

ارزیابی اثر ضد میکروبی نانوذرات بیوژنیک اکسید روی بر دو سویه استاندارد باکتریایی گرم منفی و گرم مثبت

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۰۷ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۶/۰۸/۳۰

زمینه و هدف: نانوذرات به‌عنوان نسل جدیدی از مواد ضد میکروبی هستند. نانوذرات اکسید روی به‌علت طیف کاربردهایشان در علوم پزشکی جذابیت زیادی ایجاد کرده‌اند. هدف از این مطالعه، بررسی و مقایسه اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی سنتز شده به‌روش سبز روی دو سویه باکتریایی گرم منفی و گرم مثبت بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی از فروردین تا شهریور سال ۱۳۹۶ در دانشگاه‌های علوم پزشکی کرمان و بم انجام شد. سنتز نانوذرات اکسید روی با استفاده از بذر زیره همانگونه که پیش‌تر شرح داده شده بود، انجام شد. مشخصات فیزیکوشیمیایی نانوذرات سنتز شده با استفاده از طیف سنجی مرئی-فراابنفش، پراش پرتو ایکس و میکروسکوپ الکترونی مطالعه شد. حداقل غلظت بازدارندگی از رشد و حداقل غلظت باکتری کشی نانوذرات بر روی سویه‌های سودوموناس آئروژنز و انتروکوکوس فکالیس با استفاده از روش میکرودیلوژن برآورد تعیین شد.

یافته‌ها: طیف سنجی مرئی-فراابنفش، پیک جذبی در محدوده ۳۷۰ nm را نشان داد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری سنتز نانوذراتی اکسید روی بیشتر کروی با اندازه کمتر از ۵۰ nm را نشان داد. کمترین غلظت بازدارندگی از رشد نانوذرات اکسید روی علیه سویه‌های سودوموناس آئروژنز و انتروکوکوس فکالیس به ترتیب ۶/۲۵ و ۱۲/۵ µg/ml تعیین شد.

نتیجه‌گیری: نانوذرات اکسید روی با استفاده از منابع طبیعی ایران تولید و نتایج ما نشان‌دهنده اثر ضد باکتریایی چشمگیر بود. می‌توان خمیر دندان حاوی نانوذرات روی را تولید و برای بیمارانی که دچار نقص در سیستم ایمنی هستند، تجویز کرد تا از رشد عوامل بیماری‌زای میکروبی فرصت طلب در دهان و انتقال آن به بدن بیمار جلوگیری کرد.

کلمات کلیدی: باکتری‌های گرم منفی، باکتری‌های گرم مثبت، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد نانوذرات، اکسید روی.

محمدرضا افلاطونیان^۱، مهرداد خاتمی^{۲*}، ایرج شریفی^۳، شهرام پورسیدی^۴، منصور خاتمی^۶، هاجر یعقوبی^۷، مهین نادریفر^۸

۱- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۲- آزمایشگاه جامع تحقیقات، دانشگاه علوم پزشکی بم، بم، ایران.

۳- مرکز تحقیقات نانوفناوری در علوم زیستی و پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۴- مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۵- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

۶- گروه محیط زیست، مرکز تحقیقات زیست محیطی کرمان، کرمان، ایران.

۷- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشگاه علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۸- مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.

* نویسنده مسئول: کرمان، انتهای بلوار ۲۲ بهمن، میدان پژوهش، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات لیشمانیوز.

تلفن: ۰۳۴-۳۲۶۵۰۲۶۱

E-mail: mehrdad7khatami@gmail.com

مقدمه

غذایی، دامداری، لوازم بهداشتی و مواد تمیزکننده خانگی منجر به رشد فراوانی سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها شده است.^۱ استفاده نادرست و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی (گوشت مرغ) که در سوپرمارکت‌ها به فروش می‌رسند و مورد مصرف انسان قرار می‌گیرند منجر به افزایش سویه‌هایی از اشرشیاکلی و سالمونلا مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده‌اند.^۲ سویه‌هایی میکروبی مقاوم به

عوامل ضد میکروبی (آنتی‌بیوتیک‌ها) به‌طور معناداری به پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی کمک کرده‌اند و در افزایش سطح سلامت جامعه نقش بسیار مهمی بازی می‌کنند.^۱ اما استفاده نادرست، مانند کاربرد گسترده از آنتی‌بیوتیک‌های قوی در صنایع

طبیعی استفاده می‌شود.^{۴۱} هدف از انجام این مطالعه، بررسی و مقایسه اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی سنتز شده به روش سبز روی دو سویه باکتریایی گرم مثبت (انتروکوکوس فکالیس) و گرم منفی (سودوموناس آئروژنز) بود.

روش بررسی

این مطالعه تجربی از فروردین تا شهریور سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه مرجع تحقیقات، دانشگاه علوم پزشکی بم انجام شد. همانطور که پیش‌تر شرح داده شده بود، ۴۰ g از بذره‌های تمیز و عاری از گرد و خاک زیره با وایتکس ۳٪ به مدت سه دقیقه ضد عفونی شدند و بلافاصله سه بار و هر بار دو دقیقه با آب مقطر شسته شدند. در ادامه بذرها با الکل ۷۰٪ به مدت دو دقیقه ضد عفونی و سپس سه بار و هر بار دو دقیقه با آب مقطر شسته شدند.^{۴۲} برای تهیه عصاره به ۱۰ گرم بذر، ۱۰۰ ml آب استریل (نسبت ۱:۱۰) اضافه شد و در دمای °C ۲۵ به مدت دو روز در تاریکی و دمای اتاق انکوبه شد. سپس با کاغذ واتمن شماره یک فیلتر و از عصاره فیلتره شده برای سنتز نانوذرات استفاده شد.

برای این منظور ابتدا استوک ذخیره نترات روی با افزودن ۰/۰۲۹۷ g نترات روی $(Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O)$ به ۵۰ ml آب استریل و سپس رساندن حجم نهایی نمونه با آب استریل به ۱۰۰ ml تهیه شد. به ۱۰ ml از عصاره بذر مقدار ۹۰ ml محلول نترات روی اضافه شد و نمونه به مدت هشت ساعت در دمای °C ۷۰ قرار گرفت و در نهایت در کوره به مدت دو ساعت کلسینه شد.

طیف سنجی نانوذرات سنتز شده در محدوده ۷۰۰-۴۰۰ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری مرئی-فرابنفش UV-visible (Analytik Jena AG, Jena, Germany) بررسی شد. شکل، اندازه و پراکنش اندازه نانوذرات سنتز شده به وسیله عکسبرداری الکترونی عبوری (Transmission electron microscope, TEM, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) مطالعه شد. برای مطالعه ماهیت کریستالی نانوذرات سنتز شده آنالیز پراکنش پرتو ایکس همانگونه که پیش‌تر شرح داده شده بود، انجام شد.^{۴۲} در این پژوهش به منظور مشخصه‌یابی از پراش پرتو ایکس توسط دستگاه وابسته به خط طیفی Cu-Ka با طول موج ۰/۱۵۴ nm و در زوایای براگ بین صفر تا ۹۰

آنتی‌بیوتیک‌ها در طیف وسیعی از گونه‌های مانند اشرشیاکلی، لیشمانیا، سالمونلا، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس‌ها و آسیتوباکترها مشاهده شده‌اند. این سویه‌ها به علت دارا بودن پلاسمیدهای خاص، نسبت به بعضی آنتی‌بیوتیک مقاوم هستند، به طوری که درمان بیماری‌ها و عفونت‌هایی که این سویه‌ها ایجاد می‌کنند، تبدیل به مشکلی پیچیده در علم پزشکی شده است.^{۴۳-۴۷} این معضل باعث ایجاد ضرورت پژوهش برای کشف و توسعه رویکردهای نوین و فوری برای مقابله با عوامل بیماری‌زا میکروبی شده است.^{۸-۱۱}

نانو مواد به موادی گفته می‌شود که حداقل در یک بعد اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتری داشته باشند.^{۱۰-۱۲} نانو مواد با خواص منحصر به فردشان در شاخه‌های مختلف علم مانند علوم دارویی، غذایی و زیست فناوری کاربرد دارند.^{۱۹-۱۵} مواد در اندازه نانومتر خواص بسیار متفاوت و منحصر به فردی از نظر نوری، رسانایی جریان الکتریکی، سختی، سطح فعال و واکنش پذیری شیمیایی دارند.^{۲۰-۲۳} یکی از این خواص متفاوت و دارای اهمیت اثر ضد میکروبی نانومواد فلزی مانند نقره، اکسید روی و مس است.^{۲۴-۲۶} ویژگی ضد میکروبی نانوذرات از یک طرف و از طرف دیگر ضرورت تحقیق و پژوهش برای کشف و توسعه رویکردهای نوین و فوری برای مقابله با باکتری‌ها مقاوم به آنتی‌بیوتیک، منجر به برنامه‌ریزی برای طراحی تولید دوست‌دار محیط زیست نانوذرات برای استفاده استراتژیکی و کاربردی در کنترل باکتری‌ها گردید.^{۲۷}

روش‌های شیمیایی تولید نانوذرات می‌تواند برای سلامت انسان و محیط زیست مسئله‌ساز باشد.^{۲۸-۳۰} سنتز نانو ساختارها که با استفاده از منابع طبیعی (باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و گیاهان) سروکار دارد، بیوسنتز یا سنتز سبز نامیده می‌شود.^{۳۱-۳۳} سنتز سبز نانوذرات ساده، زیست سازگار و دارای حداقل خطرات زیست محیطی بوده است.^{۳۴-۳۶} از میان انواع نانوذرات، نانوذرات اکسید روی به علت طیف کاربردهای متنوع در علوم پزشکی جذابیت زیادی را به خود جلب نموده‌اند.^{۳۷-۴۰} در مطالعه حاضر، با توجه به مزایا روش‌های سنتز سبز، نانوذرات اکسید روی به‌وسیله عصاره بذر زیره تولید شد. این منبع زیستی دارای خواص دارویی و معطر است و در منطقه شرق مدیترانه به‌ویژه کوهستان‌های کرمان به فراوانی در دسترس است و به‌عنوان منبع بالقوه در بسیار از کاربردهای دارویی و تولید محصولات

یافته‌ها

نتایج آنالیز اسپکتروفتومتری جذب UV-visible نانوذرات اکسید روی سنتز شده در نمودار ۱ نشان داده شده است. پیک جذبی نانوذرات اکسید روی بیوستز شده در محدوده ۳۷۰ nm بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی (شکل ۱-الف) سنتز نانوذراتی به‌طور عمده کروی و بیضی شکل با اندازه کمتر از ۵۰ nm را نشان داد. هیستوگرام توزیع اندازه نانوذرات سنتز شده در شکل ۱-ب آورده شده است. طیف XRD به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل نانوذرات اکسید روی پیک‌های جذبی در زوایا ۳۱/۴، ۳۵/۲، ۵۷/۸ و ۶۳/۴ درجه که به‌ترتیب با سطوح (۱۰۰)، (۱۰۲)، (۱۰۳) و (۲۰۰) مرتبط است (نمودار ۲).

نتایج اثر ضد باکتریایی نانوذرات علیه سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. کمترین غلظت بازدارندگی از رشد نانوذرات اکسید روی سویه‌های سودوموناس آئروژنز و ائروتروکوکوس فکالیس به‌ترتیب ۶/۲۵ و ۱۲/۵ تعیین شد. کمترین غلظت که باعث از بین رفتن سلول‌های سودوموناس آئروژنز و ائروتروکوکوس فکالیس شد به‌ترتیب ۱۲/۵ و ۲۵ $\mu\text{g/ml}$ تعیین شد. هر دو نوع باکتری نسبت به نانوذرات اکسید روی حساس بودند ($P=0/2$). این حساسیت در مورد باکتری گرم منفی بیشتر بود. باکتری گرم مثبت در مقابل نانوذرات اکسید روی مقاومت بیشتری نسبت به باکتری گرم منفی دارند که می‌تواند علت مقاومت نسبی باکتری گرم مثبت، به وجود لایه پپتیدوگلیکانی ضخیم در دیواره سلولی آن‌ها باشد. در مجموع هم باکتری گرم مثبت و هم گرم منفی نسبت به نانوذرات اکسید روی حساس بودند. اگرچه این حساسیت در مورد باکتری گرم منفی بیشتر بود.

درجه اندازه‌گیری شده‌اند. روش میکرودیلوژن برات برای بررسی اثر میکروبی نانوذرات بیوستز شده استفاده شد. حداقل غلظت بازدارندگی از رشد و حداقل غلظت باکتری‌کشی نانوذرات برای سویه‌های استاندارد اشاره شده در جدول ۱ تعیین شد. سویه‌های میکروبی مورد استفاده در این پژوهش، از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، با شماره کلکسیون کشت‌های میکروبی نوع فارسی (PTCC) تهیه گردید.

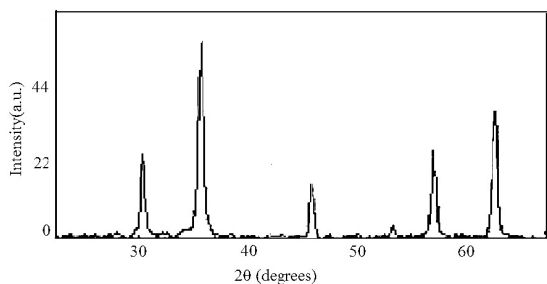
ابتدا برای هر سویه باکتریایی سوسپانسیون سلولی با کدورت نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$) تهیه شد. در چاهک‌های پلیت الیزا ۱۰۰ μl محیط کشت مولر هیتون برات اضافه و سپس مقدار ۱۰۰ μl نانوذرات اکسید روی با غلظت ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ به چاهک اول حاوی محیط کشت افزوده شد. پس از مخلوط کردن نانوذرات با محیط کشت در چاهک اول، مقدار ۱۰۰ ماکرولیتر از این مخلوط (محیط کشت + نانوذرات) را برداشته و به چاهک بعدی انتقال می‌دهیم. این کار را تا آخرین چاهک ادامه دادیم، تا در پایان سریال غلظت‌های ۱۰۰ تا ۰/۷۸ $\mu\text{g/ml}$ در چاهک‌ها به‌دست آمد. در نهایت سوسپانسیون سلولی باکتری‌ها هر کدام جداگانه به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت و در دمای 37°C قرار داده شدند. سپس میزان رشد باکتری‌ها در محیط کشت‌ها حاوی غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی بررسی شد. کمترین غلظتی از نانوذرات که از رشد باکتری جلوگیری کرد به‌عنوان Minimum inhibitory concentration (MIC) و کمترین غلظتی که تمام سلول‌های باکتریایی را از بین برد به‌عنوان Minimum bactericidal concentration (MBC) محاسبه گردید. تست‌ها به‌صورت سه بار تکرار انجام شد و نتایج این مطالعه با آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) توسط SPSS software, version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) تجزیه و تحلیل شد.

جدول ۲: نتایج تست‌ها ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی سنتز شده

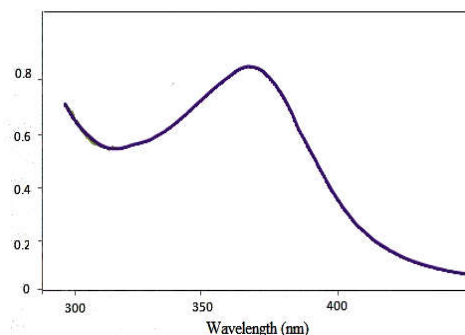
سویه باکتری	حداقل غلظت بازدارندگی از رشد ($\mu\text{g/ml}$)	حداقل غلظت کشندگی ($\mu\text{g/ml}$)
ائروتروکوکوس فکالیس	۱۲/۵	۲۵
سودوموناس آئروژنز	۶/۲۵	۱۲/۵

جدول ۱: سویه‌های میکروبی استاندارد مورد استفاده در این مطالعات

شماره	نام میکروب	شماره کلکسیون کشت‌های طبقه‌بندی گرم میکروبی نوع فارسی
۱	ائروتروکوکوس فکالیس	۱۲۳۷
۲	سودوموناس آئروژنز	۱۶۰۳



نمودار ۲: الگوی XRD نانوذرات اکسید روی بیوسنتز شده توسط عصاره زیره



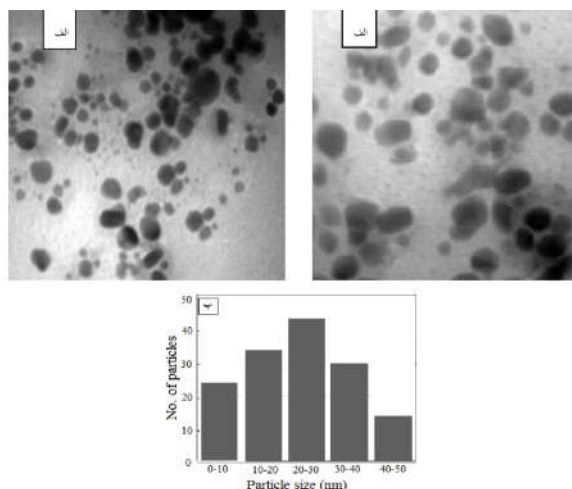
نمودار ۱: طول موج جذبی نانوذرات اکسید روی بیوسنتز شده

اکسید روی به عنوان عوامل ضد میکروبی جدید شده است.^{۴۴} Kumar و همکاران نانوذرات اکسید روی در محدوده اندازه ۱۲-۷۲ nm را با استفاده از سولفات روی و *Citrus paradisi* سنتز کردند و جذب تشدید پلاسمون سطحی SPR در محدوده ۳۶۰-۳۷۶ nm برای نانوذرات اکسید را گزارش کردند.^{۴۵} Singh و همکاران سنتز سبز نانوذرات اکسید روی (۸۰-۳۵ nm) را با استفاده از سودوموناس آئروژنز گزارش کردند.^{۴۶}

Nagarajan و همکاران سنتز خارج سلولی نانوذرات اکسید روی با استفاده منابع زیستی دریایی (جلبک دریایی) را مورد بررسی قرار دادند و سنتز نانوذرات با اندازه در محدوده ۲۰-۳۶ nm و جذب تشدید پلاسمون سطحی SPR در محدوده ۳۶۰-۳۸۰ nm برای نانوذرات اکسید را گزارش کردند.^{۴۷} هر سه پژوهش انجام شده نتایج مشابه نتایج به دست آمده در این مطالعه با استفاده از نیترات روی داشت.

Sinha و همکاران اثرات ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی را مطالعه و به این نتیجه رسیدند که گونه‌های گرم منفی اتروباکتر و ماریوباکتر حساسیت بیشتری در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس نشان می‌دهند. علت مقاوم بودن باکتری‌های گرم مثبت، به وجود لایه پپتیدوگلیکانی ضخیم در این باکتری‌ها نسبت داده شد که مشابه نتایجی است که در این مطالعه به دست آمد.^{۴۸}

Ahmad و همکاران نانوذرات اکسید روی را با استفاده از روش شیمیایی سنتز کردند و اثر ضد میکروبی را روی سویه‌های ایشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه بررسی کردند. حداقل غلظت



شکل ۱: تصاویر میکروویکوپ الکترونی (الف) نانوذرات اکسید روی سنتز شده در زیره و هیستوگرام نانوذرات سنتز شده (ب)

بحث

سنتز سبز ساده، کم هزینه، غیرسمی، سازگار با محیط زیست و کارآمد برای بهره برداری هستند.^{۴۹} استفاده از منابع زیستی برای سنتز نانوذرات به واسطه یک فرایند بیولوژیکی به لحاظ محیطی بسیار سودمند است. در حال حاضر اکسید روی (ZnO) به عنوان مواد ایمن توسط سازمان غذا و دارو به طور کلی به رسمیت شناخته شده و به عنوان افزودنی غذایی استفاده می‌شود. پیدایش فناوری نانو و توسعه مواد با خواص جدید در مقیاس نانو منجر به استفاده از نانوذرات

امید جدیدی برای پژوهشگران محیط زیست در بهبود آلودگی فراهم آورده است. ولی باید توجه کرد که با وجود فواید موثر آن پیش از استفاده کاربردی این فناوری می‌تواند مواد جدید زیان‌آور ناشناخته‌ای را در محیط زیست وارد کند که پیش از این وجود نداشته است. استفاده از فناوری نانو مانند سایر فناوری‌ها معایب متعددی را می‌تواند به دنبال داشته باشد. برای نمونه، وجود این ذرات در محیط زیست، تماس پوستی پژوهشگران با این نانوذرات و تاثیرات آن‌ها بر سلامت انسان و محیط زیست، موضوعی است که باید بر روی آن تحقیقات گسترده‌ای صورت پذیرد.

در بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات در شرایط درون آزمایشگاهی با استفاده از روش میکرودیولوشن برات محاسبه MIC و MBC در دو سویه باکتریایی نشان داد که هم باکتری گرم مثبت و هم گرم منفی نسبت به نانوذرات اکسید روی حساس بودند. این حساسیت در مورد باکتری گرم منفی بیشتر بود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی با عنوان "بررسی اثر نانوذرات اکسید روی بیوژنیک" در سال ۱۳۹۶ می‌باشد که با حمایت دانشگاه‌های علوم پزشکی و خدمات درمانی بهداشتی کرمان و بم اجرا شده است.

بازدارندگی از رشد را $800 \mu\text{g/ml}$ گزارش کردند که کمابیش ۳۰ تا ۴۰ برابر بیشتر از نتایج به دست آمده در این مطالعه بوده است.^{۴۹} آن‌ها همچنین در تصویربرداری‌های میکروسکوپی باکتری‌های کشته شده، علت مرگ سلول باکتری را از بین رفتن پیوستگی غشاء و دیواره سلولی بیان کردند. همچنین Sultan و همکاران اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی را در مجموع روی ۶۲ سویه باکتریایی گرم که شامل ۴۰ سویه بالینی اشریشیاکلی، ۱۸ سودوموناس آئروژینوزا و ۴ سویه کلبسیلا پنومونیه جدا شده از عفونت‌های سطحی پوست بود، بررسی و MIC و MBC را به ترتیب در حدود ۱۰۰۰ و $4000 \mu\text{g/ml}$ گزارش کردند.^{۵۰} Xio و همکاران کمترین غلظت بازدارندگی از رشد نانوذرات اکسید روی ۳۰ نانومتری را روی E. coli O157:H7 and S. enterica serovar Enteritidis ۰/۴ و روی *Campylobacter jejuni* ۲۵۰-۵۰۰ mg/ml گزارش کردند.^{۵۱} با وجود نتایج خوبی که نانوذرات اکسید روی در شرایط آزمایشگاهی در درمان و کنترل عوامل میکروبی نشان دادند، برای استفاده کاربردی در علوم پزشکی، بررسی‌های بیشتری برای ارزیابی فواید و مضرات نانوذرات به عنوان جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک باید انجام شود. فناوری نانو با ایجاد مواد نوظهور که هر روزه با خاصیت‌های جدید تولید می‌کند،

References

- Hao H, Sander P, Iqbal Z, Wang Y, Cheng G, Yuan Z. the risk of some veterinary antimicrobial agents on public health associated with antimicrobial resistance and their molecular basis. *Front Microbiol* 2016;7:1626.
- Chaisatit C, Tribuddharat C, Pulsrikarn C, Dejsirilert S. Molecular characterization of antibiotic-resistant bacteria in contaminated chicken meat sold at supermarkets in Bangkok, Thailand. *Jpn J Infect Dis* 2012;65(6):527-34.
- Mortazavi SM, Khatami M, Sharifi I, Heli H, Kaykavousi K, Sobhani Poor MH, et al. Bacterial Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhi Isolated from blood and stool specimens of patients. *J Cluster Sci* 2017;28(5):2997-3007.
- Medeiros M, Lincopan N. Oxacillinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. *J Bras Patol Med Lab* 2013;49(6):391-405.
- Salari S, Ayatollahi Mousavi SA2, Hadizadeh S3, Izadi A4. Epidemiology of dermatomycoses in Kerman province, southeast of Iran: A 10-years retrospective study (2004-2014). *Microb Pathog* 2017;110:561-567.
- Alizade, H., Sharifi, H., Naderi, Z., Ghanbarpour R, Bamorovat, M., Aflatoonian, M.R High Frequency of Diarrheogenic *Escherichia coli* in HIV-Infected Patients and Patients with Thalassemia in Kerman. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2017;16(4):353-358.
- Seddighi NS, Salari S, Izadi AR. Evaluation of antifungal effect of iron-oxide nanoparticles against different *Candida* species. *IET Nanobiotechnology* [Internet]. 2017. Available from: <http://digital-library.theiet.org/content/journals/10.1049/iet-nbt.2017.0025>.
- Khatami M, Heli H, Jahani PM, Azizi H, Nobre MAL. Copper/copper oxide nanoparticles synthesis using *Stachys lavandulifolia* and its antibacterial activity. *IET Nanobiotechnology* [Internet]. 2017; 11(6):[709-13 pp.]. Available from: <http://digital-library.theiet.org/content/journals/10.1049/iet-nbt.2016.0189>.
- Poor MHS, Khatami M, Azizi H, Abazari Y. Cytotoxic activity of biosynthesized Ag Nanoparticles by *Plantago major* towards a human breast cancer cell line. *Rend Fis Acc Lincei* 2017;28(4):693-699.
- Khorasani-Motlagh M, Noroozifar M, Jahani S. Preparation and characterization of nano-sized magnetic particles LaCoO₃ by ultrasonic-assisted coprecipitation method. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry* 2015;45(10):1591-5.
- Niroomand S, Khorasani-Motlagh M, Noroozifar M, Jahani S, Moodi A. Photochemical and DFT studies on DNA-binding ability and antibacterial activity of lanthanum(III)-phenanthroline complex. *J Mol Struct* 2017;1130:940-50.

12. Moghaddam HM, Beitollahi H, Tajik S, Jahani S, Khabazzadeh H, Alizadeh R. Voltammetric determination of droxidopa in the presence of carbidopa using a nanostructured base electrochemical sensor. *Russ J Electrochem* 2017;53(5):452-60.
13. Beitollahi H, Garkani Nejad F, Tajik S, Jahani S, Biparva P. Voltammetric determination of amitriptyline based on graphite screen printed electrode modified with a Copper Oxide nanoparticles. *Int J Nano Dimension* 2017;8(3):197-205.
14. Jahani S, Khorasani-Motlagh M, Noroozifar M. DNA interaction of europium(III) complex containing 2,2'-bipyridine and its antimicrobial activity. *J Biomol Struct Dyn* 2016;34(3):612-24.
15. Darroudi M, Sarani M, Kazemi Oskuee R, Khorsand Zak A, Amiri MS. Nanoceria: gum mediated synthesis and in vitro viability assay. *Ceramics Int* 2014;40(2):2863-8.
16. Heli H, Zarghan M, Jabbari A, Parsaei A, Moosavi-Movahedi AA. Electrocatalytic oxidation of the antiviral drug acyclovir on a copper nanoparticles-modified carbon paste electrode. *J Solid State Electr* 2010;14(5):787-95.
17. Sattarahmady N, Tondro GH, Gholchin M, Heli H. Gold nanoparticles biosensor of *Brucella* spp. genomic DNA: Visual and spectrophotometric detections. *Biochem Eng J* 2015;97:1-7.
18. Moradi M, Sattarahmady N, Rahi A, Hatam GR, Sorkhabadi SMR, Heli H. A label-free, PCR-free and signal-on electrochemical DNA biosensor for *Leishmania* major based on gold nanoleaves. *Talanta* 2016;161:48-53.
19. Rahi A, Sattarahmady N, Heli H. Zepto-molar electrochemical detection of *Brucella* genome based on gold nanoribbons covered by gold nanoblooms. *Sci Rep* 2015;5:18060.
20. Chkhartishvili L. Nanoparticle near-surface electric field. *Nanoscale Res Lett* 2016;11(1):48.
21. Karthik K, Dhanuskodi S, Gobinath C, Prabukumar S, Sivaramakrishnan S. Nanostructured CdO-NiO composite for multifunctional applications. *J Phys Chem Solids* 2018;112(Suppl C):106-18.
22. Karthik K, Dhanuskodi S, Prabukumar S, Gobinath C, Sivaramakrishnan S. Microwave assisted green synthesis of MgO nanorods and their antibacterial and anti-breast cancer activities. *Mater Lett* 2017;206(Suppl C):217-20.
23. Amin MA, Fadlallah SA, Alosaimi GS, Ahmed EM, Mostafa NY, Roussel P, et al. Room-Temperature Wet Chemical Synthesis of Au NPs/TiH₂/Nanocarved Ti Self-Supported Electrocatalysts for Highly Efficient H₂ Generation. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017;9(35):30115-26.
24. Khatami M, Mortazavi SM, Kishani-Farahani Z, Amini A, Amini E, Heli H. Biosynthesis of silver nanoparticles using pine pollen and evaluation of the antifungal efficiency. *Iran J Biotechnol* 2017;15(2):95-101.
25. Jahani S, Beitollahi H. Selective detection of dopamine in the presence of uric acid using nio nanoparticles decorated on graphene nanosheets modified screen-printed electrodes. *Electroanalysis* 2016;28(9):2022-8.
26. Beitollahi H, Tajik S, Jahani S. Electrocatalytic determination of hydrazine and phenol using a carbon paste electrode modified with ionic liquids and magnetic core-shell Fe₃O₄@SiO₂/MWCNT nanocomposite. *Electroanalysis* 2016;28(5):1093-9.
27. Fayez KA, El-Deeb BA, Mostafa NY. Toxicity of biosynthetic silver nanoparticles on the growth, cell ultrastructure and physiological activities of barley plant. *Acta Physiol Plant* 2017;39(7):155.
28. Soltani Nejad M, Bonjar GHS, Khatami M, Amini A, Aghighi S. *In vitro* and *in vivo* antifungal properties of silver nanoparticles against *Rhizoctonia solani*, a common agent of rice sheath blight disease. *IET nanobiotechnol* 2016;11(3):236-240.
29. Singh P, Singh H, Castro-Aceituno V, Ahn S, Kim YJ, Farh ME-A, et al. Engineering of mesoporous silica nanoparticles for release of ginsenoside CK and Rh2 to enhance their anticancer and anti-inflammatory efficacy: in vitro studies. *J Nanopart Res* 2017;19(7):257.
30. Singh P, Singh H, Ahn S, Castro-Aceituno V, Jiménez Z, Simu SY, et al. Pharmacological importance, characterization and applications of gold and silver nanoparticles synthesized by Panax ginseng fresh leaves. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2017;45(7):1415-24.
31. Hamed S, Shojaosadati SA, Mohammadi A. Evaluation of the catalytic, antibacterial and anti-biofilm activities of the *Convolvulus arvensis* extract functionalized silver nanoparticles. *J Photochem Photobiol B* 2017;167:36-44.
32. Hamed S, Ghaseminezhad M, Shokrollahzadeh S, Shojaosadati SA. Controlled biosynthesis of silver nanoparticles using nitrate reductase enzyme induction of filamentous fungus and their antibacterial evaluation. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2016:1-9.
33. Hamed S, Shojaosadati SA, Shokrollahzadeh S, Hashemi-Najafabadi S. Mechanism study of silver nanoparticle production using *Neurospora intermedia*. *IET Nanobiotech* 2017; 11(2): 157-163.
34. Singh P, Kim YJ, Zhang D, Yang DC. Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends Biotechnol* 2016;34(7):588-99.
35. Oh KH, Soshnikova V, Markus J, Kim YJ, Lee SC, Singh P, et al. Biosynthesized gold and silver nanoparticles by aqueous fruit extract of *Chaenomeles sinensis* and screening of their biomedical activities. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2017:1-8.
36. Karthik K, Dhanuskodi S, Gobinath C, Prabukumar S, Sivaramakrishnan S. *Andrographis paniculata* extract mediated green synthesis of CdO nanoparticles and its electrochemical and antibacterial studies. *J Mater Sci Mater Electron* 2017;28(11):7991-8001.
37. Schmitt M. Synthesis and testing of ZnO nanoparticles for photo-initiation: experimental observation of two different non-migration initiators for bulk polymerization. *Nanoscale* 2015;7(21):9532-44.
38. Srivastava V, Gusain D, Sharma YC. Synthesis, characterization and application of zinc oxide nanoparticles (n-ZnO). *Ceram Int* 2013;39(8):9803-8.
39. Kumar SS, Venkateswarlu P, Rao VR, Rao GN. Synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide nanoparticles. *Int Nano Lett* 2013;3(1):30.
40. Sabir S, Arshad M, Chaudhari SK. Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: synthesis and applications. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:925494.
41. Johri RK. *Cuminum cyminum* and *Carum carvi*: An update. *Pharmacogn Rev* 2011;5(9):63-72.
42. Zare E, Pourseyedi S, Khatami M, Darezereshki E. Simple biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using nature's source, and it's in vitro bio-activity. *J Mol Struct* 2017;1146:96-103.
43. Jamdagni P, Khatri P, Rana JS. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using flower extract of *Nyctanthes arbor-tristis* and their antifungal activity. *J King Saud Univ Sci* 2016.
44. Hashemi S, Asrar Z, Pourseyedi S, Nadermejad N. Green synthesis of ZnO nanoparticles by Olive (*Olea europaea*). *IET Nanobiotechnology* 2016; 10(6): 400-4.
45. Kumar B, Smita K, Cumbal L, Debut A. Green approach for fabrication and applications of zinc oxide nanoparticles. *Bioinorg Chem Appl* 2014;2014:523869.
46. Singh BN, Rawat AKS, Khan W, Naqvi AH, Singh BR. Biosynthesis of stable antioxidant ZnO nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids. *PLoS ONE* 2014;9(9):e106937.

47. Nagarajan S, Arumugam Kuppasamy K. Extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticle using seaweeds of gulf of Mannar, India. *J Nanobiotechnol* 2013;11:39.
48. Sinha R, Karan R, Sinha A, Khare SK. Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells. *Bioresour Technol* 2011;102(2):1516-20.
49. Hameed ASH, Karthikeyan C, Ahamed AP, Thajuddin N, Alharbi NS, Alharbi SA, et al. In vitro antibacterial activity of ZnO and Nd doped ZnO nanoparticles against ESBL producing producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* 2016;6:24312.
50. Sultan A, Khan HM, Malik A, Ansari MA, Azam A, Perween N. Antibacterial activity of ZnO nanoparticles against ESBL and Amp-C producing gram negative isolates from superficial wound infections. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2015;1:38-47.
51. Xie Y, He Y, Irwin PL, Jin T, Shi X. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(7):2325-31.

Evaluation antimicrobial activity of biogenic zinc oxide nanoparticles on two standard gram positive and gram negative strains

Mohammadreza Aflatoonian
Ph.D.¹

Mehrdad Khatami M.D.^{2,3*}

Iraj Sharifi Ph.D.⁴

Shahram Pourseyedi Ph.D.⁵

Mansour Khatami M.D.⁶

Hajar Yaghoobi Ph.D.⁷

Mahin Naderifar Ph.D.⁸

1- Research Center for Tropical and Infectious Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

2- Research Central Laboratory, Bam University of Medical Sciences, Bam, Iran.

3- Nanomedicine and Nanobiology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

4- Leishmaniasis Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

5- Department of Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

6- Department of Environment, The Environmental Researches Center, Kerman, Iran.

7- Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

8- Research Center for Tropical and Infectious Diseases, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

* Corresponding author: Leishmaniasis Research Center, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Pazhohesh Sq., End of 22 Bahman Blvd., Kerman, Iran.
Tel: +98- 34- 32650261
E-mail: mehrdad7khatami@gmail.com

Abstract

Received: 29 Aug. 2017 Revised: 10 Nov. 2017 Accepted: 20 Nov. 2017 Available online: 21 Nov. 2017

Background: Nanoparticles are particles that have at least one dimension between 1 and 100 nanometers. Nanoparticles are a new generation of antimicrobial agents. Nanoparticles with antimicrobial activity, especially as a new class of biomedical materials for use in increasing the level of public health in daily life have emerged. Zinc oxide nanoparticles have attracted a great attention due to the variety of their applications in medical science. The aim of this study was to evaluate and compare the antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles synthesized by green method.

Methods: This experimental study was done in 2017, from March to September in the Bam Research Center of University of Medical Sciences Kerman, Iran. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles was investigated using cumin seeds. The physicochemical characteristics of synthesized nanoparticles were studied by UV-visible ultraviolet spectrometer (Analytik Jena AG, Germany), X-ray diffraction and transmission electron microscope (TEM) (Carl Zeiss, Germany). Broth microdilution method was used to investigate the antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of these nanoparticles were determined for *Pseudomonas aerogenes* and *Enterococcus faecalis* strains.

Results: The UV-visible ultraviolet spectroscopy showed an absorption peak in the range of 370 nm. Transmission electron microscopy shows the synthesis of zinc oxide nanoparticles, mostly spherical, with a size less than 50 nm. Minimum inhibitory concentration of zinc oxide nanoparticles against *P. aerogenes* and *E. faecalis* strains was determined at 6.25 and 12.5 µg/ml, respectively. Both bacteria were sensitive to zinc oxide nanoparticles. This sensitivity was higher for gram-negative bacteria.

Conclusion: Zinc oxide nanoparticles were produced using Iranian natural resources and our results showed significant antibacterial activity. Nanotechnology creates materials with novel properties every day, and creates new hope for improving environmental pollution. These nanoparticles can be used as a new generation of antimicrobial agents in various medical disciplines. For example, toothpaste containing zinc nanoparticles can be produced and prescribed for patients with immune deficiency to prevent the growth of microbial pathogens in the mouth and its transmission to the patient's body.

Keywords: gram-negative bacteria, gram-positive bacteria, minimum inhibitory concentration of nanoparticles, zinc oxide.