $1/5\times۱۰^{۶}$ 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 براث پر شد. خانه ۱۱ با ۱۵۰ میکرولیتر محیط و سوسپانسیون باکتریایی پر شد و خانه ۱۲ با ۱۵۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث 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 سوسپاسیون 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

1. Mechanochemical
2. Well diffusion
3. Minumum Inhibitory Concentration

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 میکروتیترپلیت

توانایی تشکیل بیوفیلم در باکتری کلبسیلا پنمونیه با روش میکروتیتر پلیت 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 میکروتیترپلیت ریخته شد. سپس۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت $1/5\times10^{6}$ در هر سه محیط به هر چاهک اضافه شد طوری که حجم محتویات هر چاهک به۲۰۰ میکرولیتر رسید. ازچاهک‌های ردیف آخر به عنوان شاهد منفی(بلانک) استفاده شده که حاوی فقط ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون باکتری درنظرگرفته 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 ۳۷درجه بررسی شدند. بعد ازگذشت 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 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 ازآن‌ها 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 رقعت‌های 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 میکروپیلیت‌ها در دو زمان متفاوت ۲۴ و ۴۸ ساعت در داخل انکوبه ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد و بعد ازگذشت زمان‌های متوالی میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج و محتویات آن‌ها را به آرامی خالی کرده و برای حذف باکتر ی‌های 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

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 اتانول ۹۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه رنگ متصل شده به باکتری‌های موجود در بیوفیلم را ازآن‌ها 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 بیوفیلم برای نانوذرات روی اکسید ۲۵۰،۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود (۱۳ و ۱۶). سپس نتایج مهار بیوفیلم در رقت‌های مختلف نانوذرات بررسی شد.

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

برای سنجش اثر این نانوذرات به منظور حذف و یا کشتن سلول‌های مولد بیوفیلم، 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 $1/5\times10^{6}$ 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 بیوفیلم پاتوژن‌ها، میکروپلیت‌ها از گرماخانه 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 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 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 بیوفیلم را ازآن‌ها 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 بیوفیلم برای نانو ذرات اکسید روی ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در نظر گرفته شد (۱۳، ۱۷ و ۱۸).

سنجش میزان تشکیل بیوفیلم

وضعیت تشکیل بیوفیلم درچاهک‌ها نیز طبق فرمول زیر محاسبه گردید که در آن ODC میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل وODT میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمارشده می باشد (۱۹).

عدم تشکیل بیوفیلم= $OD \leq ODC$

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

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

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

سنجش درصد کاهش تشکیل بیوفیلم

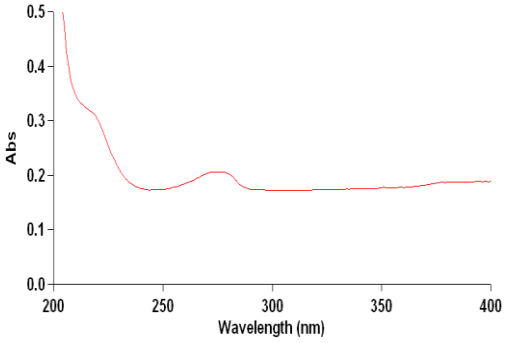
سنجش کارایی ترکیب ضد میکروبی یا درصد کاهش بیوفیلم را می توان از طریق جذب نوری چاهک‌های تیمار شده، کنترل و شاهد با توجه به رابطه زیر محاسبه نمود که در این رابطهODC ، میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترلODB میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد وODT میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار شده است (۱۹).

بیوفیلم میزان کاهش% = [((ODC-ODB)-(ODT-ODB)) / (ODC-ODB)]×100

نتایج

تأیید نانوذرات روی اکسید به روش طیف نگاری جذبی فرابنفش و مرئی (UV-Vis)[1]

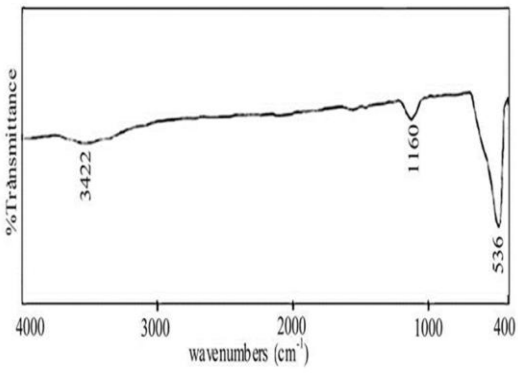
شکل ۱ طیف UV نانو ذرات روی اکسید را نشان می دهد که در ۲۷۵ نانو متر پیک داده است و یکی از مشخصه‌های نانوذرات روی اکسید می باشد.



شکل ۱- طیف UV نانوذرات روی اکسید

تأیید نانوذرات روی اکسید به روش طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)[2]

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

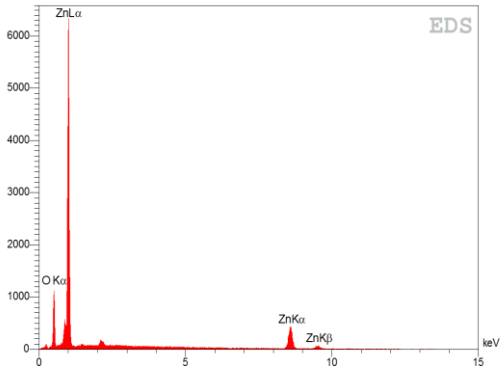


شکل ۲- طیف FT-IR نانوذرات روی اکسید

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

تأیید نانوذرات روی اکسید به روش طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX)[3]

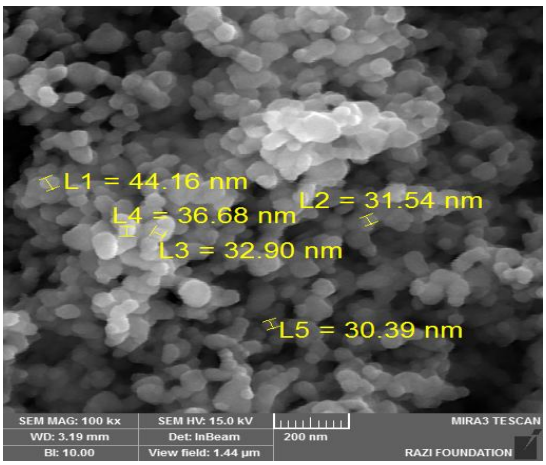
شکل ۳ طیف EDX را نشان می دهد که نانوذرات روی اکسید بیشترین ترکیب را در بین مواد ساخته شده دارد.



شکل ۳- طیف EDX نانوذرات روی اکسید

تأیید نانوذرات روی اکسید توسط میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM)[4]

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



شکل ٤- نانوذرات روی اکسید توسط میکروسکوپ الکترونی رویشی SEM

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

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 چاهک‌گذاری

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.

چاهک‌گذاری 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 / باکتری بیماریزا	۲۰ میکرولیتر	۳۰ میکرولیتر	۴۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
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

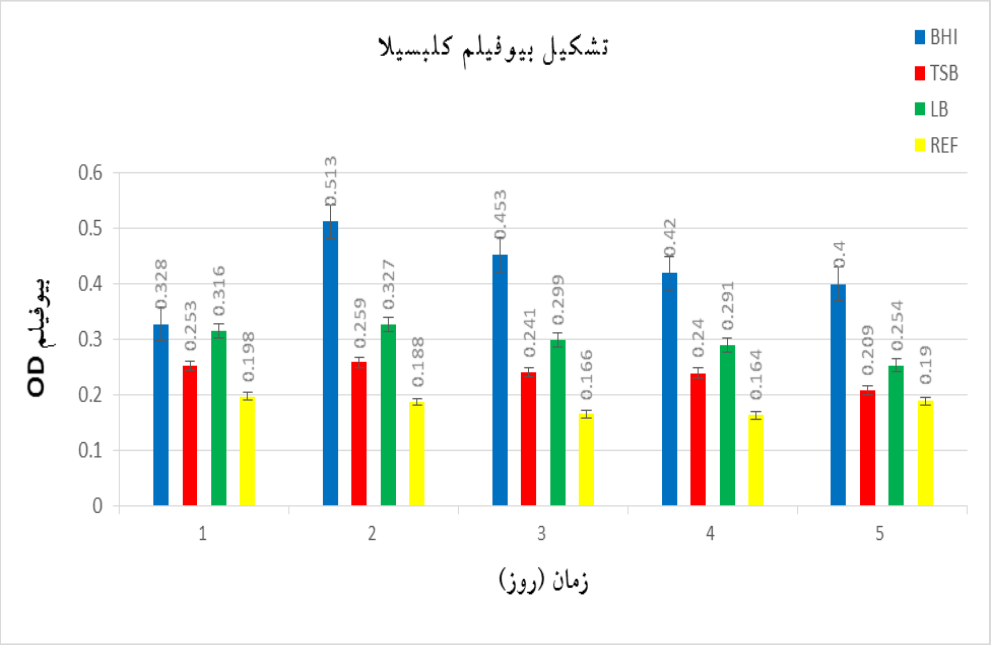
چاهک / باکتری بیماریزا	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱ تیمار شده	۱۲ کنترل شده
کلبسیلا پنمونیه	0/150 −	0/165 −	0/184 −	0/235 +	0/255 +	0/286 +	0/303 +	0/318 +	0/355 +	0/356 +	0/378	0/186

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

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



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

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

جدول ٤- مهار بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنمونیه توسط نانوذرات روی اکسید

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

حذف بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنمونیه توسط نانوذرات اکسید روی

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

جدول ۵- حذف بیوفیلم باکتری *کلبسیلا پنمونیه* توسط نانوذرات روی اکسید

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

بحث و نتیجه‌گیری

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 رویشی (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 پنمونیه 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 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 پنمونیه، نانوذرات اکسید روی را به روش رسوب و اصلاح سطح سنتز کردند و ویژگی‌های آن را به روش میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM) و طیف سنج پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) تعیین کردند که ابعاد به دست آمده از نانوذرات اکسید روی سنتز شده توسط آنان، ۴۰-۲۰ 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 پنمونیه مقاوم به آنتی بیوتیک از نوع ESBL را ارزیابی کردند که این نانوذرات را به روش ته نشینی سنتز کردند که درمواد اولیه این روش نیترات روی و هیدروکسید سدیم به کار گرفته شده بود. تأییدیه این نانوذرات را با استفاده از روش‌های میکروسکوپ الکترونی رویشی (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

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 ضدمیکروبی 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 پنمونیه 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 پنمونیه 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 پنمونیه 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 پنمونیه بوده است. در بررسی فعالیت مهار کنندگی تشکیل بیوفیلم ، از نانوذرات اکسید روی در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتراستفاده شد. نتایج نشان داد نانوذرات اکسید روی سنتز شده بخوبی می تواند در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیترتشکیل 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 پنمونیه، مشاهده کردند که طبق منحنی رشد استاندارد، نانوذرات اکسید روی پس از ۴ ساعت می تواند کلبسیلا پنمویه 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 پنمونیه 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 تعمییر 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 ویا 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 لیتراستفاده شد و اثر نانوذرات اکسید روی در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم کلبسیلا پنمونیه 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.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد نانوذرات اکسید روی علاوه براینکه 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 کشورانجام نشده بود و از آنجایی که از بین بردن بیوفیلم باکتریایی تشکیل شده روی سطوح، بسیار مشکل است و بیوفیلم‌ها 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_particlees of the standard strains of candida albicansbiofim 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.