

بررسی اثر ترکیبی نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید آهن بر روی رشد و مورفولوژی باکتری‌های اش‌ریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در آبمیوه

مهدی ترابی زارچی^۱، محبوبه میرحسینی^{۲*}

چکیده

مقدمه: نانوذرات فلزی یکی از مواد ضدباکتریایی هستند که در میان آن‌ها نانوذرات MgO و Fe₂O₃ نسبت به سایر نانوذرات، سمیت کمتری بر سلول‌های پستانداران دارند. هدف از این مطالعه، بررسی اثر نانوذرات اکسید آهن و اکسید منیزیم به صورت ترکیبی و دستیابی به ترکیب بهینه دو نانوذره در مهار رشد دو باکتری *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* در آبمیوه است.

روش بررسی: در این پژوهش تجربی و آزمایشگاهی اثر ضدباکتریایی ترکیب نانوذرات MgO و Fe₂O₃ بر باکتری‌های اش‌ریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در محیط مایع ارزیابی و سپس اثر آن‌ها به صورت توأم در آبمیوه‌های هویج، انار و سیب به صورت جداگانه به روش کلنی کانت بررسی شد. همچنین از میکروسکوپ الکترونی برای بررسی تغییرات مورفولوژیک استافیلوکوکوس اورئوس و اش‌ریشیاکلی پس از تیمار ضد میکروبی استفاده شد، سپس داده‌ها با استفاده از آزمون آماری One Way Anova تحلیل شد.

نتایج: نتایج نشان داد در محیط مایع، این نانوذرات باعث کاهش رشد هر دو باکتری می‌شوند. مناسب‌ترین ترکیب ضدباکتریایی این دو نانوذره MgO+0/5 Fe₂O₃ بود؛ حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اش‌ریشیاکلی در برابر نانوذرات بیشتر بود. یافته‌های پژوهش در مورد آبمیوه‌ها نشان داد که اثر ترکیبی دو نانوذره باعث کاهش رشد دو باکتری می‌شود. اثر ترکیبی از نانوذرات اکسید آهن و اکسید منیزیم باعث تخریب غشای سلولی و در نتیجه نشت محتویات داخل سلولی و در نهایت مرگ سلول‌های باکتریایی می‌شود.

نتیجه‌گیری: نانوذرات اکسید آهن و اکسید منیزیم در غلظت‌های مجاز، اثر قابل توجهی بر باکتری‌های اش‌ریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس دارند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، اکسید منیزیم (MgO) و اکسید آهن (Fe₂O₃)، آبمیوه، پاتوژن مواد غذایی.

۱. کارشناس ارشد مرکز تحقیقات زیست فناوری پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی

۲. استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۳۷۳۰۸۹۵، پست الکترونیکی: m.mirhossaini@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۰

مقدمه

استفاده از خاصیت ضد میکروبی نانوذرات، جهت به کارگیری از آن‌ها در صنایع بسته بندی و مواد غذایی و دست یابی به مناسب ترین نانوذره و بهترین میزان مصرف آن‌ها، می تواند باعث کاهش هزینه ها و پرهیز از عوارض جانبی استفاده از آن‌ها و کاهش مسمومیت دارویی شود.

خدمتی که آنتی بیوتیک‌ها در کاهش عفونت‌ها و تسکین آلام بشری نموده اند امری غیر قابل انکار بوده و بر کسی پوشیده نیست اما در سال‌های اخیر به دلیل استفاده نادرست و بی رویه از آن‌ها، مقاومت باکتری‌ها به این عوامل ضد میکروبی افزایش یافته و یا گونه‌های جدید مقاومی ایجاد شده که به عنوان یک چالش و مشکل در سیستم بهداشتی مطرح است (۱). بنا بر تخمین سازمان بهداشت جهانی روزانه از هر ۱۰ بیماری که در بیمارستان‌ها پذیرش می‌شوند یک نفر به عفونت‌های بیمارستانی مبتلا می‌شود و هزینه‌ای که بیماران جهت درمان متحمل می‌شوند سه برابر هزینه درمان بیمارانی است که به عفونت بیمارستانی مبتلا نشده‌اند (۲). مقاومت باکتریایی به عوامل باکتریواستاتیک در سال‌های اخیر به علت گسترش سویه‌های مقاوم افزایش یافته است (۳) و برخی از عوامل ضد میکروبی به صورت وسیعی التهاب آور و سمی هستند (۴) بنابراین تلاش برای معرفی انواع جدیدی از عوامل ضد میکروبی جزو اولویت‌های مراکز پژوهشی بهداشت و سلامت است و محققان به این نتیجه رسیده‌اند که نانو اکسید فلزات بسیار فعال بوده و در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی فعالیت باکتری کشی فوق العاده‌ای نشان می‌دهند (۵، ۶) ترکیبات جدید ضد میکروبی که از رشد باکتری بیماری‌زا ممانعت می‌کنند، یک هدف مطلوب محسوب می‌شود. عوامل ایجاد کننده عفونت‌ها می‌توانند متعدد باشند و تشکیل کلنی، رشد سلول باکتری و تشکیل ماتریکس‌های بیوفیلمی فشرده میکروبی؛ باکتری‌ها را در مقابل سیستم دفاعی میزبان مقاوم می‌کند، نانوذرات این توانایی را دارند که از تشکیل این عوامل دفاعی میکروبی در برابر سیستم ایمنی میزبان جلوگیری کنند (۷، ۸). مشخص شده است که بسیاری از فلزات سنگین در غلظت‌های بسیار کم، باکتری‌ها را از بین می‌برند. مکانیسم اصلی تأثیر نانوذرات بر روی باکتری‌ها از طریق آسیب

به (DNA)، آسیب به پروتئین و تخریب دیواره سلولی است (۹، ۱۰).

مطالعات نشان می‌دهد که MgO , ZnO , Fe_2O_3 فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از جمله استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی، همچنین اسپرژیلوس نیجر، ساکارومایسس و سایر قارچ‌ها دارند (۱۱) البته باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی‌ها در برابر MgO , ZnO , Fe_2O_3 حساس تر هستند (۱۲).

در این میان هرچند بررسی زیادی در مورد اثر ضد باکتریایی نانوذرات اکسید منیزیم صورت نگرفته ولی با توجه به کم هزینه بودن سنتز نانو اکسید منیزیم و نیز سمیت کمتر این نانوذرات نسبت به نانوذرات نقره و مس، استفاده از این نانوذرات در آینده مقرون به صرفه تر است. اکسید منیزیم دارای فعالیت باکتریوسایدی در برابر پاتوژن‌های اشریشیاکلی است (۱۳). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که نانوذره اکسید منیزیم می‌تواند به تنهایی یا به صورت توأم با گروه‌های دیگر ضد میکروبی و به عنوان یک عامل بالقوه مؤثر ضد باکتری جهت افزایش ایمنی مواد غذایی استفاده شود (۱۴). در پزشکی اکسید منیزیم برای تسکین سوزش و ناراحتی‌های معده، به عنوان آنتی‌اسید، عامل ضد سموم و همچنین برای بازسازی استخوان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵). به تازگی از نانوذرات MgO در درمان سرطان همچنین نانو سرما درمانی و هیپرترمی استفاده می‌شود (۱۶). از این رو پتانسیل بالقوه‌ای برای بررسی اثرات ضد میکروبی این نانوذرات بر گونه‌های مختلف باکتریایی وجود دارد.

برای ذرات اکسید آهن ($Fe_3O_4 - Fe_2O_3$) و کادمیم سمیت بسیار کمی مشاهده شده است ولی در صورت ترکیب این مواد با سایر نانوذرات فلزی سمیت آن دچار تغییر می‌شود (۱۷) از طرفی دیگر اثبات شده است که کبالت و آهن در مقایسه با سایر نانوذرات اکسید فلزی مثل نقره دارای اثرات زیست سازگاری بهتری هستند و نیز قدرت اثرگذاری مناسبی را از خود نشان می‌دهند لذا یک عامل انتخابی مناسب برای کاربردی نمودن این نانوذرات جهت مقابله و پیشگیری از این عامل بیماری‌زا هستند

از SIGMA-ALDRICH آمریکا با قطر کمتر از ۵۰ نانومتر و نانوذرات اکسید منیزیم از US Research Nanomaterials آمریکا با قطر ۲۰ نانومتر خریداری شد. نانوذرات اکسید آهن و اکسید منیزیم در آب دوباره تقطیر استریل به مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک (الما سونیک، آلمان) برای این که پراکنده شوند و تعلیق کلوئیدی یکسان را تشکیل دهند، سونیکیت شدند.

برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید آهن و اکسید منیزیم از روش قطره پلیت به روش یوجنیو و همکاران (۲۱) با اندکی تغییر استفاده شد. برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید آهن و اکسید منیزیم ابتدا هر یک از باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به صورت چمنی بروی پلیت های حاوی TSA به صورت جداگانه کشت داده شدند. سپس در مرحله اول غلظت‌های (۰/۲۵ Fe₂O₃، ۰/۲۵ MgO، ۰/۵۰ Fe₂O₃، ۰/۷۵ MgO، ۰/۷۵ Fe₂O₃ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و (۰/۲۵ Fe₂O₃+۰/۲۵ MgO، ۰/۷۵ Fe₂O₃+۰/۵۰ MgO، ۰/۵۰ Fe₂O₃، ۰/۷۵ MgO+۰/۷۵ Fe₂O₃ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. در مرحله دوم دوز مصرفی افزایش یافته و غلظت‌های (۰/۵۰ Fe₂O₃، ۰/۵۰ MgO، ۱ MgO، ۱ Fe₂O₃، ۱/۵ MgO، ۱/۵ Fe₂O₃) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و غلظت‌های توأم (۰/۵۰ MgO+۱/۵ Fe₂O₃، ۱ Fe₂O₃+۱ MgO، ۱/۵ Fe₂O₃+۱/۵ MgO) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و علیه باکتری‌های نامبرده استفاده شد. بعد از آن محل قرار گرفتن نانوذرات به صورت قطره‌ای در هر پلیت به صورت نقاط مجزا مشخص گردید سپس ۲۰ میکرو لیتر از غلظت‌های آماده شده بر روی این نقاط مشخص شده بر روی این پلیت ها قرار گرفتند و اجازه داده شد تا قطره‌ها خشک گردد سپس هر پلیت در ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس از هاله عدم رشد در اطراف نمونه (قطره‌های خشک شده) برای نشان دادن فعالیت‌های ضد باکتری برای هر غلظت از نانوذرات استفاده شد (۲۱ و ۲۲).

(۱۸). باکتری‌های *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* از باکتری‌های بیماری‌زای مهم و مؤثر در مسمومیت غذایی هستند (۱۹).

با وجود اینکه مکانیسم‌های ضد میکروبی نانو ساختارهای فلزی هنوز به طور کامل روشن و واضح نیست اما سه مکانیسم در بین دانشمندان به طور گسترده‌ای پذیرفته شده است که عبارت‌اند از: جذب یون‌های فلزی ساطع شده از نانوذرات به درون سلول و ایجاد اختلال در مکانیسم‌های تولید و مصرف ATP و همانندسازی DNA، آسیب به سیستم اکسیداتیو گونه‌های میکروبی استفاده کننده از اکسیژن فعال (Reactive oxygen species) در تماس با نانوذرات فلزی. به این ترتیب که نانوذره مانند یک پیل الکتروشیمیایی عمل می‌کند و با اکسید کردن اتم اکسیژن، تولید یون اکسیژن و با هیدرولیز کردن آب، تولید یون OH می‌کند که هر دو این ترکیبات از قوی‌ترین عوامل ضد میکروبی می‌باشند. تجمع نانوذرات در غشاء باکتری و تخریب آن که باعث از بین رفتن خاصیت نفوذپذیری انتخابی و عملکرد نادرست پمپ‌های پروتونی می‌شود (۲۰).

در این تحقیق هدف، بررسی اثر نانوذرات اکسید آهن و اکسید منیزیم به صورت ترکیبی بر روی رشد باکتری‌های *Escherichia coli (E.coli)* و *Staphylococcus aureus* جهت دستیابی به ترکیب بهینه‌ی دو نانوذره در مهار رشد باکتری اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی (آبمیوه) است.

روش بررسی

روش مطالعه در این پژوهش از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده است. سویه‌های باکتری مورد استفاده در این آزمایش شامل استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC۱۴۳۱) و اشریشیاکلی (PTCC۱۳۹۴) بود. باکتری‌های نامبرده از کلکسیون میکروبی ایران تهیه شد. محلول‌های استوک تا زمان مورد استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. باکتری‌ها در تریپتیک سوی آگار (TSA: Liofilchem, Italy) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد فعال شدند و تا زمان استفاده در ۰ تا ۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نانوذرات اکسید آهن

حاوی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشیشیاکلی به همه ارلن‌ها اضافه گردید. یک ارلن نیز به عنوان شاهد که فقط حاوی آبمیوه و سوسپانسیون مخلوط باکتری‌ها بود تهیه شد. در نهایت ارلن‌ها بر روی شیکر قرار گرفتند. در این مرحله رشد به روش کلنی کانت باکتری‌ها در ۴ بازه زمانی ۳ ساعت، ۸ ساعت، ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. در اینجا پس از زمان مورد نظر نمونه‌ها در پلیت‌های با محیط کشت‌های EMB و MSA کشت‌شده و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس رشد باکتری بر روی این محیط‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۲۲).

جهت بررسی اثر توأم نانوذره اکسید آهن و اکسید منیزیم بر مورفولوژی باکتری‌های اشیشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس، نانوذرات با غلظت‌های $0/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ ، $1/5 \text{ MgO}$ و ترکیب آنها $0/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3 + 1/5 \text{ MgO}$ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آماده شده به هر ارلن اضافه شد. سپس به هر یک از این ارلن‌ها به طور جداگانه 10^7 cell/ml باکتری‌های اشیشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس تلقیح گردید. سپس ارلن‌ها در ۵۰ دور در دقیقه در 37°C به مدت ۲۵ ساعت شیک شدند. سپس سوسپانسیون‌های سلولی روی ورق میکا قرار داده شد و به مدت ۴۵ دقیقه برای خشک شدن در مجاورت هوا قرار گرفت. سپس به وسیله محلول ثابت‌کننده ۲/۵٪ گلوآرآلدئید و ۰/۱ مولار و محلول بافر ایمیدازول ($\text{pH}=7/2$) به مدت ۲ ساعت فیکس شده و به وسیله محلول ثابت‌کننده ۰/۱ مولار بافر ایمیدازول ثابت گردید و آگیری به وسیله غلظت‌های متفاوتی از محلول‌های اتانول ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰٪ انجام گرفت. در نهایت ورقه‌های میکا روی پایه SEM با زبانه‌های چسبناک کربن قرار گرفت و پوشش‌های تک لایه طلا برای کوت کردن روی نمونه‌ها اضافه شد.

تصاویر سلول‌های باکتریایی اشیشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس تیمار شده و تیمار نشده با میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی ۲۵۰۰۰ ثبت گردید.

آزمایش‌های مختلف در سه تکرار انجام شد و اثرات غلظت‌های متفاوت اکسید آهن و اکسید منیزیم بر میزان رشد

جهت بررسی اثر نانوذرات اکسید آهن و اکسید منیزیم در محیط کشت مایع، از محیط کشت تریپتیکازسوی‌براث (TSB) استفاده گردید. در مرحله اول ۱۰ ارلن برای هر باکتری در نظر گرفته شد. غلظت‌های محاسبه‌شده از نانوذرات در مرحله اول از غلظت‌های $0/50 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ ، $0/50 \text{ MgO}$ ، 1 MgO ، $1 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ ، $1/5 \text{ MgO}$ ، $1/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ ، $1 \text{ MgO} + 1/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ ، $1 \text{ Fe}_2\text{O}_3 + 1 \text{ MgO}$ ، $1/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3 + 1/5 \text{ MgO}$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ارلن‌های مربوطه اضافه گردید. برای هر باکتری یک ارلن به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد که فقط شامل محیط کشت استریل و بدون هیچ‌گونه نانوذرات است. سپس به هر کدام از ارلن‌ها به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاوی 10^7 باکتری که از قبل آماده شده بود تلقیح گردید و ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباسیون شیکر دار انکوبه گردید. میزان رشد باکتری‌ها به روش کلنی‌کانت در حضور غلظت‌های موردنظر نانوذرات طی ۲۴ ساعت هر ۳ ساعت بررسی گردید. بدین ترتیب که هر زمان (۳ و ۶ و ۹ و ۲۴ ساعت) برداشت ۱ میلی‌لیتر از ارلن‌ها صورت گرفت و رقت‌سازی در لوله‌ها انجام شد و بر روی پلیت حاوی EMB برای باکتری اشیشیاکلی و پلیت حاوی MSA برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس رشد باکتری بر روی این محیط‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۲۲).

به منظور بررسی اثر نانوذرات بر باکتری‌ها در مواد غذایی از آب‌میوه استفاده شد. آب‌میوه‌های مورد استفاده در این مرحله آب سیب، آب انار و آب هویج بود. بدین ترتیب که طبق محاسبات انجام شده به‌جای محیط کشت از آب‌میوه‌ها استفاده شد و نانوذرات و سوسپانسیون باکتریایی به آن‌ها اضافه شد و رشد باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله ۱۲ ارلن در نظر گرفته شد که برای هر آب‌میوه ۴ ارلن مورد نیاز بود. نانوذرات با غلظت‌های $0/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ ، $1/5 \text{ MgO}$ ، $0/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ ، 1 MgO ، $1 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ ، $1/5 \text{ MgO}$ ، $1/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ ، $1 \text{ MgO} + 1/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ ، $1 \text{ Fe}_2\text{O}_3 + 1 \text{ MgO}$ ، $1/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3 + 1/5 \text{ MgO}$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آماده شده به هر ارلن اضافه شد. در نهایت ۲۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتریایی

موردنظر است. در این بخش از آزمون آماری Oneway Anova استفاده شد و داده‌های به دست آمده نشان داد که نانوذرات اکسید منیزیم و همچنین اکسید آهن یک ماده مؤثر علیه باکتری‌های مورد آزمایش است. این نتایج حاکی از کاهش تعداد سلول‌های باکتری اشیریشیاکلی است. پس از مشخص شدن خطای انحراف معیار، میزان اختلافات میانگین داده‌ها در حالت استفاده از نانوذرات با حالت کنترل (بدون نانوذرات)، تعیین و محاسبه گردید که نتایج حاکی از معنی‌دار بودن این کاهش بود ($p=0/00$).

داده‌های پژوهش نشان داد که نانوذرات ترکیبی اکسید منیزیم و اکسید آهن $0/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3 + 1/5 \text{ MgO}$ تأثیر مطلوبی بر کاهش رشد باکتری اشیریشیاکلی دارند. جدول ۱ اثر نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید آهن در غلظت‌های مختلف علیه باکتری اشیریشیاکلی را نشان می‌دهد. آن‌چنان که در این جدول ۱ مشهود است نانوذرات اکسید منیزیم و نانوذرات اکسید آهن در غلظت $0/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3 + 1/5 \text{ MgO}$ تأثیر قوی‌تری را بر باکتری اشیریشیاکلی دارد.

باکتری‌ها بوسیله ANOVA یک‌طرفه بررسی شد. درصد‌های به دست آمده در تست ANOVA برای تعیین اختلافات معنی‌دار بین میانگین‌های گروه‌ها مقایسه شدند.

برای مقایسه‌های چندگانه از آزمون‌های تعقیبی با درجه اطمینان ۰/۹۵ استفاده شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید آهن و غلظت‌های توأم این نانوذرات در محیط کشت جامد علیه باکتری‌های اشیریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس، استفاده گردید و نتایج به دست آمده حاکی از کاهش رشد باکتری‌ها نبود و اثر نانوذرات در محیط جامد مثبت گزارش نشد.

پس از استفاده از نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید آهن و غلظت‌های توأم این نانوذرات در محیط کشت مایع علیه باکتری‌های اشیریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس، نتایج به دست آمده حاکی از کاهش در تعداد سلول‌های باکتری‌های

جدول ۱: نتایج حاصل از اثر نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید آهن بر باکتری اشیریشیاکلی در محیط کشت مایع (log cfu/ml)

ساعت ۰	ساعت ۴	ساعت ۸	ساعت ۱۰	ساعت ۲۴	
۰/۰۰	۷/۶۶	۹/۷۹	۹/۶	۱۰/۱۱	گروه شاهد'
۰/۰۰	۷/۶	۹/۴۸	۹/۹۱	۱۰/۴۹	۰/۵Mg
۰/۰۰	۵/۹	۵/۷۸	۸/۲۸	۱۰/۳۶	۱Mg
۰/۰۰	۴	۲/۲	۱/۶	۳/۴۶	۱/۵Mg
۰/۰۰	۷/۷۳	۹/۸۸	۹/۸۴	۱۰/۳۱	۰/۵Fe
۰/۰۰	۷/۸۷	۱۰	۹/۹۵	۱۰/۲۱	۱Fe
۰/۰۰	۷/۸	۹/۶۲	۱۰/۰۱	۱۰/۱۹	۱/۵Fe
۰/۰۰	۵/۶۲	۴/۹۸	۵/۲۳	۱۰/۱۸	۱Fe + ۱Mg
۰/۰۰	۳/۸۹	۱	۱/۳	۲/۸۷	۰/۵Fe + ۱/۵ MgO
۰/۰۰	۶/۹۹	۹/۲	۹/۷۸	۱۰/۱۳	۱/۵Fe + ۰/۵Mg

(بدون نانوذرات)، حاکی از معنی‌دار بودن این کاهش بوده ($p=0/00$) و به طور کلی ترکیبات نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید آهن نسبت به حالت منفرد تأثیر بیشتری جهت کاهش رشد باکتری دارند. جدول ۲ اثر نانوذرات اکسید منیزیم و

بررسی داده‌های مربوط به اثر نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید آهن بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان می‌دهد پس از مشخص شدن خطای انحراف معیار، میزان اختلافات میانگین داده‌ها در حالت استفاده از نانوذرات با حالت کنترل

اکسید آهن در غلظت $1/5 \text{ MgO} + 0/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ تأثیر قوی تری را علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارد.

اکسید آهن در غلظت‌های مختلف علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را نشان می‌دهد. آن‌چنان که در این جدول ۲ مشهود می‌باشد نانوذرات اکسید منیزیم و نانوذرات

جدول ۲: نتایج حاصل از اثر نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید آهن بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت مایع (log cfu/ml)

ساعت ۰	ساعت ۳	ساعت ۶	ساعت ۹	ساعت ۲۴	گروه شاهد
۰.۰۰	۲/۹	۴/۰۷	۴/۶۲	۸/۳۴	گروه شاهد
۰.۰۰	۲/۶۴	۲/۹۴	۳/۹۶	۴/۰۷	۰/۵Mg
۰.۰۰	۲/۳۴	۲/۳۴	۲/۵۲	۲/۶۶	۱Mg
۰.۰۰	۲/۴۱	۲/۰۴	۲/۲۸	۲/۲۸	۱/۵Mg
۰.۰۰	۳	۳/۹۹	۴/۴۷	۹/۷۶	۰/۵Fe
۰.۰۰	۲/۴۳	۲/۹۵	۳/۵۴	۵/۸۱	۱Fe
۰.۰۰	۲/۵۸	۲/۶۹	۳/۴۶	۵/۲۶	۱/۵Fe
۰.۰۰	۲/۶۵	۲/۵۲	۲/۴۶	۲/۶۹	۱Fe + ۱Mg
۰.۰۰	۲/۵۲	۲/۵۱	۲/۴۶	۲/۱۵	۰/۵Fe + ۱/۵ MgO
۰.۰۰	۲/۳۴	۲/۴۱	۳/۷۶	۴	۱/۵Fe + ۰/۵Mg

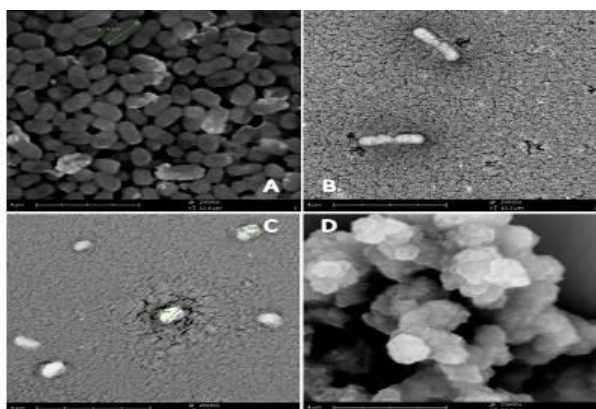
انار ($p=0/495$) و سیب ($p=0/035$) در حضور نانوذرات بوده و نشان از تأثیرگذاری ترکیب نانوذرات می‌باشد اما مقایسه اثر نانوذرات به لحاظ "آماري" فقط در آب‌میوه هویج و سیب بر باکتری اشیریشیاکلی معنی‌دار بوده در انار دارای سطح معنی‌داری نبوده است ($Pvalue > 0/05$).

در این پژوهش از لحاظ میکروبیولوژی، کاهش رشد باکتری‌ها استافیلوکوکوس اورئوس و تأثیر نانوذرات قابل مشاهده است. از جمله در محیط آب هویج، نانوذره Fe_2O_3 ۱/۵ $\text{MgO} + 0/5$ تأثیر کاهشی خوبی داشته و در ۲۴ ساعت رشد باکتری‌ها را به صفر رسانده است. در محیط آب انار و آب سیب چون محیط مناسبی برای رشد این باکتری نیستند و نتیجه اثر نانوذرات در کاهش رشد قابل‌بررسی نمی‌باشد. با توجه به تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس و تعیین سطح معنی‌داری برای سه آب میوه هویج، انار و سیب از نظر آماری مقایسه ترکیبات نانو اکسید منیزیم و اکسید آهن با این آب‌میوه‌ها بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ($p=0/729$ ، $p=0/997$ ، $p=0/526$) به ترتیب برای هویج، انار و سیب) معنی‌دار نبوده است همان‌طور که تصویر A-۱

در بررسی اثر نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید آهن، اثر این نانوذرات در حالت‌های منفرد و توأم با یکدیگر در آب‌میوه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. پس از نرمالیزه کردن داده‌های به دست آمده در این آزمایش، تعیین خطای انحراف معیار و معنی‌دار بودن این آزمایش با استفاده از آزمون آماری One Way Anova مشخص گردید که نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید آهن تأثیر مطلوبی بر جلوگیری از رشد باکتری‌های مورد آزمایش در بعضی از آب میوه‌های مختلف را دارد. کاهش تعداد سلول‌های این باکتری در هر سه آب‌میوه در حضور نانوذرات است همچنین با توجه به تأثیر قوی‌تر نانوذرات اکسید منیزیم، ترکیب این نانوذرات با نانوذرات اکسید آهن باعث بروز رفتار سینرژیک علیه باکتری اشیریشیاکلی شده است به طوری که در بین غلظت‌های موجود، غلظت $1/5 \text{ MgO} + 0/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ بیشترین کاهش را در تعداد سلول‌های باکتری را داشته است. داده‌های آزمایش، نتایج مربوط به تأثیر این نانوذرات علیه باکتری اشیریشیاکلی را نشان می‌دهد و حاکی از کاهش تعداد سلول‌های این باکتری در آب میوه‌های هویج ($p=0/015$).

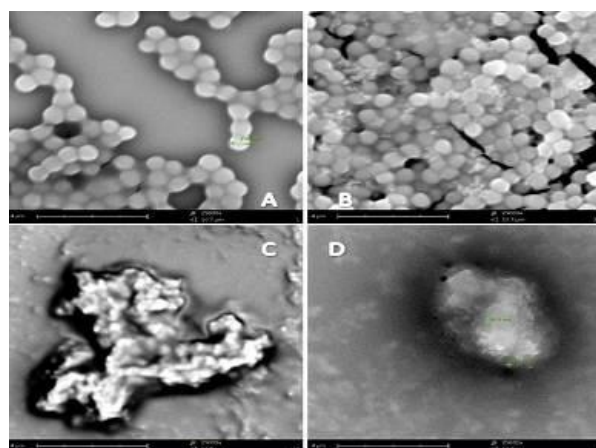
کرده است. تصویر ۱-C نشان می‌دهد که باکتری اشیریشیاکلی در مجاورت نانوذره اکسید منیزیم، کاهش یافته و به شدت صدمه دیده است. تصویر ۱-D نشان می‌دهد که ترکیب نانوذره اکسید آهن و اکسید منیزیم، باعث منقبض شدن سلول شده و ایجاد فروپاشیدگی سلول نسبت به سلول‌های سالم شده است.

نشان می‌دهد سلول‌های باکتری اشیریشیاکلی به وضوح میله‌ای هستند و اندازه‌های نرمال و ساختاری سالم و دست نخورده دارند. تصویر ۱-B نشان می‌دهد که در مجاورت نانوذرات اکسید آهن، تعداد باکتری اشیریشیاکلی کاهش یافته و باعث تغییر شکل در سطح سلول شده و فرورفتگی‌هایی نیز ایجاد



تصویر ۱ - SEM باکتری اشیریشیاکلی

A. باکتری اشیریشیاکلی (شاهد) اثر ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید آهن. C. اثر ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید منیزیم. D. اثر توأم ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید آهن و ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید منیزیم



تصویر ۲ - SEM باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

A. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (شاهد) اثر ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید آهن. C. اثر ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید منیزیم. D. اثر ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید آهن و ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید منیزیم

استافیلوکوکوس اورئوس در مجاورت نانوذرات اکسید آهن، باعث چسبندگی بیشتر باکتری‌ها به هم شده است. تصویر ۲-C نشان می‌دهد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مجاورت نانوذره اکسید منیزیم، آسیب‌دیده و ساختاری نامنظم ایجاد شده است. تصویر ۲-D نیز نشان می‌دهد که ترکیب

تصویر ۲ نیز SEM سلول‌های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را نشان می‌دهد. همان‌طور که تصویر ۲-A نشان می‌دهد سلول‌های باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به وضوح گروهی هستند و اندازه‌های نرمال و ساختاری سالم و دست‌نخورده دارند. تصویر ۲-B نشان می‌دهد که باکتری

توجه به ساختار دیواره سلولی گرم منفی‌ها و فیزیولوژی آن‌ها این اثرات کمتر مشاهده می‌گردد (۲۳).

یکی از علل حساسیت پایین‌تر اشریشیاکلی می‌تواند به این دلیل باشد که غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی مانند /اشریشیاکلی به طور غالب از لیپوپلی ساکارید مستحکم تشکیل شده است که سد مقاومی در برابر نانوذره محسوب می‌شود (۲). Chung و همکارانش پیشنهاد نمودند که میزان تجمع بار منفی بر روی باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است بر هم کنش نانوذرات دارای بار مثبت و دیواره سلولی دارای بار منفی منجر به نشت محتویات درون سلول باکتری می‌شود (۲۴).

در تحقیقی که توسط Sinha و همکاران صورت پذیرفت، اثر نانوذره نقره و اکسید روی بر باکتری‌های مزوفیل (Mesophyll) (سرمدوست) و باکتری‌های هالوفیل (Halophile) (نمک دوست) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری را نسبت به دو نانوذره مورد بررسی نشان می‌دهند (۲۵).

برای افزایش خاصیت ممانعت‌کنندگی یک ماده ضد میکروبی همچون نانوذرات، در بعضی مواقع استفاده از این مواد در حالت ترکیبی، می‌تواند یک راهکار مناسب در نظر گرفته شود که علاوه بر افزایش خاصیت ضد میکروبی، می‌تواند بر محدودیت هر یک از نانوذرات در حالت منفرد غلبه نماید. از جمله مزایای استفاده از نانوذرات در حالت ترکیبی که می‌توان به آن اشاره نمود گستردگی عملکرد آن‌ها، استفاده از غلظت‌های پایین‌تر نانوذرات در حالت ترکیبی نسبت به حالت منفرد، کاهش سمیت، جلوگیری از بروز پدیده مقاومت نسبت به هر یک از نانوذرات است (۲۶، ۲۷) البته کاهش اثر نانوذرات در حالت ترکیبی نیز گاهی اوقات می‌تواند رخ دهد. در واقع می‌توان گفت دو ماده ضد میکروبی که دارای مکانیسم نزدیک به یکدیگر باشند در حالتی که با یکدیگر جمع شوند باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی یکدیگر شده و یا به بیان دیگر رابطه سینرژیک نسبت به یکدیگر دارند (۲۷).

نانوذره اکسید آهن و اکسید منیزیم، باعث ایجاد فروپاشیدگی و از بین رفتن سلول شده است.

بحث

با توجه به بیماری‌زایی و اثرات مخرب باکتری‌های مختلف و لزوم جلوگیری از رشد و افزایش آن‌ها لازم است بهترین روش و کم هزینه ترین و پربازده ترین روش‌های ممکن به کارگیری شود.

در این پژوهش با توجه به جستجوهای متعدد از مقالات منتشرشده در مجلات و سایت‌های معتبر علمی دنیا و بررسی آن‌ها، همچنین با مد نظر قرار دادن مواردی چون صرفه اقتصادی در صورت صنعتی شدن تحقیقات، در دسترس بودن و اثرات متقابل دو نانوذره بر همدیگر (احتمال ایجاد رسوب در اثر ترکیب شدن) و همچنین احتمال حساسیت‌زایی کمتر بر سلول‌های پستانداران، از دو نانوذره MgO , Fe_2O_3 استفاده گردید؛ نتایج تحقیقات بیانگر این است که هرچند در محیط کشت جامد اثر ضد باکتریایی ترکیب، قابل قبول نبود اما در حالت سوسپانسیون نانوذرات، به فراخور میزان ترکیب متفاوت دو نانوذره، نتایج مطلوبی به دست آمد که با مطالعات سایر محققان نیز مطابقت دارد.

در این پژوهش اثر نانوذرات اکسید منیزیم با متوسط اندازه ۲۰ نانومتر و نانوذرات اکسید آهن با متوسط اندازه کمتر از ۵۰ نانومتر در غلظت‌های منفرد و توأم (۱/۵، ۱ و ۰/۵) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های این پژوهش نشان داد که نانوذرات مذکور تأثیر مطلوبی بر کاهش تعداد سلول‌های باکتری‌های اشریشیاکلی $pvalue=0/00$ و استافیلوکوکوس اورئوس $p \leq 0/05$ در محیط کشت مایع دارند.

بر اساس یافته‌های این تحقیق حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) نسبت به ترکیبات مورد استفاده در این پژوهش در مقایسه با باکتری‌های اشریشیاکلی (گرم منفی) بیشتر است. که در این زمینه نیز ساختار دیواره سلولی در گرم مثبت‌ها می‌تواند توجیه‌کننده علت این حساسیت باشد و با

داده‌های این پژوهش نشان داد که ترکیب این دو نانوذرات با یکدیگر در محیط مایع و آب میوه باعث افزایش تأثیر ضدباکتریایی آن‌ها شده و باعث کاهش چشمگیری در تعداد باکتری‌ها می‌شود. از درصد‌های تعیین شده در پژوهش می‌توان مناسب‌ترین ترکیب را $1/5 \text{ MgO} + 0/5 \text{ Fe}_2\text{O}_3$ معرفی کرد. ترکیب دو یا چند نانوذره به منظور تعیین رفتار آنتاگونیسمی یا سینرژیسمی، موضوع تحقیقات پژوهشگران زیادی بوده است. به طور مثال در یک پژوهش Reddy و همکارانش از ترکیب اکسید فلزی نانوذرات بر باکتری‌های بیماری‌زا استفاده نمودند (۲۸) در مطالعه ای دیگر از ترکیب نانوذرات اکسید روی با دیگر اکسیدهای فلزی بر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین (MRSA) و تعدادی از باکتری‌های گرم منفی بیماری‌زا استفاده شده است. در آن مطالعه نشان دادند که ترکیب این نانوذرات با یکدیگر باعث تقویت اثر یکدیگر و ایجاد رفتار سینرژیسمی نسبت به یکدیگر می‌شوند. نتایج آن‌ها نشان داد که باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بیشتری نسبت به سوسپانسیون ترکیبی نانوذرات از خود نشان دادند (۲۹).

Mandal و همکاران در ضمن پژوهش خود بیان داشتند در حالتی که اثر ترکیبی دو نانوذره نسبت به حالت منفرد، باعث کاهش جمعیت باکتریایی شود این دو ترکیب دارای اثر سینرژیسمی نسبت به یکدیگر می‌باشند (۳۰).

در حال حاضر، استفاده از نانوذرات در سلامت مواد غذایی رو به افزایش است، برای مثال، اکسید روی کوانتومی به عنوان تیمار ضد میکروبی در نمونه سفیده تخم مرغ مایع استفاده شده و نتایج نشان داده با افزایش غلظت اکسید روی کوانتومی به‌طور قابل توجهی رشد لیستریا منوسایتوزنز و سالمونلا انتریدیس در سفیده تخم مرغ مایع کاهش یافته است (۳۱).

محققان گزارش نمودند نانو امولسیون‌ها در برابر انواع عوامل بیماری‌زای مواد غذایی از جمله باکتری‌های گرم منفی مؤثر هستند، آن‌ها می‌توانند برای ضد عفونی سطح گیاهان در فراوری مواد غذایی و کاهش آلودگی سطح پوست مرغ استفاده شوند. (۳۲)

اگرچه نانوذرات فلزی تأثیر قابل ملاحظه ای بر سلول‌های باکتریایی، ویروسی و قارچی دارد با توجه به اینکه عناصر آهن و منیزیم جزو عناصر اصلی ساختار بدن پستانداران می‌باشند سمیت نانوذرات Fe_2O_3 و MgO نسبت به سایر نانوذرات فلزی کمتر مشاهده و گزارش گردیده است اما به‌طور کلی استفاده از نانوذرات می‌تواند اثرات سمی نیز در برداشته باشد.

Feng و همکاران در یک تحقیق سمیت نانوذرات روی، به صورت پودر را روی سلول‌های بدن موش در غلظت 5 گرم در هر کیلوگرم وزن بدن مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها متوجه شدند که این نانوذرات به سلول‌های کبد آسیب رسانده و باعث التهاب خفیف در معده و کلیه می‌شود (۳۳) در تحقیقی دیگر Zhu و همکاران نشان دادند که نانوذرات آهن باعث لخته شدن خون و لیز سلولی در ناحیه ریه می‌شود (۳۴) همچنین ثابت شده است که نانوذرات می‌توانند توسط نوکلئیک اسید و میتوکندری جذب شده و باعث بروز اختلال در عملکرد طبیعی این بخش‌ها و ایجاد جهش در ماده ژنتیکی شوند (۳۵) با توجه به معایبی که نانوذرات بر روی سلول‌های بدن انسان دارد، استفاده آن‌ها به صورت ترکیبی با عصاره‌های گیاهی و همچنین آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند به عنوان یک روش امیدوارکننده در جهت تقویت اثر آنتی‌بیوتیک‌ها و کاهش اثرات سمی هر دو ترکیب مورد استفاده قرار گیرد. چرا که در این صورت نیاز به مصرف بالای این مواد ضد میکروبی به تنهایی نیست و در نتیجه سمیت این مواد کاهش پیدا می‌کند (۳۶). در نهایت نتایج این پژوهش نشان داد که خاصیت ضدباکتریایی MgO از Fe_2O_3 بیشتر است که این خود می‌تواند به دلیل ساختار مولکولی متفاوت MgO و کوچک‌تر بودن مولکول‌های آن مرتبط باشد.

در این پژوهش بررسی مورفولوژیکی باکتری‌ها توسط عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی (SEM) نیز صورت گرفت که نتایج نشان داد که نانوذرات ترکیبی بیشترین تأثیر بر روی مورفولوژی باکتری‌ها داشته است.

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، استفاده از این نانوذرات در جهت کاهش رشد باکتری‌ها، مؤثر به نظر

است. در مورد دو نانوذره مصرفی، حد مجاز اکسید آهن در مردان ۸ و در زنان ۱۸ میلی‌گرم در روز است که در سایت انستیتو ملی بهداشت امریکا منتشر شده است البته این میزان در سنین مختلف و در زمان بارداری و شیردهی نیز متفاوت است (۴۰) و حد مجاز اکسید منیزیم برای زن ۳۲۰-۳۱۰ و برای مرد ۴۰۰-۴۲۰ تعیین شده است (۱۳). هم‌چنین این افزایش غلظت احتمال ایجاد گونه‌های مقاوم به نانوذرات را نیز افزایش می‌دهد که یک تأثیر منفی محسوب می‌شود زیرا عدم وجود گونه‌های مقاوم به نانوذرات یکی از دلایل استفاده از نانوذرات علیه باکتری‌ها است.

نتیجه‌گیری

از آنجا که ترکیب این دو نانوذرات با یکدیگر در محیط مایع و آب میوه باعث افزایش تأثیر ضدباکتریایی آن‌ها می‌شود، استفاده از آن‌ها به صورت ترکیبی همراه با عوامل ضد میکروبی شیمیایی و فیزیکی (عصاره‌های گیاهی، آنتی‌بیوتیک‌ها، نانوذرات دیگر و باکتریوسین‌ها، حرارت، امواج مافوق صوت، جریان الکتریکی و پرتوها) می‌تواند یک روش امیدوارکننده در عرصه صنعت غذایی در جهت کاهش اثرات سمی این ترکیبات بر روی سلول‌های بدن انسان باشد.

سپاسگزاری

این پروژه توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد اشکذر و پژوهشکده پوشش‌های نانوساختار دانشگاه پیام نور استان یزد حمایت‌شده و نویسندگان از همکاری صمیمانه این مراکز تشکر می‌نمایند.

References:

- 1-Yang W, Li H, Gong Y, Chen W, Gaidau C. *Preparation of silver nanoparticles of enhanced antibacterial effect with benzalkonium bromide*. Journal of Optoelectronics and Advanced Materials. 2011;13(5):661
- 2-Hoseinzadeh E, Alikhani M, Samarghandy M. *Evaluation of Synergistic Effect of Commercial Zinc Oxide and Copper Oxide Nanoparticles against Gram Positive and Gram Negative Bacteria by Fraction Inhibitory Concentration Index*. ZUMS Journal. 2012; 20(82):29-41

می‌رسد و از آنجا که استفاده از نانوذرات در صنایع غذایی متداول شده است می‌توان این نانوذرات را جهت بررسی بیشتر برای استفاده در صنایع غذایی پیشنهاد داد.

با توجه به اطلاعات موجود، نانومواد در مواد غذایی آلی و غیر آلی مورد استفاده قرار می‌گیرند. نانو مواد مهندسی شده که در محصولات غذایی استفاده می‌شوند به سه کلاس اصلی تقسیم شده است: نانو مواد غیر آلی، نانو مواد عاملدار سطحی و نانو مواد مهندسی شده آلی (۳۷). در صنایع غذایی، افزودنی‌های غذایی، بسته بندی مواد غذایی و یا ذخیره‌سازی، از نانو مواد مهندسی شده فلزات واسطه، مانند نقره و آهن؛ فلزات قلیایی خاکی، مانند کلسیم و منیزیم و غیر فلزات مانند سلنیوم و سیلیکات استفاده می‌کنند (۳۸).

در محصولات مصرفی از جمله غذا و آب، همچنین سطوح در تماس با مواد غذایی و بسته‌بندی مواد از نانوذرات نقره استفاده می‌شود. همچنین نمک‌های نانوکلسیم و نانومنیزیم به عنوان مکمل‌های سلامت هم اکنون در دسترس می‌باشند (۳۹).

نانوذرات آهن به عنوان یک مکمل سلامت در رفع آلودگی آب مورد استفاده قرار می‌گیرند که در آن با شکسته شدن آلاینده‌های آلی و کشتن عوامل بیماری‌زای میکروبی آلودگی را رفع می‌کنند. با این وجود، نمی‌توان غلظت را به نسبت زیاد بالا برد، زیرا استفاده از این مواد در مواد غذایی دارای یک حد مجاز است که میزان حد مجاز استفاده از نانوذرات در مواد غذایی در سازمان FDA که سازمان جهانی غذا و دارو است تعیین شده است و این میزان در مورد نانوذرات مختلف و همچنین بسته به جنسیت و وزن بدن مصرف کننده متفاوت

- 3-Hadi M, Shokoochi R, Ebrahimzadeh Namvar A, Karimi M, Solaimany Aminabad M. *Antibiotic resistance of isolated bacteria from urban and hospital wastewaters in Hamadan City*. Iranian Journal of Health and Environment. 2011; 4(1):105-14
- 4-Kalantar E, Maleki A, Khosravi M, Mahmodi S. *Evaluation of Ultrasound Waves Effect on Antibiotic Resistance Pseudomonas Aeruginosa and Staphylococcus Aureus Isolated from Hospital and their Comparison with Standard Species*. Iranian Journal of Health and Environment. 2010; 3(3):319-26
- 5-Tawale JS, Dey KK, Pasricha R, Sood KN, Srivastava AK. *Synthesis and characterization of ZnO tetrapods for optical and antibacterial applications*. Thin Solid Films. 2010;519(3):1244-7.
- 6-Zhang L, Ding Y, Povey M, York D. *ZnO nanofluids – A potential antibacterial agent*. Progress in Natural Science. 2008;18(8):939-44
- 7-Jones GL, Muller CT, O'Reilly M, Stickler DJ. *Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters*. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2006;57(2): 266-72
- 8-Schrand AM, Rahman MF, Hussain SM, Schlager JJ, Smith DA, Syed AF. *Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment*. Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology 2010; 2(5):544-68.
- 9-Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier HC, Kahru A. *Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus*. Chemosphere .2008; 71(7):1308-16.
- 10- Jeng HA, Swanson J. *Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Mammalian Cells*. Journal of Environmental Science and Health, Part A. 2006;41(12):2699-711.
- 11- Espitia P, Soares Nd, Teófilo R, Vitor D, Coimbra Jd, de Andrade N, et al. *Optimized dispersion of ZnO nanoparticles and antimicrobial activity against foodborne pathogens and spoilage microorganisms*. J Nanopart Res. 2013;15(1): 1-16.
- 12- Tayel AA, El-Tras WF, Moussa S, El-Baz AF, Mahrous H, Salem MF, et al. *Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens*. Journal of Food Safety 2011;31(2):211-8.
- 13- Jin T, He Y. *Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens*. J Nanopart Res. 2011; 13(12):6877-85.
- 14- Shi L-E, Xing L, Hou B, Ge H, Guo X, Tang Z. *Inorganic nano metal oxides used as anti-microorganism agents for pathogen control*. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial. 2010: 361-68.
- 15- Krishnamoorthy K, Manivannan G, Kim SJ, Jeyasubramanian K, Premanathan M. *Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy*. J Nanopart Res 2012; 14:1063.

- 16- Di D-R, He Z-Z, Sun Z-Q, Liu J. *A new nano-cryosurgical modality for tumor treatment using biodegradable MgO nanoparticles*. *Nanomedicine* 2012; 8(8): 1233-41.
- 17- Rezaei-Zarchi S, Javed A, Javeed Ghani M, Soufian S, Barzegari Firouzabadi F, Bayanduri Moghaddam A, et al. *Comparative Study of Antimicrobial Activities of TiO₂ and CdO Nanoparticles against the Pathogenic Strain of Escherichia coli*. *Iranian Journal of Pathology* 2010;5(2):83-9.
- 18- Kawata K, Osawa M, Okabe S. *In Vitro Toxicity of Silver Nanoparticles at Noncytotoxic Doses to HepG₂ Human Hepatoma Cells*. *Environmental Science & Technology* 2009;43(15):6046-51
- 19- Barati B., Saadati M., Bahmani M. Kh. *Isolation and Detection of Enterotoxigenic Staphylococcus Aureus Type A by Multiplex PCR*. *Journal of Military Medicine* 2006; 8(2):119-28.
- 20- Shirzad Siboni M, Samadi M, Yang J, Lee S. *Photocatalytic reduction of Cr (VI) and Ni (II) in aqueous solution by synthesized nanoparticle ZnO under ultraviolet light irradiation: a kinetic study*. *Environmental technology* 2011;32(14):1573-9
- 21- Parente E, Brienza C, Moles M, Ricciardi A. *A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity*. *Journal of Microbiological Methods* 1995;22(1):95-108.
- 22- Mirhosseini M, Firouzabadi FB. *Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens*. *International Journal of Dairy Technology* 2013; 66(2):291-5.
- 23- Lin D, Xing B. *Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth*. *Environmental Pollution* 2007; 150(2):243-50.
- 24- Chung Y-C, Su Y-P, Chen C-C, Jia G, Wang H-I, Wu JG, et al. *Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall*. *Acta Pharmacologica Sinica* 2004;6:932
- 25- Sinha R, Karan R, Sinha A, Khare SK. *Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells*. *Bioresource Technology* 2011; 102(2):1516-20.
- 26- Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SRK, Deepak V, Gurunathan S. *Silver nanoparticles impede the biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010;79(2):340-4.
- 27- Te Dorsthorst D, Verweij P, Meis J, Punt N, Mouton J. *Comparison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of in vitro interaction of antifungals against itraconazole-susceptible and-resistant Aspergillus fumigatus isolates*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002; 46(3):702-7.
- 28- Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Punnoose A. *Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems*. *Applied physics letters* 2007;90(21): 213902.

- 29- Ren G, Hu D, Cheng EWC, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. *Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications*. International Journal of Antimicrobial Agents 2009;33(6):587-90.
- 30- Mandal S, Pal NK, Chowdhury IH, Debmandal M. *Antibacterial Activity of Ciprofloxacin and Trimethoprim, Alone and in Combination, Against Vibrio cholerae O¹ Biotype El Tor Serotype Ogawa Isolates*. Polish Journal of Microbiology 2009;58(1):57-60.
- 31- Jin T, Sun D, Su JY, Zhang H, Sue HJ. *Antimicrobial Efficacy of Zinc Oxide Quantum Dots against Listeria monocytogenes, Salmonella Enteritidis, and Escherichia coli O157:H7*. Journal of Food Science. 2009;74(1):M46-52.
- 32- Sekhon BS. *Food nanotechnology—an overview*. Nanotechnology, science and applications 2010;3: 1-15.
- 33- Feng Q, Wu J, Chen G, Cui F, Kim T, Kim J. *A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Journal of biomedical materials research 2000;52(4):662-8.
- 34- Zhu M-T, Feng W-Y, Wang B, Wang T-C, Gu Y-Q, Wang M, et al. *Comparative study of pulmonary responses to nano-and submicron-sized ferric oxide in rats*. Toxicology 2008;247(2):102-11.
- 35- Singh M, Singh S, Prasad S, Gambhir I. *Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 2008;3(3):115-22.
- 36- Allahverdiyev AM, Kon KV, Abamor ES, *Bagirova M, Rafailovich M. Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents*. Expert Rev Anti Infect Ther 2011; 9(11): 1035-52
- 37- Chaudhry Q, Scotter M, Blackburn J, Ross B, Boxall A, Castle L, et al. *Applications and implications of nanotechnologies for the food sector*. Food Additives & Contaminants: Part A 2008;25(3):241-58.
- 38- Bouwmeester H, Dekkers S, Noordam MY, Hagens WI, Bulder AS, de Heer C, et al. *Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production*. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2009; 53(1):52-62.
- 39- Mirhosseini M, Afzali M. *Investigation into the antibacterial behavior of suspensions of magnesium oxide nanoparticles in combination with nisin and heat against Escherichia coli and Staphylococcus aureus in milk*. Food Control 2016; 15(68):208.
- 40- Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. *Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc*. Journal of the American Dietetic Association 2001;101(3): 294-301.

Investigation of Combination Effect of Magnesium Oxide and Iron Oxide Nanoparticles on the Growth And Morphology of the Bacteria Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli in Juice

Mahdi Torabi Zarchi¹, Mahboubeh Mirhosseini^{2*}

¹ Medical Biotechnology Research Center, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Yazd, Iran

² Department of Biology, Payame Noor University, Iran

Received: 28 Aug 2016

Accepted: 10 Dec 2016

Abstract

Introduction: Nanoparticles (NPs) are one of the antibacterial substances, among them nanoparticles type MgO and Fe₂O₃ are less toxic to mammalian cells. So, the aim of this study was investigation of combination effects of iron oxide and magnesium oxide nanoparticles on the growth of Staphylococcus aureus and Escherichia coli (E.coli) to achieve the optimum combination of nanoparticles inhibit the growth of Staphylococcus aureus and Escherichia coli in food (juice).

Methods: In this experimental research, the effect of MgO and Fe₂O₃ Nanoparticles compound on Staphylococcus aureus and Escherichia coli bacteria in liquid environment was investigated, and then their effect was investigated separately in juices of carrot, pomegranate and apple via colony count approach. Also, scanning electron microscopy was used to characterize the morphological changes of Staphylococcus aureus and Escherichia coli after antimicrobial treatments. The results of the research were analyzed using one way ANNOVA.

Results: The results of the research indicated that in liquid medium, these nanoparticles lead to reduce the growth of both bacteria. compound of 1.5Mg+0.5Fe₂O₃ was introduced as the most appropriate antibacterial compounds; Staphylococcus aureus sensitivity to Escherichia coli was higher against nanoparticles. The findings of research about the juices revealed that the combined effect of nanoparticles reduced the growth of both bacteria. the combined effect of Fe₂O₃ and MgO nanoparticles treatments distorted and damaged the cell membrane, resulting in a leakage of intracellular contents and eventually the death of bacterial cells.

Conclusion: Nanoparticles in the allowed concentrations have significant effect on Staphylococcus aureus and Escherichia coli bacteria.

Keywords:: Nanoparticles, Magnesium Oxide (Mgo), Iron Oxide (Fe₂O₃), Juice, Food Pathogens

This paper should be cited as:

Torabi Zarchi M, Mirhosseini M. Investigation of combination effect of magnesium oxide and iron oxide nanoparticles on the growth and morphology of the bacteria Staphylococcus aureus and Escherichia coli in juice. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 24(11):924-937

*Corresponding author: Tel: 09133730895, email: m.mirhossaini@gmail.com