ارزیابی فعالیت مهارکنندگی نانوذره اکسید روی (ZnO) بر سویه‌های استاندارد و ایزوله *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* جداشده از مواد غذایی

مریم برادران کتابچی[1]، خسرو عیسی زاده [2*]، علیرضا مسیحا[3]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان ، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان ، ایران.

۳. گروه بیوتکنولوژی ، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان ، ایران.

***نویسنده مسئول:** *issa_kaam@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۱/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۲۶

چکیده

امروزه فشار روزافزونی جهت یافتن روش‌های جدید برای حفظ ایمنی میکروبی غذاها به وجود آمده است.توانایی ساخت نانو ذرات در شکل‌ها و سایزهای مختلف منجر به ایجاد دسته‌ی وسیعی از عوامل ضدمیکروبی شده است. این مطالعه باهدف مشخص کردن اثر ضد باکتریایی نانو ذرات اکسیدروی در غلظت‌های مختلف بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* استاندارد و جداشده از مواد غذایی انجام شد. در این مطالعه تجربی سوسپانسیونی از کشت مایع نانو اکسید روی تجاری در غلظت‌های مختلف تهیه شد و پس از آماده‌سازی سویه‌های میکروبی، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) با استفاده از روش انتشار دیسک تعیین شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده بیشترین قطر هاله‌های عدم رشد مربوط به غلظت ۵۰۰۰ µg/ml از نانوذره اکسید روی بود. میانگین قطر هاله‌های عدم رشد برای سویه‌های استاندارد *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۲۰/۵ و ۱۷/۴ و سویه‌های جداشده از مواد غذایی ۱۸/۴ و ۱۵/۴ میلی‌متر تعیین شد. ازنظر حساسیت، *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین و *اشریشیاکلی* کمترین تأثیر را داشتند. نتایج مقایسه میانگین به روش دانکن ($P < ۰/۰۰۵$) نشان داد که زمان‌ها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشته و در رتبه‌های متفاوتی قرار دارند. در بین زمان‌ها، زمان صفر بیشترین و زمان ۲۴۰ کمترین OD را داشته است. یافته‌های این مطالعه نشان داد که از نانو ذرات اکسید روی برای مهار باکتری‌های یادشده می‌توان استفاده نمود و پتانسیل مناسبی برای جایگزینی مواد نگه-دارنده جهت جلوگیری از فساد مواد غذایی می‌باشد.

کلمات کلیدی: اکسید روی، *استافیلوکوکوس اورئوس* ، *اشریشیاکلی* ، فعالیت ضد میکروبی، نانوذره

مقدمه

به دلیل نیاز روزمره انسان به مواد غذایی هرگونه تغییر در کیفیت و کمیت مواد غذایی تأثیر بسزایی در بهداشت و سلامت جامعه خواهد داشت. زدودن آلودگی‌های میکروبی از مواد غذایی در هر یک از مراحل تولید، نگهداری و عرضه مواد غذایی قابل اهمیت است(Shi et al., 2008). تغییرات ترکیب اولیه مواد غذایی موجب فساد غذا گشته و می‌تواند به‌عنوان منبع عفونت اپیدمی‌های مهلکی را ایجاد نماید . این‌گونه انتقال و سرایت بیماری در افراد مستعد مانند کودکان، بیماران دچار نقص سیستم ایمنی و سالخوردگان که دارای سیستم ایمنی ضعیف می‌باشند از اهمیت بیشتری برخوردار است (Brooks et al., 2001). امروزه فناوری نانو در عرصه‌های مختلف صنعتی، بهداشتی، پزشکی و غذایی تأثیر با اهمیتی بر جای گذاشته است. بی‌شک یکی از تأثیرگذارترین اثر فناوری نوین در زندگی بشر، مقوله صنعت غذا می‌باشد. نانو ذرات، ذرات ریزه پراکنده یا ذرات جامد با اندازه ۱۰- ۱۰۰ نانومتر هستند که به اشکال مختلف تهیه می‌شوند(Langer et al., 2005). بررسی‌ها نشان داده است که هر چه اندازه نانو ذرات کوچک‌تر باشد، خصوصیات و فعالیت‌های جدید و متفاوت‌تری از خود نشان می‌دهند. این ویژگی‌ها باعث شده است که امروزه سرعت استفاده از نانو مواد بسیار سریع گسترش پیدا کند به‌طوری‌که در تمام ابعاد زندگی همچون سیستم‌های الکتریکی، مبارزه با میکروب‌ها، تشخیص و درمان بیماری‌ها کاربرد آن شناخته شود (Kumar et al., 2007; Aslan et al., 2005; Sosa et al., 2003). برخی از نانو ذرات به‌عنوان یک روش نوظهور در پیشرفت علم داروسازی مدرن

به‌حساب می‌آیند که به علت داشتن پتانسیل بالا جهت انجام فرآیندهای درمانی اختصاصی، در مطالعات زیست‌شناسی و داروسازی، کاربرد فراوان دارند. برای مثال، آن‌ها قادرند درزمانی کمتر از ۴ ساعت، ۶۵۰ سلول سرطانی را از بین ببرند(Hardman, 2005; Dreher, 2008). نانو مواد 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 داده‌شده است که نانو ذراتی چون Ag، Ti، Zn و Cr و اکسید آن‌ها خاصیت باکتری کشی بالایی دارند (Li et al., 2005). مهم‌ترین مکانیسم-های ضدمیکروبی نانو ذرات از طریق تولید فوتوکاتالیتیکی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[1]، تخریب غشا و دیواره سلول باکتریایی، قطع انتقال انرژی، مهار فعالیت آنزیمی و مهار سنتز DNA می‌باشند (Huh et al., 2011; Mahendra et al., 2008) ترکیبات ضد میکروبی غیر آلی به‌ویژه فلزات و اکسید آن‌ها به دلیل توانایی تحمل شرایط سخت فرآوری ازجمله دما وفشاربالا، موردتوجه بسیاری از محققان قرارگرفته است (Zhang et al., 2007).

روی فلزی است که پراکندگی فراوانی در طبیعت داشته و برای عملکرد بسیاری از متالوپروتئین ها ضروری می‌باشد. نانو ذرات اکسید روی دارای اثرات ضد میکروبی بوده و نسبت به نانو ذرات نقره مزایایی دارند. ازجمله این مزیت‌ها می‌توان به قیمت پایین‌تر، ظاهر سفیدرنگ و توانایی بلوکه کردن اشعه فرابنفش اشاره کرد (Lorens et al., 2012). اثر ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی علیه دسته وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی همچون *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس*، *سالمونلا تایفی موریوم* و *انتروباکترآئروژنز* بررسی‌شده و به اثبات رسیده است (Raghupathi et al., 2011). باکتری‌ها مهم‌ترین عامل میکروبی بیماری‌های ناشی از مواد غذایی می‌باشند (رضویلر، ۱۳۸۲). آلودگی به این میکروارگانیسم‌ها در مقایسه با آلودگی‌های شیمیایی و فیزیکی نقش مهم‌تری را در بروز مسمومیت‌های غذایی ایفا می‌کند. زیرا این عوامل معمولاً تغییراتی را در رنگ، بو و طعم مواد غذایی ایجاد نمی‌کنند (Leliveld et al., 2003). *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا منوسیتوژنز* و سالمونلاها از مهم‌ترین عوامل میکروبی در بروز مسمومیت‌های غذایی و یا عفونت‌های گوارشی هستند و می‌توانند بهداشت عمومی را به مخاطره می اندازند. اشرشیا کلی باکتری بیماری‌زای روده‌ای عامل مهم اسهال و اختلالات گوارشی در کشورهای درحال‌توسعه و مکان‌های با فقر بهداشتی است(رضویلر، ۱۳۸۲). *اشریشیاکلی* در روده بزرگ انسان و حیوان وجود دارد و تنها گونه در این جنس است که در بیماری‌زایی انسان اهمیت دارد ، این باکتری از شایع‌ترین علت‌های عفونت ادراری است و به‌عنوان یک میکروارگانیسم فرصت‌طلب در عفونت‌های زخم و مننژیت شرکت می‌کند. علاوه بر این برخی از گونه‌های آن عامل عفونت‌های اسهالی هستند(Papaspyrides *et al*., 2009). وجود این میکروارگانیسم در مواد غذایی نشان‌دهنده آلودگی مدفوعی است (Vangarde, 1994) . *استافیلوکوکوس اورئوس* یک باکتری گرم مثبت و بدون اسپوراست. برخی از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسین تولید می‌کنند که عامل ایجادکننده گاستروآنتریت در انسان است (Zeuthen, 2003). این میکروارگانیسم یکی از سه عامل مهم مسمومیت غذایی در جهان است که به‌طور گسترده‌ای در طبیعت موجود می‌باشد و غالباً به‌صورت میکرو فلور طبیعی پوست، بینی و بخش فوقانی دستگاه تنفسی دیده می‌شوند (Jawetz, 2010). در این تحقیق خاصیت ضد میکروبی نانوذره اکسید روی جهت مهار رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* مورد ارزیابی قرارگرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف نانوذره روی (ZnO) بر روی سویه‌های استاندارد و ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* جداشده از مواد غذایی مورد آزمایش قرار گرفت. بدین منظور کشت لیوفیلیزه باکتری‌های *اشرشیاکلی* PTCC ۱۳۳۰ و *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC ۱۱۱۲ که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید، جهت بررسی مورداستفاده قرار گرفت. جهت فعال‌سازی باکتری،

[1] Reactive Oxygen Species

در ابتدا کشت‌های لیوفیلیزه در محیط TSB[2] در دمای ۳۷°C به مدت ۱۸ ساعت دو بار به‌طور متوالی کشت داده شدند. سپس با نسبت پنج به یک با گلیسیرین استریل مخلوط و در لوله‌های اپندرف استریل دردمای ۲۰°C- نگه-داری شدند. از کشت مادر، کشت ذخیره تهیه شد و در مراحل بعدی از کشت ذخیره استفاده شد. تعداد ۳۰ نمونه خامه و ۴۰ نمونه همبرگراز بازار خریداری شد. نمونه‌ها در کنار یخ و در کمتر از شش ساعت به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. نمونه‌ها در آزمایشگاه در یخچال قرار داده‌شده و آزمایش‌های مربوطه در کمتر از ۲۴ ساعت بر روی آن‌ها انجام شد. ابتدا نمونه‌ها طبق روش استاندارد آماده‌سازی نمونه، شماره ۳۵۶ آماده شدند (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۰). سپس آزمایش‌های مختلف جهت جستجوی باکتری *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، انجام شد. برای این منظور در ارتباط با نمونه‌ی خامه، ۱۰ گرم نمونه به ۹۰ میلی‌لیتر سرم رینگراستریل اضافه شد (رقت ۰/۱) و سایر رقت‌ها نیز با استفاده ازسرم رینگراستریل مطابق با استاندارد ملی ایران، شماره ۳۵۶ (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۰) تهیه شد. سپس مطابق با دستورالعمل استانداردهای خاص برای جداسازی و شمارش کلیفرم‌ها از روش کشت آمیخته و با استفاده از محیط کشت ویولت رد بایل آگار و انکوباسیون دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و برای تشخیص *اشرشیا کلی* از محیط‌های اوره، سیمون سیترات و SIM[3] مطابق استاندار ملی ایران، شماره ۲۳۹۵ استفاده شد (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۶). به‌منظور جداسازی و شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* از روش اسپرید و از محیط کشت برد پارکر و تست‌های کاتالاز و کوآکولاز مطابق استاندار ملی ایران، شماره ۱۱۹۴ (سازمان ملی استاندارد ایران،۱۳۸۰) استفاده شد. سپس تعداد میکروب‌ها (برحسبcfu/g) ثبت و ضمن مقایسه با حد مجاز استاندارد نسبت به سطح پذیرش آن‌ها اظهارنظر گردید. جهت نمونه-های همبرگر خریداری‌شده پس از آماده‌سازی نمونه مطابق با استاندارد ملی ایران، شماره ۲-۸۹۲۳، (سازمان ملی استاندارد ایران،۱۳۸۵). برای تهیه سوسپانسیون اولیه نمونه-های همبرگر از مخلوط‌کن ضربه‌ای[4] استفاده شد. شمارش *اشرشیا کلی* طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۹۴۶، (سازمان ملی استاندارد ایران،۱۳۸۴) انجام شد. که شامل مراحل کشت در محیط کشت غنی کننده انتخابی آبگوشت لوریل سولفات، تلقیح در محیط کشت انتخابی آبگوشت EC[5] و سپس محیط آب پپتونه و بررسی تولید اندول می-باشد. شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها نیز مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۵۲۷۲ (سازمان ملی استاندارد ایران،۱۳۸۶) و با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگار انجام شد. شمارش استافیلوکوکوس *اورئوس* های کوآگولاز مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و سایر گونه‌ها) بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۱-۶۸۰۶ (سازمان ملی استاندارد ایران، ۱۳۸۶) و با استفاده از محیط کشت برد - پارکرآگار[6] انجام گردید. برای انجام آزمون کوآگولاز از پلاسمای خرگوش استفاده شد.

بررسی خواص ضد میکروبی

ابتدا برای شاهد یک استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد (Shahverdi,2007; Hernández-Sierra,2008). به این منظور ml ۰/۶ از محلول کلرور باریم ۱ درصد در ml ۱۰۰ اسیدسولفوریک به حجم ۱۰۰ رسانده شد و جذب نوری یا دانسیته نوری این محلول برابر با ۱ خوانده شد. محیط‌های نوترینت براث که از قبل آماده و درون لوله‌های دربدار ریخته شده بود را در نزدیکی شعله قرار داده و سپس یک لوپ کامل از استافیلوکوکوس اورئوس که از قبل فعال‌شده بود به محیط نوترینت براث وارد کرده و تکان داده شد تا باکتری کاملاً در محیط یکنواخت شود. لوله‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری شد. سپس کدورت لوله‌های حاوی نوترینت براث و باکتری بررسی شدند. این کدورت مشابه کدورت استاندارد نیم مک فارلند است و جذب نوری آن برابر با ۱ و طبق استاندارد نیم مک فارلند شمارش تعداد باکتری در آن CFU/ml ۱۰۸× ۱/۵ از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود. عملیات یادشده به‌طور مشابه برای باکتری اشرشیاکلی نیز تکرار گردید. در این مطالعه تجربی، نانو ذرات اکسید روی با

[2] Trypticase Soy Broth
[3] Sulfide Indol Motility
[4] Stomacher
[5] EC Broth
[6] Baird- Parker Agar

مشخصات معین (جدول شماره ۱) به‌صورت پودر از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان واقع در مشهد خریداری شدند. به‌منظور اثربخشی خاصیت مهارکنندگی در ابتدا محلول استوک g/l ۱۰ از نانوذره اکسید روی در محیط کشت استریل تریپتی‌کاز سوی براث به‌صورت سوسپانسیون تهیه شد و برای پخش شدن مناسب آن از دستگاه اولترا سونیک به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. و غلظت‌های µg/ml ۴/۸۸ تا ۵۰۰۰ در محیط کشت تهیه گردید. ۲۰ میکرو لیتر از هریک از غلظت‌های محلول‌های کلوئیدی نانوذره اکسید روی بر روی دیسک‌های بلانک استریل قرار داده شد و به مدت یک شبانه‌روز به محتویات درون ظرف زمان داده شد تا نانوذره به‌طور کامل جذب دیسک‌های کاغذی گردد .سپس هرکدام از این دیسک‌ها به‌طور جداگانه بر روی محیط کشت مولر هینتون آگاری که حاوی سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند از هریک باکتری‌های استاندارد و جداشده از مواد غذایی مورد آزمایش بود قرار داده شد. از یک دیسک آغشته به آب مقطر دو بار تقطیرشده به‌عنوان شاهد استفاده شد. بعد از ۲۴ ساعت به بررسی رشد و یا عدم رشد هریک از باکتری‌های مورد آزمایش در اطراف دیسک‌ها پرداخته شد. هر آزمایش سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شد.

جدول شماره ۱- مشخصات نانو ذرات اکسید روی مورداستفاده

نوع نانوذره	ZnO (Zinc Oxide)
درصد خلوص	۹۹
اندازه نانوذره	۱۰-۳۰ nm
سطح ویژه	۶۰ -۲۰۰ m2/g
رنگ	سفید شیری
فاز کریستالی	Single
شکل کریستالی	نزدیک به کروی
چگالی واقعی	۵/۶۰۶ g/cm 3

تعیین MIC و MBC

برای تعیین MIC از روش Macro Dilution Broth استفاده شد. ۱۱ لوله‌آزمایش استریل محتوی محیط کشت مولر هینتون براث انتخاب و غلظت‌های µg/ml ۴/۸۸ تا ۵۰۰۰ از نانوذره اکسید روی ر تهیه شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هریک از سوسپانسیون‌های میکروبی با کدورت معادل نیم مک فارلند به هر یک از لوله‌های اضافه شد. یک لوله حاوی سوسپانسیون میکروبی فاقد نانوذره به‌عنوان شاهد استفاده شد. لوله‌ها در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۲۰۰۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. میزان کدورت محتویات هر یک از لوله‌های آزمایش هرروز بررسی‌شده و به‌این‌ترتیب میزان MIC نانوذره اکسید روی برای هریک از میکروارگانیسم‌ها تعیین شد. کمترین غلظت از سوسپانسیون نانوذره که کدورت در لوله نشان نداد به‌عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده رشد نانوذره تعیین شد. در لوله-هایی که عدم رشد داشتند با انجام یک ساب کالچر بر روی محیط کشت مولر هینتون آگارMBC تعین شد. این بررسی‌ها سه بار تکرار شده و در کنار لوله‌های تست یک لوله کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون باکتریایی فاقد نانوذره در نظر گرفته شد.

بررسی سینتیک کشندگی نانوذرات در زمان‌های مختلف

برای مشاهده اثر زمان تماس نانوذرات اکسیدروی علیه دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* سوسپانسیون باکتری به غلظت Mc Farland ۰/۵ (معادل CFU/ml ۱۰^{۸}× ۱/۵ میکروب) در مقایسه با استاندارد مک فارلند تهیه گردید.سپس سوسپانسیونی از غلظت‌های 1× MIC و MIC 2× در هر لوله‌آزمایش ml ۱ توسط سمپلر ریخته و یک نمونه درون هر لوله قرار داده شد.از یک لوله فاقد نانوذره به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. در شروع کار µl ۱۰ از هر سوسپانسیون جدا شد و به‌عنوان زمان اولیه تماس نمونه‌ها با باکتری، کشت خطی داده شد. سپس لوله‌های آزمایش درون شیکرانکوباتور، به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد قرار داده شد. پس از قرار دادن نمونه‌ها درون انکوباتور انکوباتور بعد از ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰، ۲۱۰، ۲۴۰، ۳۰۰ و ۳۶۰ دقیقه نیز مجدداً µl ۱۰ سوسپانسیون برداشته و

کشت داده شد. هر پلیت بعدازاین که کشت خطی داده شد، به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور انکوبه شد و سپس کلونی‌های باکتری شمارش گردید.

آنالیز آماری

در تجزیه‌وتحلیل آماری قبل از آنالیز، داده‌ها نرمال‌سازی شدند و با توجه به توزیع نرمال داده‌ها، از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و سپس آزمون دانکن در نرم‌افزار SPSS برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها استفاده شد. اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

جدول ۱ نتایج مربوط به کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های موجود در سوسپانسیون و غلظت‌های مختلف ازنمونه‌های حاوی نانوذرات اکسید روی را نشان می‌دهد. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که در غلظت ۵۰۰۰µg/ml نانوذره اکسید روی در برابر سویه‌های استاندارد و جداشده از مواد غذایی بیشترین اثر را داشته است. میانگین قطر هاله عدم رشد سویه‌های استاندارد *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۲۰/۵ و۱۷/۴ و برای گونه‌های جداشده از مواد غذایی به ترتیب ۱۸/۴و۱۵/۴میلی‌متر تعیین شد. در این مطالعه مشخص شد که سویه استاندارد *اشرشیاکلی* بیشترین اثر مهاری را نشان می‌دهد که با کاهش غلظت نانوذره از اثرات مهاری آن کاسته شده است. در غلظت‌های µg/ml ۹/۷۶ و µg/ml ۴/۸۸ هیچ‌گونه اثر مهاری علیه گونه‌های باکتریایی مورد آزمایش دیده نشد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان دریافت که نانو ذرات اکسید روی بر روی باکتری‌های گرم منفی مؤثرتر از باکتری‌های گرم مثبت عمل کرده‌اند. مقادیر حداقل غلظت بازداری[۷] و باکتری کشی[۸] نانو ذرات اکسید روی برای میکروارگانیسم‌های حساس ترتیب در محدوده mg/ml ۳۱۲/۵ - ۷۸/۱۲ و ۲۵۰۰ - ۱۵۶/۲۵ بود(جدول شماره ۲).

این نتایج مشخص کرد که ازلحاظ حساسیت به نانو ذرات اکسید روی در باکتری‌های مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری ($P <۰/۰۰۱$) وجود دارد. به عبارتی، بیش‌ترین حساسیت در *اشرشیاکلی* و کم‌ترین حساسیت در *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد (نمودار۱).

داده‌های حاصل از آزمایش زمان مهار و مرگ باکتری‌ها (CFU) در زمان‌های مختلف با دو غلظت MIC x 1 و MIC x 2 سوسپانسیون نانوذره اکسید روی به‌صورت آزمایش فاکتوریل با دو عامل زمان و باکتری در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار مورد تجزیه آماری قرار گرفت.

تجزیه واریانس مشخص کرد که سطوح مختلف هر دو عامل زمان و باکتری در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند. اثرات متقابل هر دو عامل غلظت و باکتری نیز معنی‌دار شد (نمودار۲ و ۳). همچنین مقایسه میانگین نتایج به روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد نشان داد که زمان‌ها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشته و در رتبه‌های متفاوتی قرار دارند. در بین زمان‌ها، زمان صفر بیشترین و زمان ۳۶۰ کمترین OD را نشان دادند(نمودار۴و۵).

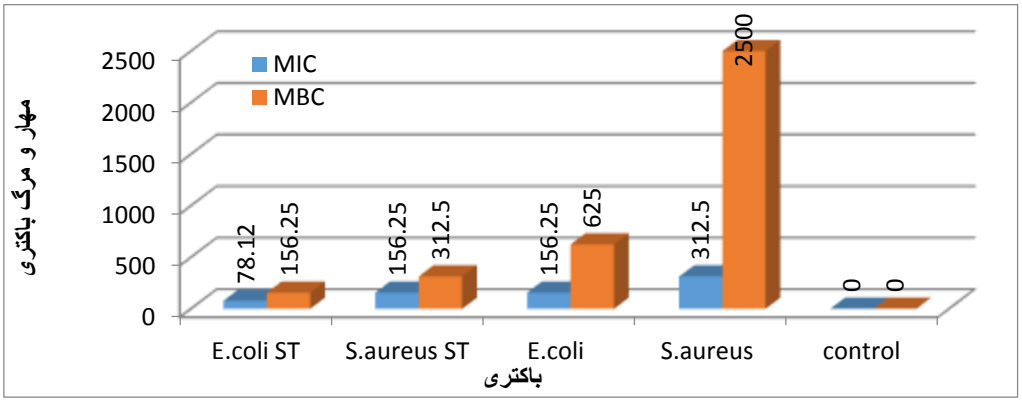
[۷] Minimum Inhibition Concentration
[۸] Minimal Bactericidal Concentration

جدول ۲- فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات اکسید روی علیه گونه‌های باکتریایی مورد آزمایش در غلظت‌های مختلف بر اساس روش انتشار دیسک برحسب میلی‌متر

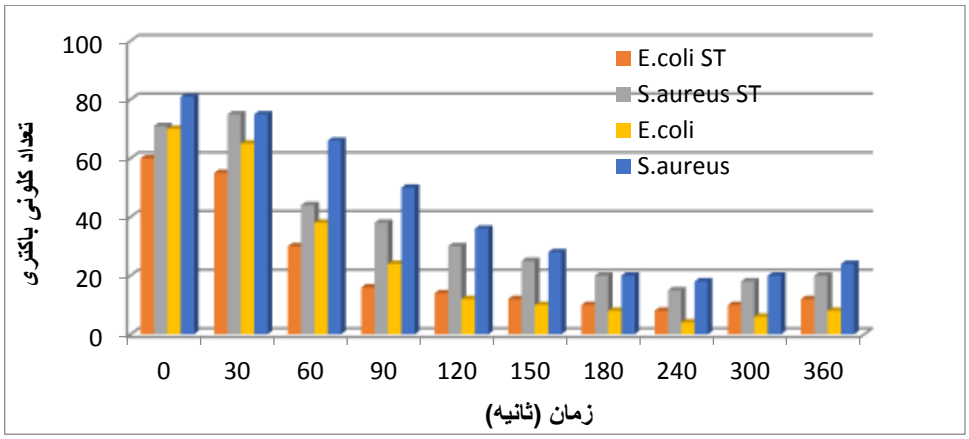
غلظت نانوذره اکسید روی (*µg/ml*)	میکروارگانیسم			
	E. coli PTCC1399	S. *aureus* PTCC 1189	S. *aureus*	*E. coli*
۵۰۰۰	۲۰/۵	۱۷/۴	۱۵/۴	۱۸/۴
۲۵۰۰	۱۸	۱۴/۲	۱۲/۲	۱۶/۲
۱۲۵۰	۱۷/۵	۱۱/۲	۹/۲	۱۴/۲
۶۲۵	۱۵/۴	۱۱	۶/۲	۱۳/۲
۳۱۲/۵	۱۴	۱۰/۲	۴/۵	۱۱/۵
۱۵۶/۲۵	۶/۲	۴/۲	۲/۱	۵/۵
۷۸/۱۲	۴/۲	۱/۷	۰	۳/۵
۳۹/۰۶	۱/۲	۰	۰	۱
۱۹/۵۳	۱	۰	۰	۱
۹/۷۶	۰	۰	۰	۰
۴/۸۸	۰	۰	۰	۰

جدول ۳- مقادیرMIC وMBC نانو ذرات اکسید روی علیه میکروارگانیسم‌های آزمایش‌شده از طریق سنجشMacrodilution

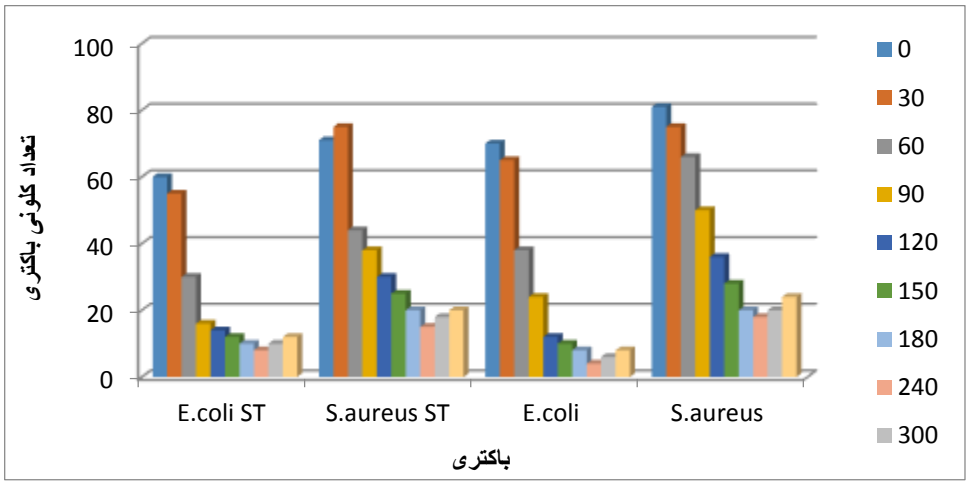
مهارومرگ باکتری	میکروارگانیسم			
	E. coli PTCC1399	S. *aureus* PTCC	S. *aureus*	*E. coli*
MIC (mg/ml)	۷۸/۱۲	۱۵۶/۲۵	۳۱۲/۵	۱۵۶/۲۵
MBC (mg/ml)	۱۵۶/۲۵	۳۱۲/۵	۲۵۰۰	۶۲۵



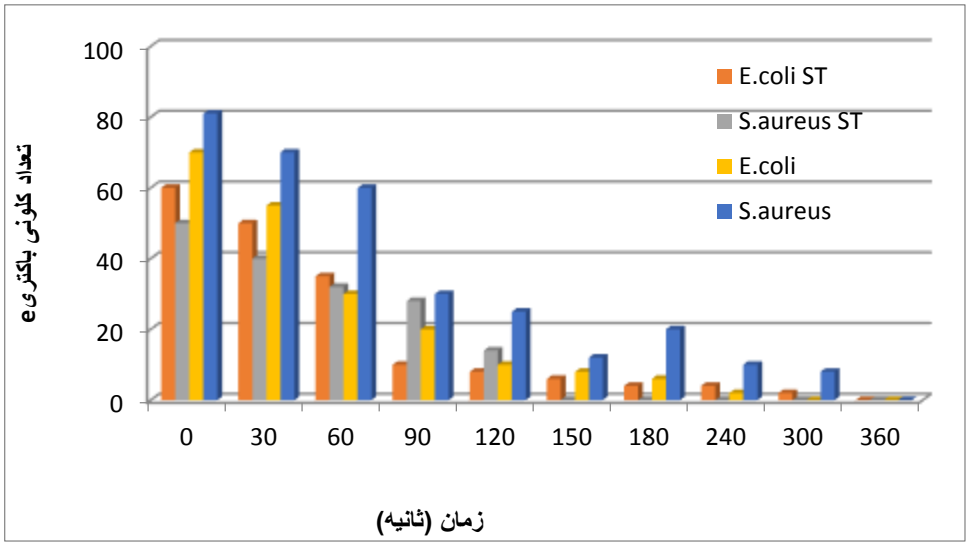
نمودار ۱- تغییرات میزان MIC و MBC نانوذره اکسید روی در مقابل سویه‌های میکروبی مورد آزمایش



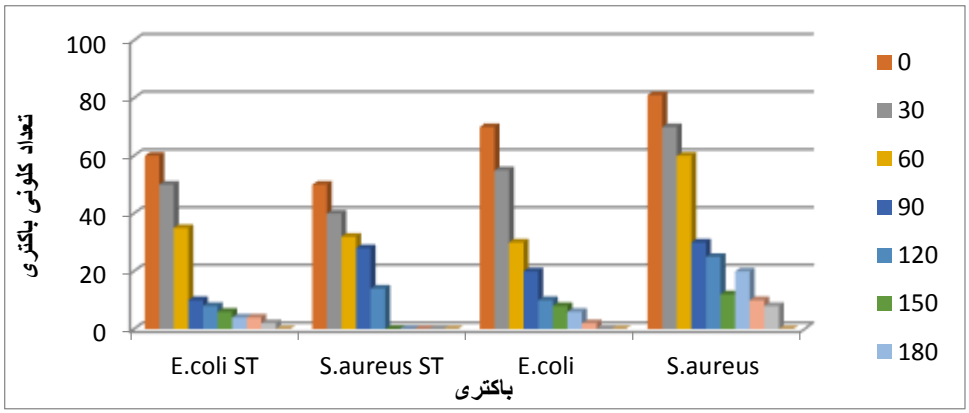
نمودار۲ -تغییرات مهار و مرگ باکتری در زمان‌های مختلف با غلظت MIC x 1 سوسپانسیون نانوذره اکسید روی



نمودار۳ - تغییرات مهار و مرگ باکتری‌های مختلف با غلظت MIC x 1 سوسپانسیون نانوذره اکسید روی



نمودار۴- تغییرات مهار و مرگ باکتری در زمان‌های مختلف با غلظت MIC x2 سوسپانسیون نانوذره اکسید روی



نمودار۵ - تغییرات مهار و مرگ باکتری‌های مختلف با غلظت MIC x 2 سوسپانسیون نانوذره اکسید روی

بحث

در این مطالعه از نانوذره‌ی اکسید روی (ZnO) برای ارزیابی تأثیر آن بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی استفاده شد. در این مطالعه نیز همانند مطالعات سایر محققین این ماده خاصیت ضد باکتریایی خوبی از خود نشان داد. یافته-های این مطالعه نشان داد که نسبت بقاء میکروارگانیسم با افزایش غلظت نانو ذرات به سرعت کاهش یافته است و بیانگر افزایش فعالیت باکتری کشی نانوذرات در سوسپانسیون به دلیل افزایش غلظت آن ها بوده است. همه باکتری‌ها با افزایش غلظت MIC×1 به MIC×2 درمقدارضریب تعیین افزایش داشته اند. بررسی آماری نیز نشان از معنی دار بودن آن دارد. بالا بودن مقدار ضریب تعیین در این مدل بیانگر افزایش مرگ باکتری‌ها به صورت خطی در اثر افزایش غلظت و زمان تماس می‌باشد. این نتایج با آنچه توسط Reddy و همکارانش به دست آمد مطابقت داشت (Reddy, 2007). در مطالعه خانی و همکاران نشان داده‌شده است که با استفاده از نانو ذرات می‌توان رشد باکتری‌های بیماری‌زایی چون شیگلا، *اشریشیاکلی* و استافیلوکوکوس را مهار کرد (Khani, 2010). در یافته‌های حاصل از این مطالعه مشخص شد که میزان غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری‌ها بسته به نوع باکتری‌ها متفاوت بوده و باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری دارند. برخی از محققین اعتقاد دارند این حساسیت می‌تواند مربوط به نوع دیواره باکتری‌های گرم مثبت وفیزیولوژی این باکتری باشد. این موضوع با نتیجه حاصل از مطالعه Selvam و همکاران

مطابقت دارد. در حالی‌که Sinha و همکاران در بررسی اثرات ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی نشان دادند که گونه‌های گرم منفی انتوباکتر و مارینوباکتر حساسیت بیشتری به این نانو ذرات در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتلیس دارند. علت مقاوم بودن باکتری‌های گرم مثبت به وجود لایه‌های پپتیدوگلیکانی ضخیم در این باکتری‌ها نسبت داده می‌شود (Sinha et al., 2011)بااین‌حال در برخی مطالعات نتایجی عکس نتایج فوق گزارش‌شده است. به‌عنوان‌مثال لی و همکاران در بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی پوشش داده‌شده روی فیلم پلی وینیل کلراید برعلیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* نشان دادند که نانو ذرات اکسید روی علیه باکتری‌های گرم مثبت مؤثرتر از باکتری‌های گرم منفی عمل می‌کنند (Li et al., 2009). اثر ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی را می‌توان با چندین مکانیسم توجیه کرد: ۱) القای استرس اکسیداتیو به دلیل تولید رادیکال‌های اکسیژن فعال، که واکنش این رادیکال‌های اکسیژن فعال با DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها منجربه مرگ سلول می‌شود ۲) از بین رفتن آرایش غشاء به دلیل تجمع نانو ذرات در غشای باکتری و هم‌چنین تجمع آن‌ها در درون سلول ۳) آزاد شدن یون‌های روی که بااتصال به غشاء میکروارگانیسم‌ها سبب اعمال اثرضدمیکروبی می‌شوند. نانو ذرات از طریق تماس نزدیک با سلول باعث تغییر در ریز محیط باکتری شده و با افزایش حلالیت فلز یا تولید رادیکال‌های اکسیژن فعال درنهایت باعث آسیب به غشاء می‌شوند(Emamifar et al., 2010). ساوایی در مطالعه خود تأثیر رادیکال‌های اکسیژن تولیدشده توسط اکسید روی را در ایجاد اثر ضد میکروبی آن بررسی کرد و دریافت که تولید پراکسید هیدروژن منجر به بروز اثر ضد میکروبی شده و با افزایش غلظت آن غلظت پراکسید هیدروژن تولیدشده هم به‌صورت خطی افزایش می‌یابد (Sawai et al., 1996). در برخی از مطالعات نیز به سوراخ شدن دیواره باکتری درنتیجه نفوذ نانو ذرات اکسید فلزی به درون سلول اشاره شده است واعتقاد براین است که در اعمال اثر ضد میکروبی نقش دارد (Makhluf et al., 2005). ازآنجاکه اثر ضد میکروبی نانوذره اکسید روی برای هر سویه اختصاصی هست، درنتیجه کاربرد این نانوذره جهت کنترل باکتری‌ها به مطالعات اختصاصی نیاز دارد و افزایش زمان تماس و غلظت عامل ضد میکروبی مورداستفاده، به‌عنوان فاکتوری مهم می‌تواند در کاهش تعداد باکتری‌ها مؤثر باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که نانو ذرات اکسید روی درکاهش میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای وعامل فساد موجود درمواد غذایی موثراست. دراین میان باکتری‌های گرم مثبت درمقایسه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نشان دادند که این امر می‌تواند ناشی از ویژگی‌های دیواره این دسته از باکتری‌ها باشد. با توجه به نتایج منتج ازاین مطالعه، می‌توان به استفاده از این نانوذرات در بخش‌های مختلف صنایع غذایی جهت مهار یا کاهش رشد میکروارگانیسم‌های موجود در غذا در آینده ی نزدیک امیدواربود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان و اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی رشت به دلیل حمایت‌های اجرایی اعلام می‌دارند.

منابع

۱. رضویلر، ودود. (۱۳۸۷). میکروب‌های بیماری‌زا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت‌های غذایی، چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران، صفحه۸۴-۲.

۲. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۰). آماده کردن نمونه-های مواد غذایی و تهیه سوسپانسیون‌های مختلف جهت شمارش میکروبی. استاندارد شماره ۳۵۶.

۳. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۶). ویژگی‌های میکروبیولوژیک فرآورده‌های شیرینی و قنادی. استاندارد شماره ۲۳۹۵.

۴. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۰). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک و دام، روش شناسایی و شمارش استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت در مواد غذایی. قسمت اول و دوم: شمارش، جستجو و شناسایی. استاندارد شماره ۲و۱-۱۱۹۴.

۵. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۵). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-آماده سازی آزمایه، سوسپانسیون اولیه

ورقت های اعشاری برای آزمون‌های میکروبیولوژی قسمت دوم: مقررات ویژه برای آماده‌سازی گوشت و فرآورده‌های آن. استاندارد شماره ۲-۸۹۲۳.

۶. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۴). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جستجو و شمارش اشرشیاکلی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی. استاندارد شماره ۲۹۴۶.

۷. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۶). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش جامع برای شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در ۳۰ درجه سلسیوس. استاندارد شماره ۵۲۷۲.

۸. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۶). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- شمارش استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* وسایرگونه‌ها)- روش آزمون – قسمت اول: روش استفاده از محیط کشت برد-پارکرآگار. استاندارد ملی ایران شماره ۱-۶۸۰۶.

9. Aslan, K., and Geddes, CD. 2005. Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology. J Curr Op Biotech.16: 55-62.

10. Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A., Jawets, M. 2001. Manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore: 141-219.

11. Dreher, K.L. 2004. Health and environmental impact of nanotechnology: Toxicology calassessment of manufactured nanoparticles. Toxicol Sci. 77:3-5.

12. Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M. and Soleimanian-zad, S. 2010. Effect of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on inactivation of Lactobacillus plantarum in orange juice. Food Control.22**:**408-413.

13. Hardman, R.A. 2005. Toxicological review of quantum dots: Toxicity depends on physic-chemical and environmental factors. J.E.H.P. 114: 165-172.

14. Huh, A.J., and Kwon, Y.J. 2011. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. J Control Release. 2: 128–145.

15. Hernandez-Sierra, J.F., Ruiz, F., Pena, D.C.C., Martinez-Gutierrez, F., Martinez, A.E., Guillen, A.D.J.P., Tapia-Parez, H., and Castanon, G.M., 2008. The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutans to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med. 3: 237-240.

16. Jawetz, Melnick, &Adelberg's, 2011. Medical Microbiology, 24th edition. 24: 27-78.

17. Kumar, A., and Jakhmola, A. 2007. RNA-mediated fluorescent Q-Pb nanoparticles. Langmuir. 23: 2915-2918.

18. Khani, P.H., Zand, A.M., Imani, S., Rezayi, M., and Rezaei-Zarchi, S. 2010. Determining the Antibacterial Effect of Zno Nanoparticle against the Pathogenic Bacterium, *Shigella Dysenteriae* (Type1).Int.J.Nano.Dim.4: 279-285.

19. Li, P., Li, J., Wu, C., and Wu, Q. 2005. Synergistic antibacterial effects of Lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. J Nanotechnol. 16: 1912-1917.

20. Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D.Y., Brunet, L., Liga, M.V., Li, D., and Alvarez, P. J.J. 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. Water Research. 42: 4591–602.

21. Leliveld, H.L., Mostert, M.A., and White, B. 2003. Hygiene in food processing. London: Wood head Publishing Ltd.

22. Langer, R. 2000. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. Acc Chem Res. 2: 94-101.

23. Lorens, A., Lloret, E., Picouet, A., Trbojevich, R. and Fernandez, A. 2012.Metallic-based micro and nanocomposites in food contact materials and active food packaging. Trends Food Sct Tech J. 24: 19-29

24. Li, H., Li, F., Wang, L., Sheng, J., Xin, Z., Zhao, L., Xiao, H., Zheng, Y. and Hu, Q. 2009.Effect of nano-packing on preservation quality of Chinese jujube (Ziziphus jujuba Mill. var.inermis (Bunge) Rehd).J Food Chem. 114: 547-552.

25. Makhluf, S., Dror, R., Nitzan, Y., Abramovich, Y., Jelinek, R. and Gedanken, A. 2005. Microwave-Assisted Synthesis of Nanocrystalline MgO and Its Use as a Bacteriocide. Advanced Functional Materials. 15**:** 1708-1715.

26. Papaspyrides, C.D., Pavlidou, S., and Vouyiouka, S.N. 2009. Development of advanced textile materials: natural fibre composites, antimicrobial, and flame-retardant fabrics. JMDA. 2:91-102.

27. Raghupathi, K. R., Koodali, R.T.K., and Manna, A.C. 2011. Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. Langmuir. 27**:** 4020–4028.
28. Reddy, K.M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D.G., Hanley, C., and Punnoose, A. 2007. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. Appl. Phys. Lett. 90: 213902-3
29. Shi, L., Zhao, Y., Zhang, X., Su, H., and Tan, T. 2008. Antibacterial and anti-mildew behavior of chitosan/nano-TiO2 composite emulsion. Korean J. Chem. Eng. 6: 1434-1438.
30. Sosa, I.O., Noguez, C., and Barrera, R.G. 2003. Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes. J Phys Chem.107: 6269-6275.
31. Sawai, J., Kawada, E., Kanou, F., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T. and Shimizu, M. 1996. Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. J Chem Eng Jpn. 29: 627-633.
32. Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Shahverdi, H.R., Minaian, S. 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Nanomedicine. 2: 168-71.
33. Selwan, H., Mohamed, E., Riham, M. Shawky, Ramadan A, E., and Tareq, Y. 2015. N-acetyl cysteine substantially enhances the antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles against multidrug resistant pathogens. Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. 12: 45–59.
34. Selvam, S., Rajiv Gandhi, R., Suresh, J., Gowri, S., Ravikumar, S., and Sundrarajan, M. 2012. Antibacterial effect of novel synthesized sulfated β-cyclodextrin crosslinked cotton fabric and its improved antibacterial activities with ZnO, TiO2 and Ag nanoparticles coating. Int.J.Pharm. 2: 366-74.
35. Sinha, R., Karan, R., Sinha, A. and Khare, S.K. 2011. Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells. Bioresource Technology. 2: 1516-1520
36. Vangarde, S.J., and Woodburn, M. 1994. Food preservation and safety. Ames: Iowa State University press. P.21-5.
37. Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Povey, M. and York, D. 2007. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). J Nanopart Res. 9: 479-489
38. Zeuthen, P., and Bogh-Sorensen, L. 2003. Food preservation techniques. Roca Raton: Wood head Pub. 292-3

Evaluate the inhibitory activity of ZnO nanoparticles against standard strains and isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from food samples

Ketabchi M[1], Iessazadeh Kh*[2], Massiha A[3]

1. Graduate student, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
2. Microbiology Department, Faculty of Science, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran
3. Biotechnology Department, Faculty of Science, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

*Corresponding author: *issa_kaam@yahoo.com*

Received: 20 March 2016 Accepted: 15 April 2017

Abstract

The growing pressure to find new ways for the microbial production of nanoparticles in foods, there is ability to create different shapes and sizes is a wide range of antimicrobial agents. The aim of the present study is to determine the antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against at different concentrations strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on standard and isolated were isolated from food samples. In this experimental study, suspension has been prepared from commercial ZnO nanoparticles in broth medium. After preparing standard strain and the strain were isolated from food samples, was studied using bacteriological tests such as disc diffusion agar methods, minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration. According to the results obtained in this study, the maximum diameter of growth inhibition related to the concentration in 5000 µg/ml zinc oxide nanoparticles. The average diameter of growth inhibition of standard strain of *E. coli* PTCC1399 and *S. aureus* PTCC11189 respectively were 17.4 and 20.5 mm. The average diameter of the growth of *E. coli* and *S. aureus* isolated from foods respectively were 18.4 and 15.4 mm. In terms of sensitivity, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, the most had the least effect. Results showed that mean comparison with Duncan test ($p<0.005$) is significantly different. Among times, zero time has the highest OD and the lowest OD was obtained in 240 second. Finally, this study showed that ZnO nanoparticles can be used to inhibit mentioned bacteria and can be a potential for alternative preservatives to prevent food spoilage possess.

Keywords: Zinc oxide, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Antimicrobial activity, Nanoparticle