

## بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی اکسید روی و اثرات سینرژیستی با بیوسایدیهای مختلف بر علیه باسیلوس سرئوس

زهره دیدار\*

تاریخ دریافت: 1397/03/06

تاریخ پذیرش: 1397/08/10

### چکیده

در این تحقیق، سنتز نانوذرات ترکیبی منگنز- اکسید روی، آهن- اکسید روی به روش رسوب همزمان و بررسی ویژگی‌های ساختاری و مورفولوژیکی نانوذرات حاصله با استفاده از طیف مادون قرمز فوریه، پراش اشعه X و میکروسکوپ الکترونی عبوری صورت گرفت. بررسی‌ها نشان داد که عمل ترکیب عناصر منگنز و آهن توسط روش رسوب همزمان بر روی نانوذرات اکسید روی به خوبی توسط روش رسوب همزمان صورت می‌گیرد. به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی مورد نظر، از روش قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت بازدارندگی در برابر باکتری باسیلوس سرئوس (PTCC 1665) استفاده شد. نتایج آزمون‌های اثرات ضد میکروبی نشان داد که نانوذرات ترکیبی منگنز- اکسید روی اثرات ضد میکروبی بیشتری بر روی باسیلوس سرئوس نسبت به آهن- اکسید روی دارد و ایجاد قطر هاله عدم رشد برابر با 32 میلی‌متری ایجاد می‌کند در حالی که آهن- اکسید روی، قطر هاله عدم رشد 12 میلی‌متر است. بعلاوه هر دو نانوذره ترکیبی اثرات ضد میکروبی بیشتری نسبت به نانوذرات اکسید روی به تنهایی ایجاد می‌کنند و در نتیجه عمل ترکیب این عناصر در ساختار اکسید روی سبب بهبود خاصیت ضد میکروبی آن می‌گردد. در مقایسه اثرات سینرژیست نانوذرات ترکیبی با دو ماده ضد میکروبی متداول شامل پراکسید هیدروژن و هیپوکلریت سدیم مشخص گردید که هر دو این نانوذرات با این ترکیبات ضد میکروبی اثر هم‌افزایی و سینرژیست دارند (به خصوص در غلظت های بالا).

واژه‌های کلیدی: نانوذرات ترکیبی، اکسید روی، سینرژیست، باسیلوس سرئوس

### مقدمه

امروزه، علم نانو تکنولوژی در حال گسترش است و کاربردهای وسیعی در علوم مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی پیدا نموده است (Fernandez-Garcia *et al.*, 2004). یک دسته از نانوذرات، اکسیدهای فلزی هستند که اندازه ذراتی بین 1 تا 100 نانومتر را شامل می‌شوند. نانوذرات اکسیدهای فلزی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی دارند. از این دسته از نانوذرات به عنوان کاتالیزور، سنسورها و سلول‌های سوختی استفاده می‌شود (Cort *et al.*, 2013). علاوه بر این، نانوذرات اکسید فلزی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی نیز کاربرد دارد (Tran *et al.*, 2010) و در این زمینه بسیار مورد توجه محققین مختلف قرار گرفته است. بیماری‌های عفونی یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر در جهان هستند و افزایش مقاومت میکروبیها به ترکیبات ضد میکروبی متداول نیز یکی از معضلات مهم در حوزه بهداشت و سلامت است. ظهور گونه‌های مقاوم به ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به

تمرکز محققان بر روی استفاده از ترکیبات ضد میکروبی نوین شده است. نانوذرات اکسیدهای فلزی اثرات ضد میکروبی در برابر دامنه وسیعی از میکروارگانیسم‌ها نشان داده است. این امر منجر به راهی برای تولید ترکیبات ضد میکروبی نوین در صنعت مواد غذایی و سایر صنایع شده است. در دسترس بودن نانوذرات اکسیدهای فلزی و دامنه وسیع ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و عملگرایی این ترکیبات را به عنوان ترکیبات مناسب و جایگزین برای ترکیبات ضد میکروبی متداول نموده است. نانوذرات اکسیدهای فلزی خصوصیات ضد میکروبی بهتری نسبت به انواع متداول ترکیبات ضد میکروبی نشان می‌دهند که دلایل آن شامل نسبت زیاد سطح به حجم این ترکیبات است (Whitesides., 2005). دسته وسیعی از نانوذرات اکسید فلزی از نظر خصوصیات ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. (نانوذرات آلومینیوم در برابر اشرشیاکلی (Ansari *et al.*, 2014) نانوذرات اکسید قلع در برابر باسیلوس سوبتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی (Baek *et al.*, 2011) نانوذرات بیسموت در برابر سودوموناس آئرئوزوزا، آسیتوباکتر

باسیلوس سرئوس نشان داده‌اند. در این تحقیق اثرات ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی منگنز و آهن با اکسید روی ر روی باسیلوس سرئوس مورد مطالعه قرار گرفته است. به منظور بررسی اثرات سینرژیستی نانوذرات ترکیبی، دو بیوساید متداول شامل آب اکسیژنه و هیپوکلریت سدیم به کار گرفته شده است.

### مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی مصرفی مربوط به شرکت Merck آلمان است. نانوذره اکسید روی با اندازه ذرات کمتر از 100 نانومتر از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شد.

#### تهیه نانوذرات ترکیبی به روش رسوب همزمان

به منظور تهیه نانوذرات ترکیبی منگنز-اکسید روی و آهن-اکسید روی از روش رسوب همزمان استفاده شد. در این روش برای تهیه نانوذرات منگنز-اکسید روی از سولفات منگنز و سولفات روی و به منظور تهیه نانوذرات آهن-اکسید روی از سولفات آهن و سولفات روی استفاده شد. پس از تهیه محلول‌های سولفات مورد نظر، محلول‌های سولفات تهیه شده با یکدیگر مخلوط شده و در دستگاه اولتراسونیک با فرکانس 57kHz برای مدت 2 ساعت در دمای 50 °C قرار داده شد. سپس در دمای 80 درجه سانتی‌گراد، همراه با همزدن قرار گرفت. محلول هیدروکسید سدیم، قطره قطره به آن افزوده شد تا زمانی که pH محلول به 12 برسد. در این شرایط، همزدن به مدت 30 دقیقه ادامه پیدا کرد. محلول حاصل، به مدت 18 ساعت در دمای محیط قرار داده شد. سپس عمل سانتریفوژ به منظور جدا کردن رسوبات انجام گردید. خالص‌سازی توسط شستشو با آب مقطر و اتانول انجام شد. رسوبات حاصل در داخل آون خلأ خشک شد. بدین ترتیب نانوذرات ترکیبی منگنز-اکسید روی و آهن-اکسید روی حاصل گردید (Mukhta et al., 2012).

#### تعیین خصوصیات نانوذرات ترکیبی

طیف مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) توسط دستگاه Perkin-Elmer مدل Spectroma2 و با استفاده از قرص پتاسیم بروماید خشک در دامنه فرکانس 4000-4500 cm<sup>-1</sup> ثبت شد. همچنین پراش پرتو X با استفاده از دستگاه Phillips PW1820 از 2° تا 80° آزمایش شد.

#### تعیین اندازه ذرات و ویژگی‌های نانوذرات توسط

##### میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

شکل‌گیری و اندازه ذرات نانوذرات تولیدی توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری HITACHI مدل H-7500 با قراردادن یک قطره از

باتومانی و اشرشیاکلی (Jassim et al., 2015) نانوذرات اکسید کلسیم، اشرشیاکلی (Bayanduri et al., 2010) نانوذرات اکسید کلسیم در برابر لاکتوباسیلوس پلاتناروم و استافیلوکوکوس اپیدرمیس، کاندیدا تروپیکالیس. نانوذرات مس در برابر باسیلوس آتراسیس و اشرشیاکلی نانوذرات آهن در برابر اشرشیاکلی، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، نانوذرات اکسید نیکل، سزیم، تیتانیوم، کروم، کبالت (Raghunath, Perumal., 2017) در میان نانوذرات اکسید فلزی، نانوذرات اکسید روی دامنه وسیع اثرات ضد میکروبی را نشان داده است و در برابر میکروارگانیسم‌های مختلف اثرات ضد میکروبی در تحقیقات مختلف نشان داده است (Raghunath, Perumal., 2017). مهمترین مکانیسم پیشنهادی برای اثرات ضد میکروبی نانوذرات اکسید فلزی شامل، تخریب دیواره سلول و تخریب آنزیم‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌باشد. به منظور بهبود خصوصیات فیزیکی نانوذرات اکسیدهای فلزی، عملیات آمیختن سایر عناصر به نانوذرات اکسیدهای فلزی یک روش مؤثر است. در نانوذرات اکسیدهای فلزی، این عمل با آمیختن یک عنصر با ظرفیت بیشتر نسبت به اکسید اولیه فلزی انجام می‌شود. با عمل آمیختن، خصوصیات ساختاری، الکتریکی و نوری اکسیدهای فلزی دستخوش تغییر می‌شود (Srinivasulu et al., 2017). عمل آمیختن سایر عناصر در ساختار اکسید روی به منظور افزایش کارایی آن در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله آمیختن عنصر آهن (Srinivasulu et al., 2017)، آلومینیوم (Polaju et al., 2018)، نقره (Chauhan et al., 2015)، مس (Gopalakrishnan., 2012)، بیشتر این بررسی‌ها بر روی خواص الکتریکی و نوری نانوذرات اکسیدهای فلزی ترکیبی متمرکز بوده است و بررسی خواص ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی اکسیدهای فلزی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. نانوذرات ترکیبی منگنز کلسیم با اکسید روی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس (Hameed et al., 2013)؛ نانوذرات ترکیبی نقره و اکسید تیتانیوم در برابر اشرشیاکلی (Gupta et al., 2013)؛ نانوذرات ترکیبی روی و اکسید مس در برابر اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس (Malka et al., 2013) از جمله تحقیقات انجام شده در این زمینه است. برخی مطالعات اثرات سینرژیست نانوذرات مختلف با ترکیبات آنتی‌بیوتیک نظیر وانکومايسين، اریترومايسين و .. را نشان داده است. باسیلوس سرئوس یک باکتری گرم مثبت، هوازی اختیاری است که در محیط به صورت گسترده‌ای یافت می‌شود و توانایی جوانه‌زنی سبب شیوع این نوع باکتری در تمام مواد غذایی شده است. شیوع این باکتری بیشتر در شیر خام، گوشت و سبزیجات عامل بسیاری از بیماری‌های مرتبط با غذا معرفی شده است (Altaf et al., 2012). افزایش مقاومت باسیلوس سرئوس در گزارشات مختلف تأکید شده است (Sood et al., 2017). برخی مطالعات اثرات ضد میکروبی نانوذرات مختلف مانند نقره (Ghahfarokhi et al., 2014) و اکسید روی (Mirhosseini et al., 2015) را بر روی

قرار داشت. در این آزمایش از لوله کنترل منفی نیز استفاده شد. بدین ترتیب که از هر یک از ترکیبات نانوذرات یا بیوسایدها مقدار 1 میلی لیتر در یک لوله آزمایش ریخته و به آن 1 سی سی محیط کشت برات استریل اضافه گردید. پس از اضافه کردن محلولهای نانوذرات و بیوسایدها به لوله‌های هر سری، یک میلی لیتر از سوسپانسیون سوش میکروبی باسیلوس سرئوس (PTCC 1665) که دارای کدورت معین است، به لوله‌های 1 تا 8 اضافه شد. به این ترتیب محلول‌های نانوذرات و ترکیبات بیوساید با هم حجم خود، از سوسپانسیون باکتریایی رقیق شد و غلظت مورد نظر به دست آمد. پس از انجام مراحل فوق، درب لوله‌ها بسته شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37°C گرمخانه‌گذاری گردید. دانسیته نوری برای تمام نمونه‌ها در طول موج 595 نانومتر قبل و بعد از انکوباسیون سنجیده شد. افزایش میزان دانسیته نوری نشان‌دهنده رشد باکتری بود درحالی که عدم رشد باکتری در هر یک از نمونه‌ها شامل نانوذرات اکسید روی به تنهایی یا ترکیب با هیپوکلریت سدیم یا پراکسید هیدروژن به عنوان حداقل غلظت مهارتی هر ترکیب در نظر گرفته شد. اندیس کسر مهارتی برای هر یک از ترکیبات بدین صورت تعیین شد:

$$FIC(A) = \frac{\text{حداقل غلظت مهارتی ماده A در حالت ترکیبی}}{\text{حداقل غلظت مهارتی ماده A به تنهایی}} \quad (1)$$

$$FIC(B) = \frac{\text{حداقل غلظت مهارتی ماده B در حالت ترکیبی}}{\text{حداقل غلظت مهارتی ماده B به تنهایی}} \quad (2)$$

$$\Sigma FIC = FIC(A) + FIC(B) \quad (3)$$

اثر ترکیبی سپس بدین صورت تفسیر می‌گردد: اندیس کسر غلظت مهارتی کمتر از 0/5 نشان‌دهنده اثر سینرژیست؛ 0/5-0/75 نشان‌دهنده اثر سینرژیست جزئی؛ 1-0/75 نشان‌دهنده اثر افزایشی؛ 1-4 نشان‌دهنده بی اثر بودن و بیشتر از 4 نشان‌دهنده اثر آنتاگونیستی است (Roks et al., 1999).

#### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی آزمایشات، در سه تکرار صورت گرفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار STATISTICA انجام شد. به منظور سهولت بررسی تیمارهای مختلف برای هر تیمار کد مشخصی تعیین شده است که در جدول 1 نشان داده شده است.

نانوذرات حل شده در متانول بر روی توری مخصوص با پوشش کربنه و خشک کردن با هوا و سپس گرفتن تصاویر میکروسکوپی با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی در 100kv انجام شد.

#### آماده‌سازی مایه تلقیح

باکتری مورد استفاده در این تحقیق شامل باکتری باسیلوس سرئوس (PTCC 1665) تهیه شده از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران است که به صورت آمپول لیوفیلیزه تهیه گردید. سپس در شرایط استریل، شکسته شده و به محیط BHI<sup>1</sup> منتقل گردید و برای مدت 24 ساعت در دمای 32 درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری گردید (Yolmeh et al., 2015). سلول‌های میکروبی توسط سانتریفیوژ مدل ALC4232 با دور 4000rpm جدا شدند. توسط روش مک فارلند جمعیت باکتریایی تعیین شد و رقیق‌سازی تا رسیدن به جمعیت حدود 10<sup>6</sup> کلنی در هر میلی لیتر صورت گرفت.

#### فعالیت ضد میکروبی در محیط کشت جامد

با روش انتشار در آگار اثر ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی به تنهایی یا همراه با بیوسایدهای مورد آزمایش (پراکسید هیدروژن، هیپوکلریت سدیم) مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا 10<sup>6</sup> سلول در هر میلی لیتر از باسیلوس سرئوس بر روی سطح محیط کشت محیط کشت بلاد آگار به طور جداگانه تلقیح شد. سپس غلظت‌های 5، 10، 20، 30، 50، 100 و 200 میلی گرم در لیتر از هر یک از نانوذرات ترکیبی اکسید روی بر روی سطح محیط کشت بلاد آگار تلقیح شده با باکتری باسیلوس سرئوس قرار داده شد و سپس پلیت‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد برای مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. هاله عدم رشد برای نشان دادن فعالیت ضدباکتری در نظر گرفته شد (Sawai et al., 2000).

#### تعیین اندیس کسر غلظت مهارتی برای ترکیب نانوذرات

##### اکسید روی و پراکسید هیدروژن یا هیپوکلریت سدیم

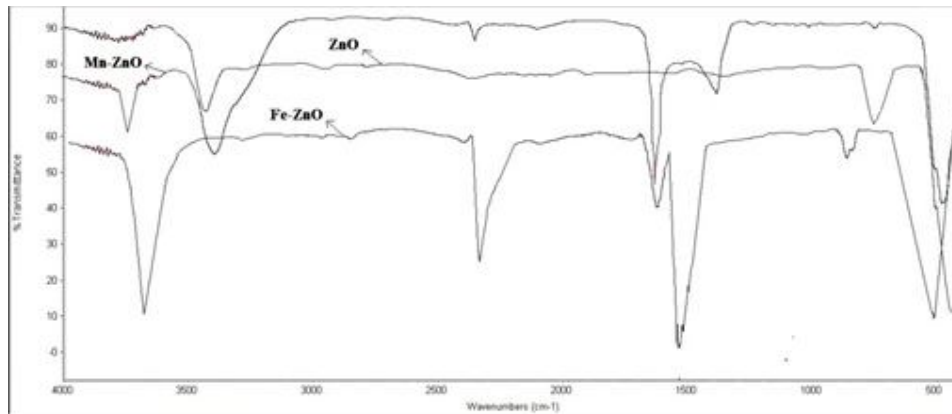
به منظور بررسی این که آیا نانوذرات ترکیبی اکسید روی با سایر ترکیبات ضد میکروبی اثر سینرژیست دارند از آزمایش تعیین اندیس کسر غلظت مهارتی استفاده شد. بدین منظور، از روش رقیق‌سازی برات استفاده شد (Kumar et al., 2004). ابتدا یک سری 8 تایی لوله حاوی محیط BHI در جالوله‌ای قرار داده و 1 میلی لیتر از هر یک از رقت‌های سریال تهیه شده از نانوذرات و ترکیبات بیوساید داخل آنها ریخته شد. بدین ترتیب که به لوله شماره 1 حداقل غلظت نانوذره و به لوله شماره 7 حداکثر غلظت نانوذرات یا بیوساید را وارد کرده و لوله شماره 8 به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد؛ بدین معنی که در این لوله فقط 1 میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی و 1 میلی لیتر محیط برات استریل

## نتایج و بحث

## ویژگی‌های نانوذرات ترکیبی اکسید روی

شکل 1 طیف مادون قرمز فوریه مربوط به نانوذرات مختلف را نشان می‌دهد. پیک در طول موج  $530-555\text{cm}^{-1}$  مربوط به اکسید روی است (Raja *et al.*, 2014) که در هر سه طیف قابل مشاهده است. پیک‌های دامنه  $650-1500\text{cm}^{-1}$  نشان‌دهنده وجود آهن در نانوذرات آهن- اکسید روی است (Muneer *et al.*, 2013).

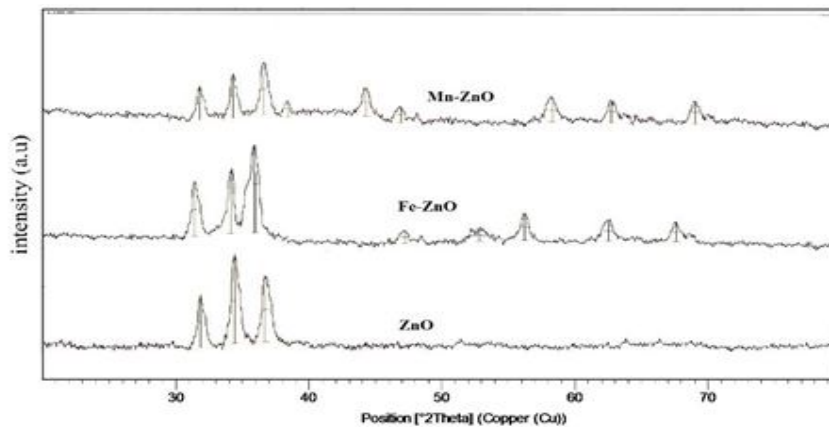
خصوص نانوذرات منگنز- اکسید روی پیک  $443\text{cm}^{-1}$  به پیوند Zn Mn- O نسبت داده شده است (Amoupour *et al.*, 2013). سایر پیک‌های ظاهر شده در دامنه  $1528-1693\text{cm}^{-1}$ ،  $2348\text{cm}^{-1}$  و  $3070-3850\text{cm}^{-1}$  نیز به ترتیب مرتبط با پیوندهای  $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ ،  $\text{C}=\text{C}$  و  $\text{O}=\text{H}$  است (Muneer *et al.*, 2013).



شکل 1- طیف مادون قرمز فوریه نانوذرات

می‌گردد (Amoupour *et al.*, 2013). آمیختن آهن در ساختار اکسید روی منجر به تغییر در میزان شدت پیک‌های  $36/74^\circ$  و  $34/47^\circ$  می‌گردد که این اثر در سایر تحقیقات نیز مشاهده شده است (Srinivasulu *et al.*, 2017).

الگوی تفرق اشعه X در نانوذرات اکسید روی، منگنز- اکسید روی و آهن اکسید روی در شکل 2 نشان داده شده است. پیک‌های پراش در  $2\theta = 31/86^\circ$ ،  $34/56^\circ$ ،  $36/36^\circ$  متعلق به اکسید روی است (Poloju *et al.*, 2018). در اثر ترکیب عنصر منگنز به اکسید روی، از شدت این پیک‌ها کاسته شده و پیک‌های اختصاصی  $38/25^\circ$ ،  $44/43^\circ$  ظاهر



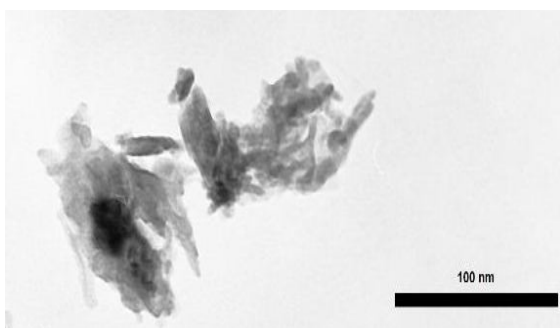
شکل 2- طیف پراش اشعه X نانوذرات

تصاویر میکروسکوپی ساختار ورتزیت را در نانوذرات نشان می‌دهد که با نتایج حاصل از پراش اشعه X همخوانی دارد. ترکیب عناصر آهن و

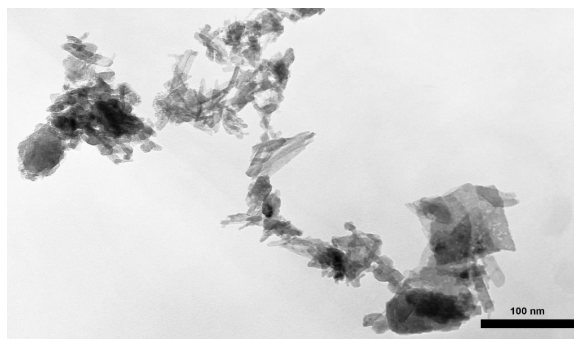
مورفولوژی نانوذرات ترکیبی منگنز- اکسید روی و آهن- اکسید روی توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری بررسی گردید (شکل 4).

نشان‌دهنده مناسب بودن روش رسوب همزمان که یک روش ساده شیمیایی است برای تهیه نانوذرات ترکیبی مورد نظر است.

منگنز نیز در تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مشهود است (شکل 3). در مجموع نتایج بررسی‌های ساختاری نانوذرات ترکیبی



(b)



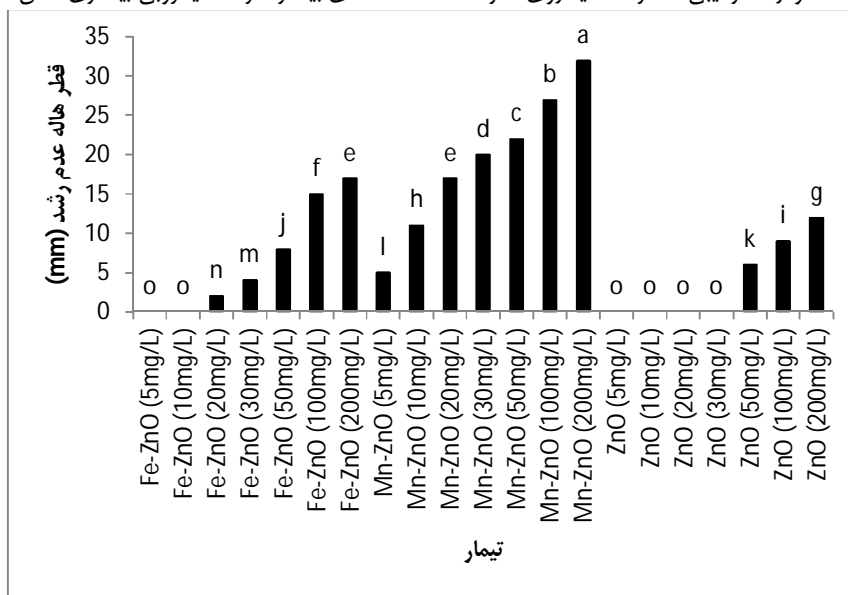
(a)

شکل 3- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری. نانوذرات منگنز - اکسید روی (a); نانوذرات آهن - اکسید روی (b).

هاله عدم رشد بیشتری نسبت به نانوذرات آهن - اکسید روی ایجاد می‌کنند که نشان‌دهنده قدرت بیشتری ضد میکروبی منگنز - اکسید روی در برابر باسیلوس سرئوس است همچنین غلظت‌های مختلف بر روی خاصیت ضد میکروبی هر یک از نانوذرات موثر است و غلظت‌های بیشتر، اثر ضد میکروبی بیشتری نشان دادند.

#### اثر ضد میکروبی بر روی محیط جامد

به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات ترکیبی منگنز - اکسید روی و آهن - اکسید روی، قطر هاله عدم رشد باسیلوس سرئوس در غلظت‌های مختلف نانوذرات سنجیده شد (شکل 4). همانطور که در شکل 4 نشان داده شده است نانوذرات ترکیبی منگنز - اکسید روی قطر



شکل 4- قطر هاله عدم رشد (mm) باسیلوس سرئوس

(اعداد با حروف یکسان دارای تفاوت معنی داری در سطح  $p < 0.01$  نیستند)

و آهن در ساختار نانوذرات اکسید روی سبب بهبود خاصیت ضد میکروبی آن در برابر باسیلوس سرئوس می‌گردد. Sharma و همکاران (2015) بهبود خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی همراه با آهن را در

بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به منگنز - اکسید روی با غلظت 200mg/L است (32 میلی‌متر). نانوذرات اکسید روی به تنهایی قطر هاله عدم رشد برابر با 16 میلی‌متر را دارا می‌باشد. ترکیب عناصر منگنز

جدول ۲- حداقل غلظت بازدارندگی و کسر غلظت بازدارندگی بر روی باسیلوس سرئوس

$\Sigma$ FIC	FeZnO+ NaOCl	$\Sigma$ FIC	FeZnO+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$\Sigma$ FIC	Mn ZnO+ NaOCl	$\Sigma$ FIC	Mn ZnO+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	بازدارندگی (درصد)	NaOCl (mg/L)	بازدارندگی (درصد)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L)	بازدارندگی (درصد)	FeZnO (mg/L)	بازدارندگی (درصد)	MnZnO (mg/L)	بازدارندگی (درصد)
۰/۷۵	۲۰+۳۰	۰/۷۵	۵+۳۰	۰/۶۹	۲۰+۲۰	۰/۶	۵+۲۰	۲۱	۲۰	۲۲	۵	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	
۰/۷۱	۳۰+۵۰	۰/۷۳	۱۰+۵۰	۰/۵۲	۳۰+۴۰	۰/۵	۱۰+۴۰	۵۹	۳۰	۵۵	۱۰	۵۵	۵۰	۴۰	۴۰	
۰/۶۵	۵۰+۱۰۰	۰/۶۳	۱۵+۱۰۰	۰/۴۱	۵۰+۶۰	۰/۳۲	۱۵+۶۰	۸۱	۵۰	۶۸	۱۵	۶۸	۱۰۰	۶۰	۶۰	
۰/۵۳	۱۰۰+۲۰۰	۰/۵۲	۲۰+۲۰۰	۰/۳۵	۱۰۰+۸۰	۰/۲۱	۲۰+۸۰	۹۱	۱۰۰	۸۹	۲۰	۸۹	۲۰۰	۸۰	۸۰	
								۱۰۰	۱۴۰	۱۰۰	۳۰	۱۰۰	۳۰۰	۱۰۰	۱۰۰	

برابر باسیلوس سوبتلیس، اشرشیاکلی و استافیلوکوس اورئوس را نشان دادند. آمیختن عناصر در ساختار اکسیدهای فلزی سبب بهبود خاصیت ضد میکروبی آنها می‌گردد که این اثر به تشکیل اکسیژن فعال ناشی از واکنش ترکیب و شکل‌گیری حامل‌های بار ایجاد شده بر روی نانوذرات اکسید روی و واکنش متقابل آنها با اکسیژن و مولکول‌های آب بر روی سطح ذرات است. آنالیز واریانس تیمارهای مختلف نیز تفاوت معنی‌دار بین نانوذرات اکسید روی به تنهایی، منگنز-اکسید روی و آهن-اکسید روی در سطح معنی‌داری 1% را تأیید نمود (داده‌ها نشان داده نشده است).

### بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و اثرات سینرژیستی

#### نانوذرات همراه با ترکیبات ضد میکروبی

حداقل بازدارندگی نانوذرات ترکیبی منگنز-اکسید روی، آهن-اکسید روی، هیدروژن پراکسید و هیپوکلریت سدیم به تنهایی و به صورت ترکیبی در غلظت‌های مختلف تعیین شد (جدول 2). مطابق این جدول، نانوذرات منگنز-اکسید روی دارای غلظت بازدارندگی کمتری نسبت به آهن-اکسید روی در برابر باسیلوس سرئوس بود. مخلوط دو ماده بیوساید با نانوذرات سبب افزایش خاصیت ضد میکروبی آنها می‌شود که چنانچه مجموع کسر غلظت بازدارندگی کمتر از 0/5 باشد نشان‌دهنده اثر سینرژیستی و 0/5-0/75 نشان‌دهنده اثر سینرژیستی جزئی است. نانوذرات منگنز-اکسید روی همراه با هیدروژن پراکسید و هیپوکلریت سدیم در غلظت کم (5+20) اثر سینرژیستی جزئی نشان داد و در سایر غلظت‌ها اثر سینرژیستی کامل داشتند. در خصوص نانوذرات آهن-اکسید روی و هیدروژن پراکسید و هیپوکلریت سدیم فقط در غلظت (100+200) اثر سینرژیستی کامل داشت و در سایر غلظت‌ها اثر سینرژیستی به صورت جزئی بود. اثر سینرژیستی هیدروژن پراکسید و هیپوکلریت سدیم با نانوذرات نقره در برابر اشرشیاکلی توسط Dong و همکاران (2015) گزارش شده است.

#### نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که نانوذرات ترکیبی منگنز-اکسید روی و آهن-اکسید روی دارای خاصیت ضد میکروبی در برابر باسیلوس سرئوس هستند. خاصیت ضد میکروبی این ترکیبات با افزایش غلظت آنها افزایش می‌یابد و اثر ضد میکروبی اکسید روی دارای منگنز بیشتر از اکسید روی حاوی آهن است. استفاده مخلوط نانوذرات ترکیبی منگنز یا آهن و اکسید روی با دو ماده بیوساید متداول در صنعت ماده غذایی شامل هیدروژن پراکسید و هیپوکلریت سدیم، سبب افزایش قدرت ضد میکروبی این ترکیبات نانوذره می‌گردد. غلظت‌های بیشتر از ترکیب نانوذرات و هر یک از بیوسایدهای مورد مطالعه سبب اثر سینرژیستی بیشتر آنها می‌گردد.

- Altaf, M.S., Iqbal, A., Ahmad, M., Hussain, S.A., Ahmad, R. and Willayat, M.M. (2012). Study of enterotoxigenicity of *B.cereus* emetic strain by skin vasopermeability reaction in rabbits and poultry. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 3(2):166-172.
- Amoupour, E., Ghodsi, F.E., Andarva, H., Abdolazadeh ziabari, A. 2013. Preparation and investigation of optical, structural, and morphological properties of nanostructured ZnO:Mn thin films. *Pramana Journal of physics*. 81(2): 33-341.
- Ansari MA, Khan HM, Khan AA, Cameotra SS, Saquib Q, Musarrat J. Interaction of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with *Escherichia coli* and their cell envelope biomolecules. *J Appl Microbiol* 2014; 116:772–83.
- Baek YW, An YJ. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Sci Total Environ* 2011; 409:1603–8.
- Bayanduri Moghaddam A, et al. Comparative study of antimicrobial activities of TiO<sub>2</sub> and CdO nanoparticles against the pathogenic strain of *Escherichia coli*. *Iran J Pathol* 2010; 5:83–9.
- Chauhan R, Reddy A, Abraham J. Biosynthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using *Pichia fermentans* JA2 and their antimicrobial property. 2015. *J Appl Nanosci* .5:63–71.
- Corr SA. Metal oxide nanoparticles. *Nanoscience* 2013;1:180–234.
- Dong, X., Koo, Y., Tang, Y., Yun, Y., Yang, Y. 2015. Superior Antibacterial Activity of Photochemical Synthesized Ag-CNT Composites and their Synergistic Effects in Combination with other Antimicrobial Agents. *J Nanomed Nanotechnol* 2015, 6(3): 1-7.
- Fernandez-Garcia M, Martinez-Arias A, Hanson JC, Rodriguez JA. Nanostructured oxides in chemistry: characterization and properties. *Chem Rev* 2004;104:4063–104.
- Ghahfarokhi, S.A., Naji, T., Mazdapour, M., Kazemi, A., T ajehmiri, A. 2014. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Bacillus cereus*. *International Journal of Basic Biosciences*. 2(2): 6-11.
- Gupta K, Singh RP, Pandey A, Pandey A. 2013. Photocatalytic antibacterial performance of TiO<sub>2</sub> and Ag-doped TiO<sub>2</sub> against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. *Beilstein J Nanotechnol* .4:346–51.
- Hameed ASH, Karthikeyan C, Sasikumar S, Kumar VS, Kumaresan S, Ravi G. Impact of alkaline metal ions Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> on the structural, optical, thermal and antibacterial properties of ZnO nanoparticles prepared by the co-precipitation method. *J Mater Chem B* 2013;1:5950.
- Jassim AM, Farhan SA, Salman JA, Khalaf KJ, Al Marjani MF, Mohammed MT. Study the antibacterial effect of bismuth oxide and tellurium nanoparticles. *Int J Chem Biol Sci* 2015;1:81–4.
- Kumar KA, Mazumdar K, Dutta NK, Karak P, Dastidar SG, et al., 2004 Evaluation of synergism between the aminoglycoside antibiotic streptomycin and the cardiovascular agent amlodipine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27: 1116-1120.
- Malka E, Peralstein I, Lipovsky A, Shalom Y, Naparstek L, Perkas N, et al. 2013. Eradication of multi-drug resistant bacteria by a novel Zn-doped CuO nanocomposite. *Small*. 9:4069–76.
- Mirhosseini, M., Barzegari Firouzabadi, F. 2015. Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in Milk by Zinc Oxide Nanoparticles. *Iranian Journal of Pathology*. 10(2): 97-104.
- Mukhtar, M., Munisa, L., Saleh, R. 2012. Co-Precipitation Synthesis and Characterization of Nanocrystalline Zinc Oxide Particles Doped with Cu<sup>2+</sup> Ions. *Materials Sciences and Applications*. 3, 543-551
- Muneer M. Ba-Abbad, Abdul Amir H. Kadhun, Abu Bakar Mohamad, Mohd S. Takriff and Kamaruzzaman Sopian. 2013. The effect of process parameters on the size of ZnO nanopartic synthesized via the sol-gel technique. *Journal of Alloys and Compounds*. 8: 63-70.
- Muthukumar, S., Gopalakrishnan, R. 2012. Structural, FTIR and photoluminescence studies of Cu doped ZnO nanopowders by co-precipitation method. *Optical Materials* 34:1946–1953.
- Poloju, M., Jayababu, N., Ramana Reddy, M.V. 2018. Improved gas sensing performance of Al doped ZnO/CuO nanocomposite based ammonia gas sensor. *Materials Science & Engineering B* 227 (2018) 61–67.
- Raghunath, A., Perumal, E. 2017. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49: 137–152.
- Raja, K., P.S. Ramesh, D. Geetha, Structural, FTIR and photoluminescence studies of Fe doped ZnO nanopowder by co-precipitation method. 2014. *Spectrochem. Acta A – Mol. Biomol. Spectrosc.* 131: 183–188.
- Roks G, Deckers CL, Meinardi H, Dirksen R, van Egmond J, et al. 1999 Effects of polytherapy compared with monotherapy in antiepileptic drugs: an animal study. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 472-477.
- Sawai J, Kojima H, Igarashi H, Hashimoto A, Shoji S, Sawaki T, et al. Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder. *World J Microbiol Biotechnol*; 2000. 16(2):187-94.
- Sharma, N., Jandaik, S., Kumar, S., Chitkara, M., Singh Sandhu, I. 2015. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of manganese- and iron-doped zinc oxide nanoparticles. *Journal of Experimental Nanoscience*. 11:1, 54-71

- Sood, B., Pal Sahota, P., Hunjan, M. 2017. Multidrug Resistant *Bacillus cereus* in Fresh Vegetables: A Serious Burden to Public Health. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 6(4): 649-661.
- Srinivasulu, T., Saritha, K., Ramakrishna Reddy, K.T. 2017. Synthesis and characterization of Fe-doped ZnO thin films deposited by chemical spray pyrolysis. *Modern Electronic Materials* 3: 76-85
- Tran N, Mir A, Mallik D, Sinha A, Nayar S, Webster TJ. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine* 2010; 5:277-83.
- Whitesides GM. Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. *Small* 2005; 1:172-9.
- Yolmeh M, Habibi-Najafi M B, Najafzadeh M. 2015. Study the effects of ultraviolet radiation on the growth of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* isolated from raw milk and raw rice Iranian Food Science and Technology Research Journal; 4: 319-324.



## Investigation of Antimicrobial and Synergistic effects of doped Zinc Oxide Nanoparticles against *Bacillus cereus*

Z. Didar<sup>1</sup>

Received: 2016.08.22

Accepted: 2016.11.19

**Introduction:** Metal oxide nanoparticles have unique physical and chemical properties. These components have shown antimicrobial effects against a wide range of microorganisms. In order to improve the physical properties of metal oxide nanoparticles, doping other elements with metal oxide nanoparticles is an effective way. *Bacillus cereus* is a gram-positive bacteria causing food-borne diseases. In this study, the antimicrobial effects of doped zinc oxide nanoparticles with manganese or iron on *Bacillus cereus* have been studied. To investigate the synergistic effects of the combined nanoparticles with two common biocides, including hydrogen peroxide and sodium hypochlorite, have been used.

**Materials and methods:** Co-precipitation method was used to prepare nanoparticles of manganese-zinc oxide and iron-zinc oxide. In this method, zinc sulfate and manganese sulfate were used to prepare manganese-zinc oxide and iron sulfate and zinc sulfate are used for Zn- Fe doped nanoparticles. After preparing the sulfate solutions, the sulfate solutions were mixed and placed in an ultrasonic apparatus at a frequency of 57 kHz for 2 hours at 50°C. Then, it was stirred at 80°C. A solution of NaOH was added until the pH of the solution reached 12. In these conditions, the mixing was done for 30 minutes. The solution was placed at ambient temperature for 18 hours. Then the centrifuge was performed to separate the sediment. Purification was done through washing with distilled water and ethanol. The precipitates were dried in the vacuum oven. In this way, the doped nanoparticles of manganese-zinc oxide and iron-zinc oxide were obtained. The Fourier transform infrared spectrum (FTIR) was carried out by the Perkin-Elmer apparatus of the Spectroma2 model, using a dry potassium bromide tablet at a frequency range of 4500-4000 cm<sup>-1</sup>. The X-ray diffraction was tested using the Phillips PW1820 from 2° to 80°. Structure of produced nanoparticles was assessed by the HITACHI electron microscope, the H-7500 model, by placing a drop of nanoparticles dissolved in methanol on a special lining with carbon coating and air drying, and performing microscopic images using an electron microscope in 100kv. The bacteria used in this study included *Bacillus cereus* (PTCC 1665) was purchased from the Iranian Scientific and Industrial Research Center and was transferred to the BHI medium in sterile condition and incubated for 32 hours at a temperature of 32°C. Microbial cells were isolated by centrifugation at 4000 rpm. McFarland's method was used for determining the bacterial population. Dilution was carried out to reach a population of about 10<sup>6</sup> CFU/ml. Agar disc diffusion method was used for assessing the antimicrobial effect of the doped nanoparticles alone or in combination with tested biocides (hydrogen peroxide, sodium hypochlorite). At first, 10<sup>6</sup> CFU/ml of *Bacillus cereus* were inoculated on the surface of Blood Agar. Then, 5, 10, 20, 30, 50, 100 and 200 mg/L of each of the nanoparticles were placed on the surface of the culture medium and then the plates was incubated at 37°C for 24 hours. Inhibition zone was considered as antibacterial activity. In order to investigate synergistic effects, inhibitory fraction index test was calculated. All experiments were performed in three replications. Statistical analyzes were performed using STATISTICA software.

**Results and discussion:** Results obtained from X-ray and FTIR analysis of doped nanoparticles confirmed that co-precipitation is a suitable method for producing doped nanoparticles of zinc oxide. TEM analysis of produced nanoparticles also affirm formation of doped nanoparticles of zinc oxide with manganese and iron. The results of antimicrobial tests showed that Mn-Zn oxide nanoparticles have more antimicrobial effects on *Bacillus cereus* than zinc oxide (32mm inhibition zone) whereas Fe- Zn oxide nanoparticles cause inhibition zone about 12 mm. In addition, both doped nanoparticles have more antimicrobial effects than zinc oxide nanoparticles alone, resulted in doping process improves antimicrobial properties of zinc oxide. The synergistic effects of synthetic nanoparticles in the combination of two common antimicrobial agents, including hydrogen peroxide and sodium hypochlorite, have been identified. Both nanoparticles show synergistic effects in combination with two tested

1. Assistant professor of food science, Neyshabur branch, Islamic azad university, Neyshabur, Iran  
(\*- Corresponding Author Email: zdidar57@gmail.com)

biocides (especially in high concentrations). A mixture of two biocides with nanoparticles increases their antimicrobial properties. Manganese-zinc oxide nanoparticles with hydrogen peroxide and sodium hypochlorite showed a partial synergistic effect at low concentrations (5 + 20) and a complete synergistic effect at higher concentrations. In the case of iron-zinc oxide, combination of this nanoparticle with hydrogen peroxide and sodium hypochlorite, has complete synergistic effects at high concentration (100 + 200) and at other conditions, shows partial synergistic effects.

**Keywords:** Doped nanoparticles, Zinc oxide, synergistic, *Bacillus cereus*