

بررسی فعالیت آنتی باکتریایی نانوکامپوزیت‌های مگنتیت/اکسید روی و مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان بر روی برخی از باکتری‌های ایجاد کننده عفونت در زخم‌های پوستی

پرنдіس احسانی^۱، محمد رضا فرهپور^۲، مجتبی محمدی^۳، ساناز مهمازی^۴، سعید جعفری راد^۵

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.
- ۲- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران. نویسنده مسئول: mrf78s@gmail.com
- ۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.
- ۴- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.
- ۵- دانشیار، مرکز تحقیقات علوم پایه، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: برخی باکتری‌ها باعث ایجاد عفونت در ناحیه‌ی زخم می‌شوند که چالش بزرگی برای سلامتی است و ممکن است باکتری‌ها مقاوم به آنتی‌بیوتیک باشند. بنابراین، این باکتری‌ها باید توسط ساختارهای ایمن و ارزان از بین بروند. این مطالعه باهدف بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی نانوکامپوزیت‌های مگنتیت/اکسید روی و مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان بر روی برخی از باکتری‌های ایجاد کننده عفونت در زخم‌های پوستی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه نانوکامپوزیت‌های مگنتیت، مگنتیت/اکسید روی و مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان با کمک عصاره مریم گلی تهیه شد و اثراتشان از طریق روش‌های حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بر روی باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و همین‌طور قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بررسی شد. همچنین منحنی زمان مرگ نیز بررسی شد.

نتایج: نتایج این مطالعه در تست‌های MIC و MBC نشان داد که نانوکامپوزیت‌های مگنتیت/اکسید روی و مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان اثرات قابل توجهی روی باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با گروه مگنتیت داشتند ولی اثر معنی‌داری روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* نداشتند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوکامپوزیت‌ها در زمانی طولانی‌تری در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات خود را نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری: در مجموع، نانوکامپوزیت‌های مگنتیت/اکسید روی و مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان روی باکتری‌ها گرم مثبت و گرم منفی اثرات مطلوبی داشتند و این اثرات را در زمانی طولانی‌تر نشان دادند.

کلمات کلیدی: باکتری‌های عفونت‌زا؛ اکسید روی؛ مگنتیت؛ *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*.

مقدمه

عفونت‌های زخم معمولاً توسط باکتری‌های بیمارستانی و یا محیط اطراف ایجاد می‌شود (۱). میکروارگانیسم‌ها، بافت نرم را زمانی عفونی می‌کنند که راهی برای ورود آن‌ها وجود داشته باشد. میکروارگانیسم‌های شناخته شده‌ای که باعث ایجاد عفونت می‌شوند شامل گونه‌های *استرپتوکوکوس*، *استافیلوکوکوس*، *سودوموناس* و *باکترئیده* هستند (۲). عفونت‌های قارچی همچنین معمول هستند که ناشی از رطوبت ایجاد شده بین لایه‌های پوست است که به نوبه‌ی خود باعث ایجاد عفونت در نواحی پوستی می‌شود (۳). این عوامل بیماری‌زا عمدتاً شامل *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* در بین باکتری‌های گرم مثبت، *سودوموناس آئروژینا* و *شریشیا کلی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* است (۴). مهم‌ترین چالش برای درمان زخم‌های عفونی، مقاومت آنتی‌باکتریایی این باکتری‌ها است (۵) که باید با استفاده از ساختارها و داروهای جدید، این چالش را تا حد ممکن کاهش داد.

استفاده از مواد برپایه‌ی نانوذرات بنظر می‌رسد که گزینه‌ی مناسبی برای کاهش عفونت‌های باکتریایی در زخم‌های عفونی است. نانو مواد با باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌ها تعاملات چندجانبه‌ای همانند جذب الکترواستاتیکی، آب‌گریزی و واندروالس ایجاد می‌کنند. این خصوصیات و تعاملات فیزیکی-شیمیایی نانومواد اجازه می‌دهد که این مواد با میکروارگانیسم‌ها تعامل کنند و این اجازه را به آن‌ها می‌دهد که گزینه‌های مناسبی برای مبارزه علیه عفونت‌های مقاوم به چند دارو باشند (۶). مطالعات بر روی کانی‌های معدنی و داروها بر پایه‌ی این مواد بعنوان راه‌هایی برای کاهش عفونت باکتریایی در زخم‌ها تلاش نموده‌اند. ویژگی‌های مختلف کانی‌های معدنی در زمینه‌های ساختار قادر به تسهیل فعالیت آنتی‌باکتریایی موادی هستند که در داخل آن‌ها قرار می‌گیرند که این ویژگی‌ها عمدتاً شامل کاهش فعالیت آب و کمک در

شکل‌گیری بافت جدید و چسبندگی سلولی است (۸، ۷). یکی از کانی‌ها که می‌تواند به عنوان بستری برای حمل نانوذرات دارای خواص ضدباکتریایی، برای التیام دادن زخم‌های عفونی مورد استفاده قرار گیرد، مگنتیت است. این کانی دارای ویژگی‌های الکتریکی قابل توجهی است و دارای این توانایی است (۹). از سوی دیگر، مطالعات نشان داده‌اند که مگنتیت از طریق اتصال یافتن با سطح خارجی غشای باکتری‌ها، واکنش‌ها و تعاملات مختلفی ایجاد می‌کند و از این طریق خاصیت آنتی‌باکتریایی خود را نشان می‌دهد (۱۰). این کانی‌ها می‌توانند بستری برای دیگر نانوذرات دارای خاصیت آنتی-باکتریایی باشند. یکی از نانوذرات دارای خاصیت آنتی-باکتریایی، نانوذرات اکسید روی است. نانوذرات اکسید روی از طریق رهاسازی یون‌های آنتی میکروبی، تعامل نانوذرات با با میکروارگانیسم‌ها و تشکیل گونه‌های واکنشگر اکسیژن اثرات آنتی باکتریایی خود را نشان می‌دهند (۱۱). رهاسازی یون-های آنتی میکروبی بستگی به عواملی همانند غلظت اکسیدهای فلزی، زمان تعامل و ماهیت میکروارگانیسم‌ها دارد (۱۲). از جمله مواد دیگری که دارای ساختار آنتی‌باکتریایی است، کیتوزان است. کیتوزان، یک پلی ساکارید خطی است که از کیتین و از طریق مینرال زدایی و پروتون زدایی بدست می‌آید و دارای ویژگی‌های زیادی همانند قابلیت تجزیه پذیری، سمیت پایین و فعالیت آنتی میکروبی است (۱۳). کیتوزان، فعالیت آنتی‌باکتریایی خود را از طریق اعمال تغییراتی روی سطح سلول باکتریایی آغاز می‌کند که باعث افزایش نفوذپذیری به داخل غشاء می‌شود و تعادل اسمزی را برهم می‌زند که نتیجه این کار مرگ سلول باکتریایی است (۱۴). در مجموع این ساختارها ممکن است دارای اثرات هم‌افزایی باشند و بتوانند با هم فعالیت آنتی‌باکتریایی مناسبی را نشان دهند. با این حال برای سنتز و قرار دادن این مواد در کنار هم نیاز به ترکیبات ثانویه گیاهی موجود در عصاره‌ها می‌باشد (۱۵، ۱۶).

سوش‌های لیوفیلیزه‌ی باکتری‌های تهیه شده به طور کامل با پنبه الکل، ضد عفونی شده و سپس بخش میانی پنبه‌ی داخل ویال در داخل هود با تیغ برش داده شدند. در ادامه، مقدار نیم میلی‌لیتر از محیط کشت مغذی از قبل آماده شده توسط سرنگ استریل به داخل ویال تزریق شد و اجازه داده شد تا جرم لیوفیلیزه شده در آن حل گردد. محلول حاصل به محیط حاوی (BHIB محیط کشت مغذی عمومی آگار دار) انتقال یافت و در دمای 37°C و به مدت 24 h الی 48 h انکوبه شد تا باکتری‌ها به طور کامل رشد کنند. برای احیای کامل باکتری‌ها و مهیا شدن شرایط رشد آن‌ها، چندین بار تجدید کشت (ساب کالچر) انجام شد (به علاوه یک کشت ذخیره نیز از کشت مادر تهیه گردید). برای استفاده از این محیط کشت‌ها در مراحل بعدی از آخرین کشت 24 h ، سوسپانسیونی به کدورت نیم مک فارلند تهیه شد (۱۹). برای انجام هر آزمون جهت بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی، کشت تازه 24 h تهیه گردید (۲۰).

تهیه عصاره گیاهی

برای تهیه عصاره‌ی گیاهی مریم گلی، برگ‌های این گیاه ابتدا جمع‌آوری شد و برای تهیه عصاره‌ی گیاه، به مرکز دانشکده علوم پایه دانشگاه ارومیه منتقل شد. برای استریلیزاسیون، قسمت‌های هوایی این گیاه برای 1 min با اتانول 70% و به مدت 15 min به وسیله محلول هیپوکلریت سدیم 20% تیمار شدند و سپس با کمک آب دیونیزه شست‌وشو داده شدند. این برگ‌ها برای مدت هفت روز در دمای اتاق فاقد نور خشک شدند. بدنبال خشک کردن برگ‌های گیاه و قبل از گرفتن عصاره، بخش‌های خشک شده گیاه با استفاده آسیاب و با سرعت 2500 r/min به طور جداگانه کوبیده شدند و به شکل پودر درآمدند. برای استخراج کردن متابولیت‌های مهم، مقدار ده گرم از پودر خشک گیاه مورد مطالعه با رعایت شرایط استریل و با استفاده از ترازوی دیجیتال (مدل AND GF-300 ساخت کشور ژاپن) وزن

در این مطالعه برای سنتز این نانوکامپوزیت از عصاره مریم گلی استفاده شد. گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) متعلق به خانواده Lamiaceae گیاهی دارویی چند ساله و علفی است. این گیاه دارای خصوصیات درمانی زیادی است و برای درمان زخم‌های عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷-۱۹). این گیاه حاوی فنول‌های محلول در آب است که دارای خصوصیات درمانی زیادی هستند (۱۸، ۱۹).

در این مطالعه فرض شد که نانوکامپوزیت تهیه شده از مگنتیت، اکسید روی و کیتوزان می‌توانند دارای اثرات هم افزایی برای خاصیت آنتی باکتریایی علیه باکتری‌های عفونی کننده‌ی زخم‌های پوستی باشند. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی باکتریایی نانوکامپوزیت‌های مگنتیت/اکسید روی و مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان بر روی برخی از باکتری‌های ایجاد کننده‌ی عفونت در زخم‌های پوستی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی استفاده شده در مطالعه حاضر با خلوص بالا تهیه شدند. روی کلرید بدون خالص‌سازی‌های بعدی از شرکت مرک آلمان تهیه شد. پودر مگنتیت فاقد عناصر خطرناک و سمی از شرکت توانگران سهند تبریز تهیه شد. برگ تازه گیاه مریم گلی نیز از بازار محلی تهیه شد، خشک شد و سپس خرد شد. کیتوزان با وزن 19000 Da تا 31000 از شرکت سیگما تهیه شد.

تهیه سویه باکتریایی

در تحقیق حاضر از سویه‌های باکتریایی /شریشیا کلی (ATCC 13706) و /استافیلوکوکوس /اورئوس (ATCC 25923) و همین طور قارچ کاندیدا /آلبیکنس (ATCC 10231) استفاده شد. سویه‌های مورد مطالعه از مرکز کلکسیون باکتری و قارچ ایران وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تحت نظارت وزارت علوم تهیه گردید. برای تهیه سویه‌های باکتریایی، ابتدا بخش خارجی ویال

شدند، در دمای 40°C برای مدت ۲ h خشک شدند و مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه سوسپانسیون بر اساس کدورت نیم مک فارلند با در نظر گرفتن این مطلب که تعداد باکتری‌های تلقیح شده یکی از متغیرهای مهم در این مطالعه بود، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی به صورت استاندارد تهیه گردید. بدین منظور جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، از کشت تازه و جوان باکتری‌های ذکر شده، حاصل از کشت-های ۲۴ h /شریشیا کلی و /ستافیلوکوکوس اورئوس و همین طور قارچ کاندیدا آلبیکنس استفاده شد. در این حالت باکتری‌ها در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند. بدین ترتیب، به کمک فیلدوپلاتین چند کلونی از باکتری و قارچ مورد مطالعه از قسمت فوقانی کشت برداشت شد و به محلول نرمال سالین منتقل گردید این کار تا زمانی ادامه داشت که کدورت سوسپانسیون حاوی نمونه باکتری مورد نظر مطابق کدورت محلول نیم مک فارلند و معادل $1 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ (۲۰).

حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

در این مطالعه برای بررسی اثر غلظت نانوکامپوزیت‌های مورد مطالعه، فعالیت ضد میکروبی این نانوکامپوزیت‌ها علیه باکتری‌های اشاره شده و قارچ مورد نظر از دو روش MIC و MBC در محدوده 10^{-1} تا $10^{-5} \mu\text{g/ml}$ (۲-۱۰) در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. آنتی بیوتیک استاندارد برای هر باکتری بر مبنای راهنمای CLSI انتخاب گردید. براساس تعاریف، MIC حداقل غلظت بازدارندگی ماده ی ضد میکروبی است و در صورتی که ماده ی ضد میکروبی مورد نظر از محیط حذف گردد، باکتری مجدداً قادر به رشد خواهد بود، درحالی که MBC حداقل غلظت کشندگی ماده ی ضد میکروبی است، به گونه‌ای که ۹۹/۹۰٪ از میزان باکتری‌ها را از بین برده و در صورت کشت ثانویه کم تر از ۱٪ از باکتری‌های اولیه قادر به رشد باشند. برای بدست آوردن

شد و به داخل یک بشر استریل ۰.۵ L حاوی ۱۰۰ ml آب مقطر، اضافه شد. در ادامه، مخلوط مورد نظر به مدت دو شبانه روز با استفاده از دستگاه اوربیتال شیکر (مدل OS4LD، ساخت شرکت فن آوران سهند) با 58 r/min و در شرایط تاریکی، هم زده شد. در ادامه به منظور تکمیل مرحله غنی سازی، مخلوط مورد نظر به مدت زمان ۲۰ min در داخل حمام اولتراسونیک با فرکانس 37 kHz ، قدرت 280 W و قطر داخلی 50 cm 10.6×19.8 در دمای 30°C تحت فشار، قرار داده شده با استفاده از تکنیک ریز موج به مدت زمان 7 min تحت مایکروویو تابشی با 540 W قرار گرفت و در نهایت توسط کاغذ صافی، صاف گردید. در پایان، با کمک سانتریفیوژ یخچال دار برای 7 min در دمای 4°C و 2500 r/min ، عمل سانتریفیوژ انجام شد. عصاره آبی بدست آمده بعد از عمل سانتریفیوژ با کمک فیلتر میکروبی $0.45 \mu\text{m}$ استریل شده، فیلتر شد (۲۱، ۱۹).

تهیه محلول کیتوزان

برای تهیه محلول کیتوزان، یک گرم کیتوزان در ۲۰۰ ml از محلول اسید استیک $1\% \text{ w/w}$ حل شد، pH محلول روی ۵ تنظیم شد، سپس محلول حاصله برای ۱ h به شیکرمنتقل شد، تا محتویات محلول مخلوط مورد نظر به خوبی مخلوط گردد. سپس کیتوزان حل شده در محلول اسید استیک از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۳ صاف گردید تا از هرگونه ناخالصی عاری گردد (۲۲، ۱۹).

سنتز نانوکامپوزیت مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان

برای سنتز نانوکامپوزیت مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان، 0.25 g روی کلراید با 0.75 g پودر مگنتیت در 80 ml عصاره مخلوط شدند. مخلوط بدست آمده برای ۶ در دمای 70°C همزده شد (۲۰، ۱۹). فاز جامد تشکیل شده، جدا شد، شسته شد و در دمای 65°C برای ۱ h خشک شد. در مرحله بعد سانتریفیوژ شد و سپس رسوب بدست آمده توسط آب مقطر/اتانول در نسبت w/w برابر شست‌وشو داده

روش بررسی زمان مرگ باکتری و سنجیدن تعداد باکتری برای بررسی کردن مدت زمان تاثیر گذاری نانوذرات مورد مطالعه بر روی باکتری‌های هدف و مدت زمان مورد نیاز برای مرگ آن‌ها در هر مرحله که نیازمند سنجش تعداد باکتری‌ها بود، باکتری‌های انتخابی در محیط کشت مورد نظر کشت داده شده و کلونی‌های تشکیل شده در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

برای انجام این تکنیک برای هر باکتری ۵ چاهک از هر ردیف در میکروپلیت در نظر گرفته شد. به این ترتیب که به چاهک اول ۲۵ μl از نانو ذره مگنتیت، چاهک دوم ۲۵ μl از نانو ذره مگنتیت/اکسید روی و چاهک سوم ۲۵ μl از نانوکامپوزیت مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان اضافه شد. سپس به هر کدام از پنج چاهک مورد نظر میزان ۱۰۰ μl از محیط کشت مولر هینتون برآث اضافه شد. در مرحله بعد ۱۱۰ μl از محلول سوسپانسیون باکتریایی با کدورتی معادل با نیم مک فارلند به تمام چاهک‌ها به استثنای چاهک آخر اضافه گردید. بدین ترتیب چاهک چهارم به عنوان کنترل مثبت که فقط شامل باکتری و محیط کشت بود و چاهک پنجم به عنوان کنترل منفی به منظور بررسی عدم آلودگی محیط در نظر گرفته شد.

برای بررسی زمان مرگ در زمان صفر بلافاصله پیش از انکوباسیون اولین کشت بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار انجام گرفت. سپس میکروپلیت به انکوباتور شیکردار 37°C ۳۷ راد و مدت زمان ۲۴ h و به تعداد ۲۰۰ r/min منتقل گردید. در زمان‌های مورد نظر از سوسپانسیون باکتری/نانوذره/محیط کشت و کنترل مثبت نمونه برداری انجام گرفت و بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت انجام گرفت. کلنی‌های شکل گرفته برای هر کدام از زمان‌های مورد نظر و در مورد هر دو باکتری و نانو ذرات و نانو کامپوزیت‌های مورد مطالعه شمارش و بر اساس واحد تشکیل دهنده کلنی/میلی‌لیتر گزارش گردید.

مقدار MIC از روش کلاسیک تهیه رقت‌های متوالی کمیته ملی استاندارد های آزمایشگاهی استفاده شد. بدین منظور میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه ابتدا در محیط نوترینت آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ h ساعت در 37°C انکوبه شدند تا میکروارگانیسم‌ها با استفاده از ترکیبات محیط کشت رشد نمایند و کشت جوان ۲۴ h باکتری فراهم گردد. برای بررسی و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی مواد ضد میکروبی مورد مطالعه بر روی باکتری‌ها و قارچ هدف از ۳ عدد میکروپلیت ته گرد استریل ۹۶ خانه ای استفاده شد و به ازای هر باکتری، ۲ ردیف ۱۲ تایی رقت از هر نانوکامپوزیت و کنترل مثبت و کنترل منفی به طور جداگانه در هر ردیف در نظر گرفته شد. تعیین MIC و MBC با استفاده از روش استاندارد رقت برآث انجام گردید. بدین منظور رقت‌های سریالی از ۱۰۰ μl نانوذره مورد نظر و محیط کشت مولر هینتون برآث به همراه کنترل منفی، گروه شاهد نانوذره مورد نظر و گروه شاهد باکتری مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت. برای محاسبه کردن MBC چاهک‌هایی که تغییر رنگ بینابینی قرمز- آبی داشتند، مشخص شدند. چاهک مورد نظر برای آزمون MBC، چاهکی است که رنگ بینابین قرمز و آبی دارد و نه مطلقاً قرمز رنگ است و نه آبی، اما برحسب اطمینان و برای بالا بردن اطمینان از فعالیت کشندگی نانو ذره مورد نظر بر روی باکتری و قارچ مورد مطالعه تمام چاهک‌ها از چاهک اول تا چاهک یازدهم که کاملاً قرمز رنگ است مورد بررسی قرار گرفت. برای این هدف، مقدار ۵۰ μl از هر رقت محلول مورد نظر در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار، از طریق اسپریدر استریل گسترش داده شد و برای ۲۴ h روز به انکوباتور 37°C در شرایط هوای منتقل گردید و پس از گذشت ۲۴ h پلیت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی شدند و آخرین رقتی که در کشت از آن هیچ گونه رشد باکتری دیده نشده بود به عنوان رقت MBC مثبت و گزارش گردید (۲۳).

داده‌ها با استفاده از آزمون آماری رگرسیون و نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ تجزیه و تحلیل شدند. همچنین در تطابق داده های آزمایش با مدل کینتیک مرگ، از رگرسیون ساده با متغیر مستقل از زمان و ضریب تعیین استفاده شد. برای مقایسات بین گروهی چون داده‌ها نرمال نبودند از آزمون کروسکال والیس استفاده شد و $p < 0.05$ بعنوان معنی دار در نظر گرفته شد (۲۴).

نتایج

نتایج برای تأثیر نانوکامپوزیت‌های مورد مطالعه روی برخی باکتری‌های عفونی کننده زخم‌های پوستی و همچنین قارچ کاندیدا /آلبیکنس در تست‌های MIC و MBC در جدول ۱ گزارش شده است. نتایج نشان داد که غلظت برابری از نانوکامپوزیت مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان در تست‌های MIC ($0.625 \mu\text{g/ml}$) و MBC ($2 \mu\text{g/ml}$) در مقایسه با نانوکامپوزیت مگنتیت/اکسید روی در تست‌های MIC ($1/25 \mu\text{g/ml}$) و MBC ($2/5 \mu\text{g/ml}$)

علیه /شریشیا کلی استفاده شده است ($p < 0.05$). بر اساس نتایج بدست آمده، غلظت‌های بزرگتر از $10 \mu\text{g/ml}$ از مگنتیت علیه این باکتری استفاده شده است که حاکی از آن است که مگنتیت دارای فعالیت آنتی باکتریایی بسیار ضعیفی در مقایسه با نانوکامپوزیت مگنتیت/اکسید روی و نانوکامپوزیت مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان است. نتایج برای باکتری /ستافیلوکوکوس نشان داد که غلظت‌های نسبتاً مشابهی از نانوکامپوزیت‌های مگنتیت/اکسید روی و مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان در تست‌های MIC ($\mu\text{g/ml}$) 0.625 و MBC ($1/25 \mu\text{g/ml}$) استفاده شد و نتایج نشان داد که مگنتیت دارای خاصیت آنتی باکتریایی ضعیف‌تری بود. در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده برای باکتری‌ها، نانوکامپوزیت مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان دارای خاصیت آنتی باکتریایی ضعیف‌تری بود. نتایج همچنین نشان داد که نانوکامپوزیت‌ها اثر معنی‌داری روی قارچ کاندیدا /آلبیکنس نداشتند.

جدول ۱. نتایج MIC و MBC نانو ذرات مگنتیت، مگنتیت/اکسید روی، مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان و آنتی بیوتیک‌های استاندارد به روش کلاسیک تهیه رقت‌های متوالی کمیته ملی استاندارد های آزمایشگاهی و مقایسه آن‌ها با آنتی بیوتیک‌های استاندارد واحد ها بر حسب $\mu\text{g/ml}$ است

باکتری	کانامایسین		موپروسین		مروپنم		آمی سیلین		ایمی پنم		مگنتیت		مگنتیت/اکسید روی		مگنتیت/اکسی د روی/کیتوزان	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
شریشیا کلی	۱/۵	۰/۶۲۵	---	---	---	---	---	---	---	---	>۱۰	>۱۰	۲/۵	۱/۲۵	۲/۵	۱/۲۵
استافیلوکوکوس اورئوس	---	---	۰/۶۲۵	۰/۳۱	---	---	---	---	---	---	>۱۰	>۱۰	۲/۵	۱/۲۵	۱/۲۵	۰/۶۲۵
کاندیدا آلبیکنس	---	---	---	---	---	---	---	---	۲/۵	۱/۲۵	>۸۰	>۸۰	>۸۰	>۸۰	>۸۰	>۸۰

تأثیر

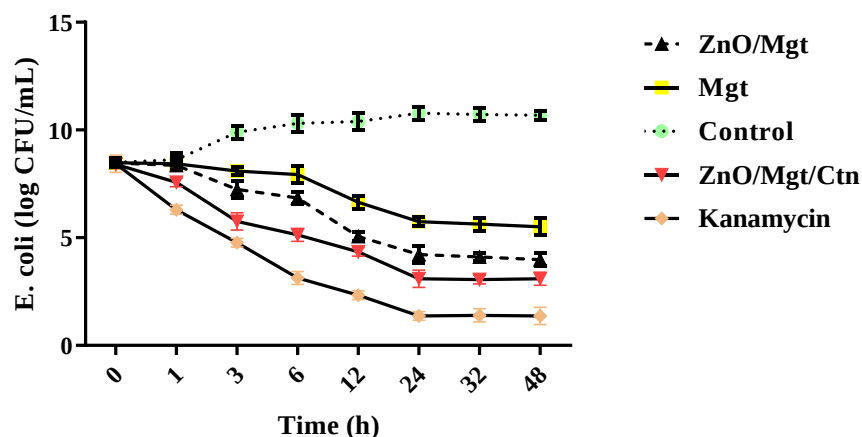
نانوکامپوزیت‌های مورد مطالعه بر روی باکتری‌ها در منحنی زمان مرگ در نمودارهای ۱ و ۲ گزارش شده است. بر اساس

یافته‌های بدست آمده، نانوکامپوزیت‌های مگنتیت/اکسید روی و نانوکامپوزیت مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان دارای اثرات

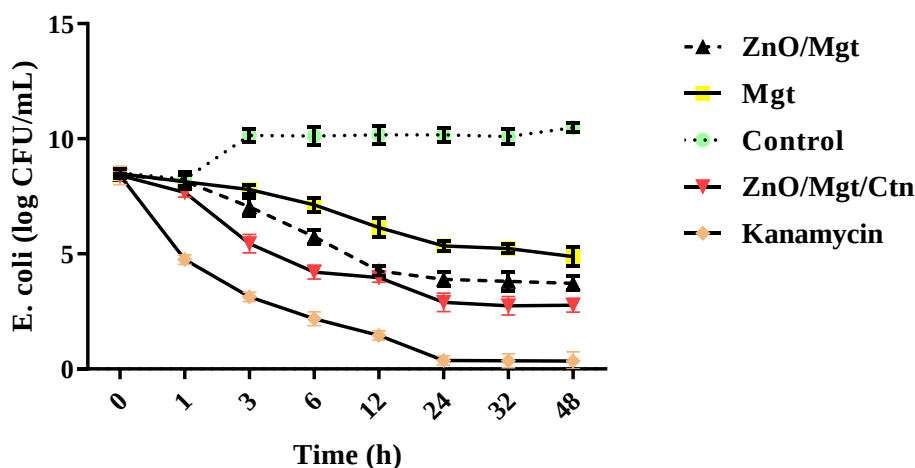
و نانوکامپوزیت مگنتیت/اکسید روی/کیتوزان بود. با این حال در مقایسه با گروه کنترل، مگنتیت از خود فعالیت آنتی-باکتریایی نشان داد. در گروه‌های آنتی بیوتیکی بعد از ۲۴ h، تعداد باکتری‌ها تقریباً به صفر رسید که این مطلب نشان دهنده‌ی این است که باکتری‌ها در زمان بسیار کوتاه‌تری در مقایسه با نانوکامپوزیت‌ها فعالیت می‌کنند و اثرات خود را نشان می‌دهند.

تقریباً مشابهی در غلظت MIC و ۲ MIC بودند. این نتایج نشان می‌دهد که این نانوکامپوزیت‌ها بیشترین اثرات خود را در طی زمان ۶ h آغاز می‌کنند و با شیب قابل توجهی آن‌را ادامه می‌دهند، بطوریکه برای بیشتر باکتری‌ها در زمان‌های ۴۸، تعداد باکتری‌ها به حداقل ممکن می‌رسد. با این حال، نتایج نشان داد که مگنتیت دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی بسیار ضعیفی در مقایسه با نانوکامپوزیت‌های مگنتیت/اکسید روی

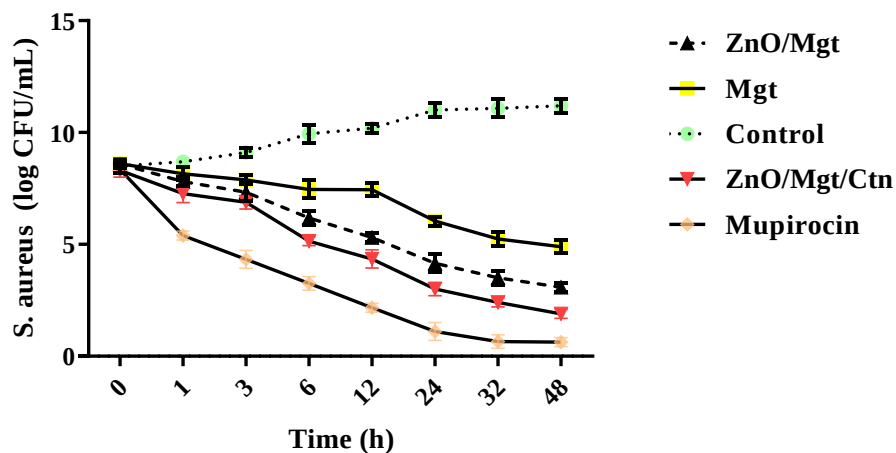
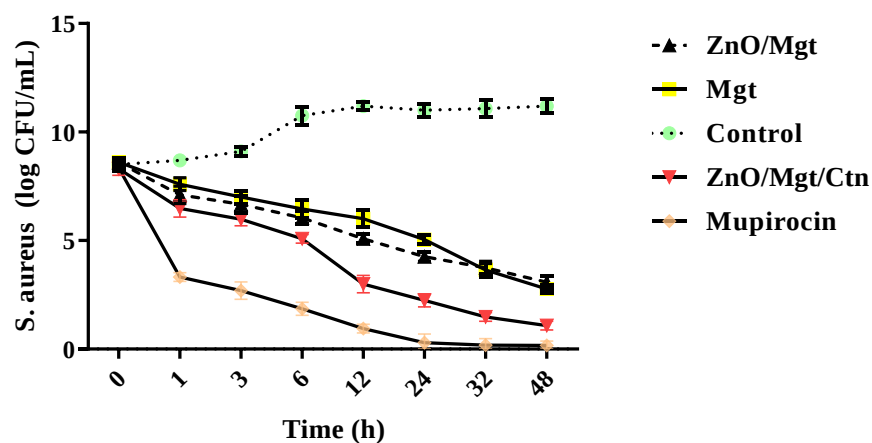
E. coli 1MIC:



E. coli 2MIC:



نمودار ۱- منحنی زمان مرگ باکتری/شرشیا کلی در مجاورت نانوکامپوزیت‌ها براساس ۱MIC و ۲MIC

S. aureus 1MIC:**S. aureus 2MIC:**

نمودار ۲. منحنی زمان مرگ باکتری استافیلوکوکوس ارئوس در مجاورت نانوکامپوزیتها براساس ۱MIC و ۲MIC

بحث

با دیگر نانوکامپوزیت‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار ضعیف عمل می‌کند. بر اساس نتایج برای زمان مرگ، مگنتیت فعالیت آنتی‌باکتریایی را با گذشت زمان، بیشتر نشان می‌دهد و روال ثابتی را طی نمی‌نماید. این نتیجه نشان می‌دهد که این نانوکامپوزیت نیاز به زمان بیشتری برای از بین بردن باکتری‌ها دارد. مطالعات نشان داده‌اند که مگنتیت از طریق اتصال یافتن با سطح خارجی غشای باکتری‌ها، واکنش‌ها و تعاملات

نتایج این مطالعه نشان داد که در هردو تست MIC و MBC نانوکامپوزیت مگنتیت دارای اثرات ضدباکتریایی ضعیفی در مقایسه با نانوکامپوزیت‌های مگنتیت/اکسید روی و نانوکامپوزیت مگنتیت/اکسید روی/اکیتوزان بود. با مقایسه‌ی مگنتیت با گروه کنترل در منحنی زمان مرگ نتایج نشان داد که مگنتیت دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی است ولی در مقایسه

خود را از طریق اعمال تغییراتی روی سطح سلول باکتریایی آغاز می‌کند که باعث افزایش نفوذپذیری به داخل غشاء می‌شود و تعادل اسمزی را برهم می‌زند که نتیجه این کار مرگ سلول باکتریایی است (۱۴). در مجموع، کیتوزان دارای فعالیت آنتی باکتریایی ضعیفی است و نتایج این مطالعه نیز حاکی از تأیید این مطلب است. در مجموع باید بیان شود که افزودن کیتوزان به ساختار نانوکامپوزیت تنها توانست کارایی نانوکامپوزیت را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* بمقدار قابل توجهی بهبود بخشد. نتایج این مطالعه اگرچه نشان داد که نانوکامپوزیت‌ها روی هر دو دسته باکتری‌ها تأثیر داشتند ولی این اثرات در باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی بیشتر بود که این احتمالاً بدلیل دیواره سلولی ساده‌تر این باکتری‌ها است. نتایج این مطالعه نیز نشان داد که نانوکامپوزیت‌ها نتوانستند اثرات قابل توجهی روی قارچ *کاندیدا/آلبیکنس* داشته باشد که این نتایج مغایر با نتایج دیگر مطالعات برای اثرات نانوکامپوزیت مگنتیت-کیتوزان (۲۸) و ساختار اکسید روی-آهن اکسید سنتز شده توسط جلبک (۲۹) است. اختلاف بین این مطالعه و مطالعات دیگر ان احتمالاً مربوط به روش سنتز و دیگر اجزای موجود در ساختارها است. عدم کارایی نانوکامپوزیت‌ها روی این قارچ احتمالاً مربوط به دیواره و ساختار سلولی این قارچ که نانوکامپوزیت نمی‌تواند در آن نفوذ کند.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نانوکامپوزیت‌های تهیه شده روی باکتری‌ها گرم مثبت و گرم منفی القاء کننده عفونت در زخم پوستی تأثیر داشتند که می‌تواند بعنوان ساختارهای تقویت کننده در مطالعات بالینی مورد توجه قرار گیرند.

تعارض در منافع

نویسندگان تعهد می‌نمایند که هیچ گونه تعارض منافع و مالی ندارند.

مختلفی ایجاد می‌کند و از این طریق خاصیت آنتی باکتریایی خود را نشان می‌دهد (۱۰). نتایج این مطالعه نشان داد که با افزودن اکسید روی به مگنتیت، خاصیت آنتی باکتریایی بشكل قابل توجهی افزایش یافت. نتایج برای منحنی زمان مرگ نشان داد که نانوکامپوزیت مگنتیت/اکسید روی با گذشت زمان روال صعودی را برای کشتن باکتری‌ها از خود نشان داد و تعداد باکتری‌ها از زمان ۶ ساعت در این گروه بطور معنی داری کاهش یافتند. این نتیجه نشان می‌دهد که مگنتیت و اکسید روی دارای اثرات هم افزایی هستند و می‌توانند به بهبود فعالیت آنتی باکتریایی هم کمک نمایند. البته ذکر این نکته ضروری است که اکسید روی یک آنتی باکتریال شناخته شده است. نانوذرات اکسید روی از طریق رهاسازی یون‌های آنتی میکروبی، تعامل نانوذرات با با میکروارگانیسم‌ها و تشکیل گونه‌های واکنشگر اکسیژن اثرات آنتی باکتریایی خود را نشان می‌دهند (۱۱). با این حال دیگر مطالعات معتقد بودند که اکسید روی فعالیت آنتی باکتریایی خود را از طریق تخریب یکپارچگی غشای سلولی و همچنین ایجاد فعالیت الکترواستاتیکی بین بار منفی سلول باکتریایی و بار مثبت نانوذره نشان می‌دهند (۲۵). ظاهراً، تعامل بین بار منفی سلول‌های باکتریایی و بار مثبت نانوذرات مانع از رشد باکتریایی می‌شود و این کار همچنین باعث افزایش تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن می‌شود که این عوامل باعث مرگ سلولی می‌شوند (۲۶). در ارتباط با تعامل بین مگنتیت و روی اکسی باید بیان نمود که احتمالاً مگنتیت فعالیت آب را کاهش می‌دهد و تعامل بین اکسید روی و باکتری‌ها را تسهیل می‌کند (۷-۸). با افزودن کیتوزان به ساختار قبلی، تفاوت قابل توجهی مشاهده نشد و تنها برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بمقدار قابل توجهی فعالیت آنتی باکتریایی افزایش یافت. کیتوزان یک ساختار آنتی باکتریال است و اثراتش را از طریق نفوذ پذیری بداخل سلول باکتریایی و کشتن باکتری‌ها نشان می‌دهد (۲۷). کیتوزان همچنین فعالیت آنتی باکتریایی

فهرست منابع

1. Abdulgader NE, Galil RK, Elnour SY, Elhusain TF, Osman TM, Elawad MN, Mirghani IM, Abdalrahman IB, Elbager SG. Irrational use of antibiotics with representation of antimicrobial resistance patterns in Sudan: a narrative review. *EuroBiotech J* 2021;5(1):43-7.
2. Pfalzgraff A, Brandenburg K, Weindl G. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Front Pharmacol* 2018; 9:281-293.
3. Nigussie D, Davey G, Legesse BA, Fekadu A, Makonnen E. Antibacterial activity of methanol extracts of the leaves of three medicinal plants against selected bacteria isolated from wounds of lymphoedema patients. *BMC Complem Med Therap* 2021; 21(1):1-10.
4. Dahm H. Silver nanoparticles in wound infections: present status and future prospects. In *Nanotechnology in skin, soft tissue, and bone infections 2020* (pp. 151-168). Springer, Cham.
5. Zhu G, Sun Z, Hui P, Chen W, Jiang X. Composite film with antibacterial gold nanoparticles and silk fibroin for treating multidrug-resistant *E. coli*-infected wounds. *ACS Biomater Sci Engin* 2020; 7(5):1827-35.
6. García-Villén F, Faccendini A, Aguzzi C, Cerezo P, Bonferoni MC, Rossi S, Grisoli P, Ruggeri M, Ferrari F, Sandri G, Viseras C. Montmorillonite-norfloxacin nanocomposite intended for healing of infected wounds. *Int J Nanomed* 2019; 14:5051-5060.
7. Bramhill J, Ross S, Ross G. Bioactive nanocomposites for tissue repair and regeneration: a review. *Int J Environ Res Public Health* 2017; 14:1-21.
8. Naumenko EA, Guryanov ID, Yendluri R, Lvov YM, Fakhrullin RF. Clay nanotube-biopolymer composite scaffolds for tissue engineering. *Nanoscale* 2016; 8:7257-7271.
9. McNamara K, Tofail SA. Nanosystems: the use of nanoalloys, metallic, bimetallic, and magnetic nanoparticles in biomedical applications. *Physic Chemi Chemic Physics* 2015;17(42):27981-95.
10. Maruthupandy M, Rajivgandhi G, Muneeswaran T, Anand M, Quero F. Highly efficient antibacterial activity of graphene/chitosan/magnetite nanocomposites against ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Coll Surfaces B: Biointerface* 2021:111690.
11. Abebe B, Zereffa EA, Tadesse A, Murthy HA. A review on enhancing the antibacterial activity of ZnO: Mechanisms and microscopic investigation. *Nanoscale Res Lett* 2020;15(1):1-9.
12. Espitia PJP, Soares N de FF, Coimbra JS dos R. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food Bioprocess Technol* 2012; 5:1447-1464.
13. Chandrasekaran M, Kim KD, Chun SC. Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: A review. *Process* 2020; 8(9):1173.
14. Raafat D, Von Bargen K, Haas A, Sahl HG. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(12):3764-73.

15. Daghighan SG, Farahpour MR, Jafarirad S. Biological fabrication and electrostatic attractions of new layered silver/talc nanocomposite using *Lawsonia inermis* L. and its chitosan-capped inorganic/organic hybrid: Investigation on acceleration of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* infected wound healing. *Mater Sci Engin: C* 2021;128:112294.
16. Mahmoudabadi S, Farahpour MR, Jafarirad S. Effectiveness of green synthesis of silver/kaolinite nanocomposite using *Quercus infectoria* galls aqueous extract and its chitosan-capped derivative on the healing of infected wound. *IEEE Trans NanoBiosci* 2021;20(4):530-42.
17. Bettaieb I, Zakhama N, Wannes WA, Kchouk ME, Marzouk B. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition. *Scientia Horticulturae* 2009;120(2):271-5.
18. Francik S, Francik R, Sadowska U, Bystrowska B, Zawislak A, Knapczyk A, Nzeyimana A. Identification of phenolic compounds and determination of antioxidant activity in extracts and infusions of salvia leaves. *Mater* 2020;13(24):5811.
19. Ehsani P, Farahpour MR, Mohammadi M, Mahmazi S, Jafarirad S. Green fabrication of ZnO/magnetite-based nanocomposite-using *Salvia officinalis* extract with antibacterial properties enhanced infected full-thickness wound. *Coll Surface A: Physicochem Engin Aspect* 2021;628:127362.
20. Gharehpapagh AC, Farahpour MR, Jafarirad S. The biological synthesis of gold/perlite nanocomposite using *Urtica dioica* extract and its chitosan-capped derivative for healing wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Biol Macromol* 2021; 183:447-56.
21. Shariatzadeh Bami S, Khavari-Nejad RA, Ahadi AM, Rezayatmand Z. Evaluation of foliar application of TiO₂ nanoparticles and NaCl salinity on physiological traits of wormwood. *Plant Physiol Repor* 2021; 26(3):466-77.
22. Sadeghi Seyed A., Asareh M., Tavakoli M. Oak gall wasps. *Res Inst Forest Rangelands* 2009; 1: 1-197.
23. Parvekar P, Palaskar J, Metgud S, et al. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Biomater Investig Dentis* 2020; 7: 105-9.
24. Tang H, Zhang P, Kieft TL, Ryan SJ, Baker SM, Wiesmann WP, Rogelj S. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. *Acta Biomaterialia* 2010; 6:2562-71.
25. Hameed ASH, Karthikeyan C, Ahamed AP, Thajuddin N, N. S Alharbi NS. In vitro antibacterial activity of ZnO and Nd doped ZnO nanoparticles against ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Report* 2016; 6:1-11.
26. Zhang L, Ding Y, Povey M, York D. ZnO nanofluids—A potential antibacterial agent. *Prog Natural Sci* 2008; 18: 939-944.
27. Tang H, Zhang P, Kieft TL. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. *Acta Biomaterial* 2010; 6(7):2562–2571.

28. El-Khawaga AM, Farrag AA, Elsayed MA, El-Sayyad GS, El-Batal AI. Antimicrobial and photocatalytic degradation activities of chitosan-coated magnetite nanocomposite. *J Cluster Sci* 2021;32(5):1107-19.

29. Abbas HS, Akilandeswari K, Muddukrishnaiah K. The antifungal and antiovarian cancer properties of α -Fe₂O₃ and α -Fe₂O₃/Zno nanostructures synthesized by *Spirulina platensis*. *IET Nanobiotechnol* 2020; 1: 10-20.



Investigation of Antibacterial Activity of Magnetite, Magnetite/Zinc Oxide and Magnetite/Zinc Oxide/Chitosan on Some Bacteria Inducing Infection in Skin Wounds

Parandis Ehsani ¹, Mohammad Reza Farahpour ², Mojtaba Mohammadi ³, Sanaz Mahmazi ⁴, Saeed Jafarirad ⁵

1-PhD. Student, Department of Microbiology, Za. c., Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

2- Associated Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran. Corresponding Author: mrf78s@gmail.com

3-Assistant Professor, Department of Microbiology, Za. c., Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

4 Assistant Professor, Department of Biology, Za. c., Islamic Azad University, Zanjan, Iran.

5- Associated Professor, Research Center of Bioscience and Biotechnology, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Received:2024.05.11

Accepted: 2024.09.13

Abstract

Background & Aim: Some bacteria cause infection in wound site that is a major challenge for healthiness and bacteria may be resistant to antibiotics. The current study was conducted to investigate antibacterial activity of magnetite, magnetite/zinc oxide and magnetite/zinc oxide/chitosan nanocomposites on some bacteria inducing infection in skin wounds.

Materials & Methods: In this study, magnetite, magnetite/zinc oxide and magnetite/zinc oxide/chitosan nanocomposites were prepared by help of *Salvia officinalis* extract and their effects were investigated via minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and also *Candida albicans* fungus. Killing time curve was also investigated.

Results: The results for MIC and MBC tests showed that magnetite/zinc oxide and magnetite/zinc oxide/chitosan nanocomposites showed significant effects on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* compared with magnetite nanocomposite but they did not show any significant effects on *Candida albicans* fungus. The results also showed that nanocomposites showed their effects in longer times compared with antibiotics.

Conclusion: In sum, magnetite/zinc oxide and magnetite/zinc oxide/chitosan nanocomposites showed significant effects on Gram-positive and Gram-negative bacteria but in longer times.

Keywords: Infectious bacteria; zinc oxide; magnetite; *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.