Nova Biologica Reperta 6(1): 30-38 (2019)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۱، صفحات ۳۰ الی ۳۸ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

اثرات ضد باکتریایی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن زیستی و بررسی سینتیک مرگ و میر سویه‌های شایع در عفونت‌های بالینی

محسن فاطمی، نسرین ملانیا، مجید مومنی مقدم و فاطمه صادقی‌فر
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
مسئول مکاتبات: نسرین ملانیا، n.mollania@hsu.ac.ir

چکیده. خواص جدید مواد در ابعاد نانو باعث شده که نانوتکنولوژی به یکی از بخش‌های پیشرو در تمامی علوم از جمله زیست شناسی و پزشکی تبدیل گردد. در این راستا نانوذرات مغناطیسی بر پایه آهن با توجه به قابلیت‌های متنوع خود، بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته اند. امروزه افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها یکی از مشکلات عمده در درمان عفونت‌های بالینی است، از این رو یافتن عوامل ضد باکتریایی جدید برای مبارزه با سویه‌های مقاوم امری ضروری است. در این مطالعه تولید زیستی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن با استفاده از سوپرناتانت محیط کشت یک باکتری تازه استخراج شده و با هدف بررسی میزان اثر بازدارنگی این نانوذرات بر سویه‌هایی که در بروز عفونت‌های بالینی نقش عمده دارند، انجام شد. تولید زیستی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن به کمک آنزیم‌های باکتریایی بوسیله دستگاه اسپکتروسکوپی UV-Vis بررسی گردیده و اندازه متوسط نانوذرات حاصل با استفاده از تکنیک پراکندگی نور دینامیکی تخمین زده شد. خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید آهن علیه باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس با روش‌های محاسبه ضریب حساسیت باکتری‌ها بررسی گردید. در حضور این نانوذرات بیشترین ضریب حساسیت در یک برابر غلظت ممانعت کننده رشد برای اشرشیاکلی و کمترین مقدار برای استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد. میزان مرگ در دو سویه در تماس با سوسپانسیون نانوذرات از واکنش سینتیک درجه یک پیروی کرده و نسبت بقای باکتری‌ها با افزایش زمان تماس کاهش یافت. با توجه به نتایج حاصل و پتانسیل بالای نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن زیستی، می توان از آن‌ها در پیشگیری و درمان عفونت‌های بیمارستانی بهره برد.

واژه‌های کلیدی. تولید زیستی نانوذرات، حداقل غلظت مهاری، ضریب حساسیت، مقاومت آنتی بیوتیکی، نانوتکنولوژی

The anti-bacterial effects of magnetic iron oxide nanoparticles produced by biological method and the kinetic study of mortality of common strains in clinical infections

Mohsen Fatemi, Nasrin Mollania, Madjid Momeni-Moghaddam & Fatemeh Sadeghifar
Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran
Corresponding author: Nasrin Mollania, n.mollania@hsu.ac.ir

Abstract. New properties of nano-materials have made nanotechnology the leading part of biology and medical sciences. Due to their various biomedical properties, iron-based magnetic nanoparticles (MNPs) have been highly considered by biological researchers. Nowadays, increasing resistance to antibiotics is a major problem in treating clinical infections. Finding new antibacterial agents is therefore essential for the treatment of resistant strains. In this study, the iron oxide MNPs were produced using culture-medium supernatant of a newly isolated bacterium to investigate the inhibitory effects of the NPs on strains with a major role in clinical infections. Biosynthesis of iron oxide MNPs were detected by UV-Vis spectroscopy and the average size of particles was estimated by dynamic light scattering technique. The anti-bacterial activity of these NPs against *E. coli* and *S. aureus* was investigated using methods for the calculation of bacterial sensitivity coefficient. In the presence of NPs, the highest sensitivity coefficient value was observed for *E. coli* in 1xMIC concentration. On the other hand, *S. aureus* showed the lowest value. The death rate of the two strains in contact with NPs followed the first order kinetic equation and the survival rate decreased with the increase of exposure time. The results of this study as well as the high functionality of iron oxide MNPs, make

Received 15.04.2017/ Revised 09.11.2018/ Accepted 23.12.2018/ Published 01.05.2019
دریافت ۱۳۹۶/۰۱/۲۶/ اصلاح ۱۳۹۷/۰۸/۱۷/ پذیرش ۱۳۹۷/۱۰/۰۲/ انتشار ۱۳۹۸/۰۲/۱۱

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.4.9]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.30]

its application desirable in the prevention and treatment of clinical infections.

Keywords. antibiotic resistance, minimum inhibitory concentration, nanoparticles biosynthesis, nanotechnology, sensitivity coefficient

مقدمه

امروزه نانوتکنولوژی به عنوان شاهراه علوم تحقیقاتی، محل تلاقی حوزه‌های مختلفی از علوم در مسیر پیشرفت به سوی کشف مرزهای جدید دانش است. کاهش اندازه ذرات تا مرز نانومتر، تأثیراتی شگرف بر تمام خواص فیزیکی و شیمیایی مواد می گذارد، مسلماً خواص زیستی نیز از این قاعده مستثنی نبوده و تعاملات دنیای زنده درسطح نانو و با ذراتی در اندازه نانو دارای ویژگی و پتانسیل‌های منحصر به فردی خواهد بود. نانوذرات به عنوان پایه و نقطه شروع در نانوتکنولوژی، لازمه ی تمام تحقیقات و پژوهش‌های این حوزه هستند و از این رو روش‌های تولید و سنتز آن‌ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن از جمله نانوساختارهای جذاب در عرصه زیست پزشکی هستند که با توجه به قابلیت اصلاح سطح، زیست سازگاری، پایداری بالا و همچنین خاصیت مغناطیسی در کنار سایر ویژگی‌های ابعاد نانو به عنوان یک ابزار مناسب و مستعد در زمینه‌های گوناگون مورد توجه محققین هستند (Bharde *et al*., 2006; Bhabra *et al*., 2009; Hulkoti & Taranath, 2014). سنتز سبز ذرات در ابعاد نانو، از زمره روش‌های پایین به بالا در تولید نانوذرات بوده و در مقایسه با دیگر روش‌های فیزیکی و شیمیایی از مزایای قابل توجهی برخوردار است. روش‌های سنتز سبز ارزان، پاک و ایمن بوده و به دلیل آلایندگی کمتر سازگاری بیشتری با محیط زیست دارند (Bharde *et al*., 2005; Bharde *et al*., 2006; Lloyd *et al*., 2011).

در سال‌های اخیر افزایش مقاومت عوامل عفونی باکتریایی نسبت به درمان با انواع آنتی بیوتیک، باعث ایجاد نگرانی‌های عمیقی در ارتباط با چگونگی مقابله با این عوامل عفونی در آینده شده است. گزارشات رسمی حاکی از افزایش میزان ابتلا به عفونت با سویه-های فوق مقاوم و مرگ و میر ناشی از آن‌ها در دهه اخیر است (Nel *et al*., 2009; Seil & Webster, 2012). باکتری‌ها از طریق مکانیسم‌های متعددی نسبت به آنتی بیوتیک‌ها مقاومت پیدا می کنند، آن‌ها با داشتن سرعت تولید مثل بالا قادرند در صورت زنده ماندن حتی یک کلنی کوچک در حضور آنتی بیوتیک، به سرعت مکانیسم مقاومتی خود را توسعه و بهبود بخشند. استفاده گسترده و بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها نیز باعث شدت یافتن بروز و گسترش این مکانیسم‌های مقاومتی در سویه‌های مختلف شده است (Nasrollahi *et al*., 2009; Panáček *et al*., 2009; Seil & Webster, 2012; Thukkaram *et al*., 2014). با در نظر گرفتن دانسته‌های فوق، یافتن راه‌ها و مواد جدید دارای خاصیت آنتی بیوتیکی برای مقابله با افزایش روزافزون مقاومت عوامل بیماری زا، امری حائز اهمیت است. استفاده از فلزات به عنوان عوامل ضد عفونی و ضد باکتریایی از دیر باز رواج داشته اما با ظهور آنتی بیوتیک‌های مدرن و ترکیبی که اثر بخشی بیشتر و سریع تری داشتند و نیز با توجه به اثرات جانبی مخرب فلزات و ترکیبات حاصل از آن‌ها بروی بافت‌های زنده، برای مدت‌ها این خصلت رو به فراموشی گذاشته بود. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های خیره کننده علم نانو و در پی آن کشف خواص جدید مواد در ابعاد نانو باعث شد تا محققین کلید مشکل مقاومت روزافزون میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را در نانوذرات فلزی جست و جو کنند. نانوذرات فلزی علاوه بر داشتن خصوصیات شگفت انگیز و پتانسیل بالا در کاربردهای زیست پزشکی، فاقد اثرات مخرب فلزات و یون‌های حاصل از آن‌ها در ابعاد حجیم، بر سلامت انسان هستند (Stoimenov *et al*., 2002; Thukkaram *et al*., 2014; Ismail *et al*., 2015). تا کنون نانوساختارهای متعددی از نظر داشتن خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی مورد آزمایش قرار گرفته اند؛ در بررسی این نانوساختارها همواره باید این نکته را مد نظر قرار داد که برخی فلزات (همچون مس، روی و نقره) در حالت حجیم نیز خاصیت آنتی میکروبی از خود بروز می دهند، حال آنکه برخی دیگر (مانند اکسید آهن) در حالت حجیم فاقد خاصیت آنتی میکروبی بوده ولی در بُعد نانو ویژگی‌های ضد باکتریایی و ضد قارچی از خود بروز می دهد (Seil & Webster, 2012; Arakha *et al*., 2015). در این راستا و نیز با توجه به مکانیزم کاملا متفاوت فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم، نانومواد می‌توانند به عنوان جایگزینی

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.4.9]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.30]

مطلوب و با پتانسیل بالا مورد بررسی و استفاده قرار گیرند. تا کنون نانوذرات مختلفی توانسته اند بر رشد چندین سویه از میکروارگانیسم‌های بیماری زا اثر مهارکنندگی داشته باشند. میزان این اثر ارتباط مستقیمی با سویه باکتری و جنس دیواره سلولی دارد. گمان می رود نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن، همانند سایر نانوذرات اکسیدهای فلزی، از طریق میان‌کنش‌های الکترواستاتیک به غشای سلولی باکتری واکنش داده و با ایجاد آسیب غشایی و القای استرس اکسیداتیو درون سلولی منجر به مرگ آن گردد (Tran *et al*., 2010; Ismail *et al*., 2015).

در این پژوهش اثر ضد باکتریایی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن که به روش زیستی تولید شده اند علیه اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. تولید زیستی این نانوذرات فاقد پیچیدگی‌های موجود در فرایند سایر روش‌های فیزیکی و شیمیایی بوده و با توجه به بازدهی مناسب، مقرون به صرفه است. در مقایسه با پژوهش‌های مشابه؛ روش تولید زیستی مورد استفاده در این مطالعه ضمن سهولت در فرایند دستیابی به نانوذرات، از دو مزیت زمان کوتاه و بازدهی قابل توجه در میزان تولید بهره می برد. صرفه اقتصادی همواره یکی از عوامل و موانع مهم پیش روی توسعه استفاده از نانوذرات در حوزه‌های پیشگیری و درمان بوده است، نانوذرات اکسید آهن تولید شده در این مطالعه با استفاده از پیش سازهای در دسترس و نمک‌های فلزی ارزان نسبت به سایر نانوذرات فلزی بدست آمده اند. نانوذرات اکسید آهن از معدود نانوذرات با خاصیت مغناطیسی است، خاصیت مغناطیسی یک مزیت نسبی حائز اهمیت در کاربردهای تشخیصی و درمانی است. بهره‌برداری از پتانسیل‌های وسیع این نانوذرات در زمینه‌های مرتبط با درمان، مستلزم بررسی و تعیین دقیق میزان اثر این نانوذرات بر گونه‌های بیماری زای انسانی از جمله سویه‌های شایع در عفونت‌های بالینی است. در این مطالعه با ضمن تعیین میزان حساسیت این دو سویه نسبت به نانوذرات تولید شده، سینتیک مرگ و میر باکتری‌ها در حضور نانوذرات بررسی گردید. با توجه به نتایج بدست آمده یعنی تأثیر مهاری بر رشد و خاصیت باکتری کشی؛ از این نانوذرات می توان در طیف گسترده از کاربردهای زیست پزشکی از دارورسانی و بیوسنسور تا پوشش‌های ضدباکتری برای سطوح و ابزارها بهره برد.

مواد و روش‌ها

سنتز زیستی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن

نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن با استفاده از سوپرناتانت محیط کشت باکتری باسیلوس جدا شده که از نمونه برداری‌های معادن اطراف شهر بردسکن در خراسان رضوی استخراج و خالص سازی شده بود، تولید شد. همزمان با فرایندهای تولید زیستی، DNA باکتری مذکور نیز به روش فنول کلروفرم استخراج شده و بعد از تعیین توالی در پایگاه NCBI با کد دسترسی KU555428.1 به ثبت رسید. باکتری مذکور در محیط کشت استاندارد نوترینت براث به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد، سپس بیومس باکتریایی با سانتریفوژ از سوپرناتانت جدا گردید. به منظور اطمینان از عدم وجود میکروارگانسیم، رویه محیط کشت از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده شد. با افزودن نمک کلرید آهن (III) به رویه ی فیلتر شده، تغییر رنگ و افزایش کدورت محلول و در پی آن تشکیل رسوبات قهوه ای رنگ مشاهده گردید. حضور نانوذرات اکسید آهن در سوسپانسیون حاصل ابتدا به وسیله تکنیک طیف سنجی UV-Vis شناسایی شده و در ادامه برای تأیید اندازه ذرات از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) استفاده شد. همچنین ذرات این سوسپانسیون نسبت به آهنربا واکنش نشان داده و از این رو وجود خاصیت مغناطیسی در آن‌ها مسجل گردید.

آنالیز پراکندگی نور دینامیکی

پراکندگی نور دینامیکی یک روش فیزیکی برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها است. این روش غیرمخرب و سریع بوده و برای تعیین اندازه ذرات در محدوده ی چند نانومتر تا میکرون به کار می رود. این روش به برهمکنش نور با ذره بستگی داشته و نور پراکنده شده در محلول با زمان تغییر می کند که می تواند به قطر ذره ارتباط داده شود (Brar & Verma, 2011). برای آنالیز DLS، از سوپرناتانت تلقیح شده با نمک پس از فیلتراسیون و پیش از تغلیظ با روتاری استفاده کردیم. محلول حاوی نانوذره درون کووت شیشه ای با حجم ۳/۵ میلی لیتر (سل مربعی با ابعاد ۱۲/۵×۱۲/۵×۴۶ میلی متر) ریخته شد و در طول موج مرئی ۶۵۸ نانومتر در حلال آب مورد سنجش قرار گرفته، نمودار توزیع اندازه نانوذرات به دست آمد.

نمونه‌های باکتریایی

جهت انجام آزمایشات ضد باکتریایی از باکتری‌های اشرشیاکلی (ATCC 25922) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) استفاده شد که به صورت لیوفیلیزه نگهداری شده و از آزمایشگاه

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.4.9]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.30]

میکروبیولوژی پزشکی تهیه شده بودند. با توجه به اینکه احتمالا فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن بخاطر تاثیر بر دیواره سلولی باکتری‌ها است، لذا از هر دو گروه باکتری گرم مثبت و گرم منفی یک نمونه باکتری برای انجام آزمایشات انتخاب شدند. به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی جهت انجام آزمایش-های ضد باکتریایی، ابتدا سلول‌های باکتریایی از سطح محیط کشت به کمک لوپ استریل جمع آوری و در یک میلی لیتر بافر نمکی فسفات استریل مخلوط گردید تا نمونه‌هایی با کدورت نیم مک فارلند ($۱۰^{۸}\times$ ۱/۵-۱ واحد کلنی در هر میلی لیتر) (CFU- واحد تشکیل کلنی) تهیه شود. برای اطمینان، جذب محلول آماده شده به وسیله اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش در محدوده طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری و میزان جذب در محدوده ۰/۱ – ۰/۰۸ تنظیم گردید.

آزمون ضد باکتریایی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن

تعیین میزان اثر گذاری نانوذرات به عنوان یک عامل ضد میکروبی؛ نیازمند روش‌های آزمایشگاهی است که از طریق آن‌ها بتوان میزان زنده مانی باکتریایی را پس از قرار گرفتن در معرض نانوذره، به دقت اندازه گیری نمود. در همین راستا سوسپانسیون حاوی غلظت‌های متفاوت نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی با رعایت شرایط استریل تهیه شد تا از آن برای تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و کمترین غلظت باکتری کشی (MBC)، برای هر یک از باکتری‌های مورد نظر، استفاده شود. MIC نشان‌دهنده حداقل مقدار از ماده ضد باکتری (در اینجا نانوذره مورد نظر) است که در آن غلظت، رشد باکتری در محیط کشت متوقف می شود. MBC نیز غلظتی از نانوذره مورد نظر است که در آن علاوه بر توقف رشد، ۹۹/۹ درصد از باکتری‌های موجود در محیط کشت نیز از بین می‌روند.

در این راستا از ۱۲ لوله که هر کدام حاوی ۲ میلی لیتر محیط نوترینت براث استریل بود، استفاده گردید. بدین صورت که در لوله اول فقط ۴ میلی لیتر سوسپانسیون نانوذره مورد نظر (با غلظت ۱۰۰۰۰ میکرو گرم بر میکرولیتر) ریخته و مخلوط شد، سپس از لوله شماره ۱ که حاوی ۴ میلی لیتر سوسپانسیون نانو ذره و محیط کشت بود، ۲ میلی لیتر برداشته و به لوله شمار ۲ اضافه و از این لوله ۲ میلی لیتر به لوله بعدی اضافه و به همین ترتیب تا لوله ۱۲ این عمل تکرار گردید (غلظت‌های نانوذرات از لوله اول تا دوازدهمین لوله به ترتیب سیر نزولی دارند). سپس لوله‌های حاوی نانو ذرات و باکتری در دمای ۳۷ °C، ۱۸۰ دور در دقیقه و حداکثر زمان ۲۴ ساعت گرما گذاری شدند. در همه محیط‌ها از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت نیم مک فارلند استفاده شد.

آزمایشات مطالعه سینتیک مرگ باکتری‌های بیماری‌زا و تعیین مقدار حساسیت آن‌ها به نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن

برای بررسی سینتیک مرگ باکتری‌ها، محلول سوسپانسیون باکتریایی به محیط کشت حاوی نانو ذرات با غلظت‌های یک و دو برابر مقدار MIC اضافه و سپس در انکوباتور شیکر دار (۱۸۰ دور در دقیقه، دمای ۳۷ °C و حداکثر زمان ۲۴ ساعت) گرما گذاری شدند. در زمان‌های مورد نظر (صفر تا ۵ ساعت) از سوسپانسیون باکتری-نانوذره اکسید آهن نمونه برداری شده و بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده می‌شدند. در ادامه کلنی‌های شکل گرفته برای هر زمان و هر باکتری در هر غلظت (دو غلظت برای باکتری‌های اشریشاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس) شمارش و ثبت گردیدند. نسبت بقا (N/N_0) از تقسیم تعداد کلنی‌های باکتری در زمان نمونه برداری (N) بر تعداد کلنی‌ها در زمان قبل از تماس با سوسپانسیون نانو ذرات اکسید آهن (N_0) محاسبه گرددند. سینتیک مرگ باکتری‌ها از معادله مرگ درجه اول تبعیت می‌نمایند. معادله سینتیک به صورت زیر است:

$$\frac{dN}{dt} = -k$$

در معادله بالا (k) بیان کننده ثابت میزان مرگ و میردرجه اول، N_0 تعداد کلنی‌های اولیه باکتری و N تعداد کلنی‌های باکتری پس از تماس با سوسپانسیون نانوذرات اکسید آهن پس از گذشت زمان است. از طرفی در این مطالعه ضریب حساسیت نانو ذرات (Z) بر حسب میکرو گرم بر میلی لیتر به وسیله رابطه زیر که توسط Yoon و همکاران به صورت زیر بیان شده بود، بدست می‌آید (Yoon *et al*., 2007):

$$Z = \frac{-\ln\left(\frac{N}{N_0}\right)}{C}$$

در رابطه بالا N تعداد کلنی‌های باکتریایی پس از تماس با نانوذرات اکسید آهن، N_0 تعداد کلنی‌های باکتریایی اولیه و C غلظت نانوذرات مورد مطالعه بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر

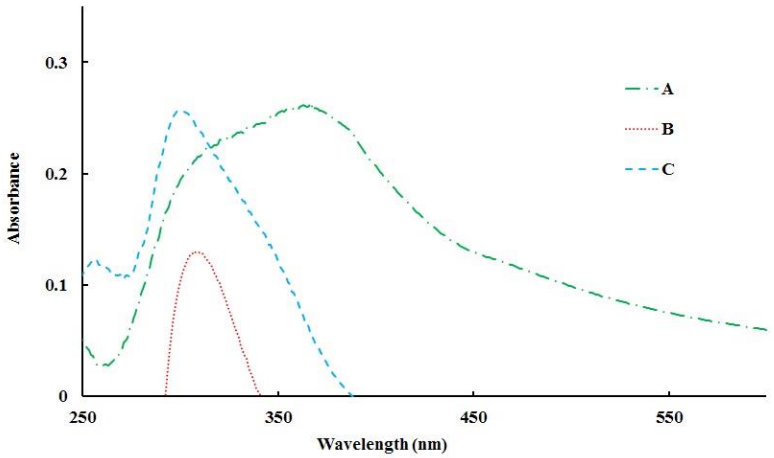
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.4.9]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.30]

است. با استفاده از مقادیر Z و C، نسبت باکتری‌های زنده (N/N_0) قابل پیش بینی است. مقدار بالای Z به این معنی است که باکتری‌ها نسبت به نانوذرات اکسید آهن از حساسیت بیشتری برخوردار بوده و به عبارت دیگر بیانگر این است که نانو ذرات اکسید آهن دارای خاصیت ضد باکتریایی بیشتری است.

نتایج

مطابق روش مطرح شده در بخش روش‌ها، نمک آهن (III) کلرید ۶ آبه به مقداری که غلظت آن در حجم مورد نظر از سوپرناتانت به ۵ mM برسد، اضافه شد. با افزودن محلول نمک، سوپرناتانت شفاف و زرد رنگ به سوسپانسیونی قهوه ای رنگ تبدیل شده، بعد از ۳۰ دقیقه طیف جذبی آن نسبت به سوپرناتانت فاقد نمک توسط دستگاه اسپکتروسکوپی UV-Vis خوانده شد. بنا به گزارشات منتشر شده در مقالات و منابع معتبر محدوده وسیعی برای پیک نانوذرات اکسید آهن ذکر شده که بسته به اندازه ذرات، روش تولید و نوع پوشش سطحی می تواند تا حدود زیادی متفاوت باشد. مطابق با مقالات و منابع موجود وجود پیک شاخص در محدوده ۳۵۰ تا ۴۰۰ نانومتر مربوط به نانوذرات اکسید آهن است (Makarov *et al.*, 2014). جابجایی پیک سوپرناتانت تلقیح شده با نمک نسبت به محلول آبی نمک و نیز محلول محیط کشت و نمک؛ نشان دهنده تولید نانوذرات اکسید آهن است. در شرایط آزمایش انجام شده در این پژوهش، پیک شاخص در طول موج ۳۶۵ نانومتر مشاهده شد (شکل ۱). داده‌های حاصل از آنالیز DLS نیز نشان داد که سوسپانسیون حاصل، حاوی ذراتی با قطر متوسط ۷۲/۳ نانومتر، پراکندگی و توزیع مناسب است (شکل ۲ A). همچنین مشاهده گردید با افزایش pH سوپرناتانت پیش از تلقیح نمک به سوپرناتانت، قطر متوسط ذرات تولید شده تا ۵۰/۲ نانومتر کاهش می‌یابد (شکل ۲ B).

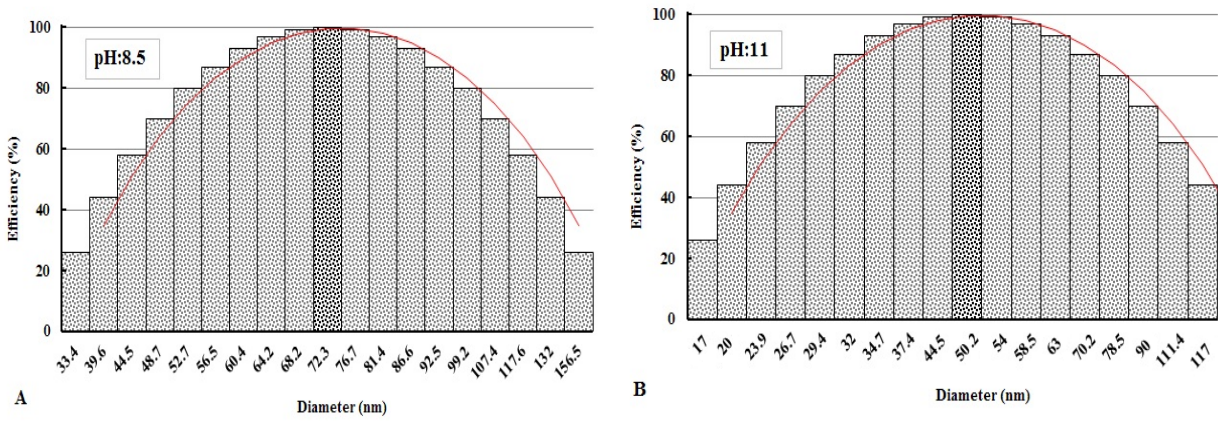
خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید آهن تولید شده به این روش می تواند به عنوان یک ویژگی ذاتی و بدون نیاز به اصلاح سطح، مطرح شده و ارزیابی گردد. بر اساس نتایج بدست آمده از بررسی فعالیت ضد میکروبی، مقدار MIC برای باکتری اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نانو ذره آهن به ترتیب ۱۲۵ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. نتایج تعیین مقدار MIC نشان داد که اشرشیاکلی نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس از حساسیت بیشتری برخوردار بوده است و نسبت به نانو ذرات تولید شده کمتر مقاومت دارد. مقدار ضریب حساسیت برای هر یک از باکتری‌ها و سوسپانسیون نانوذرات و برای هر بازه زمانی نمونه برداری محاسبه گردید. میانگین ضریب حساسیت باکتری‌ها نسبت به نانوذرات مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. همان‌گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است، مقدار ضریب حساسیت *S. aureus* برای نانوذره اکسید آهن با افزایش



شکل ۱- طیف جذبی UV-Vis نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن تولید شده به روش زیستی. **A.** طیف جذبی سوپرناتانت حاوی نانوذرات تولید شده (سوپرناتانت+ آهن (III) کلرید ۶ آبه). **B.** محلول آبی نمک آهن (محلول آهن (III) کلرید ۶ آبه). **C.** محلول نمک آهن در محیط کشت NB (محیط کشت NB+ آهن (III) کلرید ۶ آبه).

Fig. 1. UV-Vis absorption spectra of biosynthesized iron oxide MNPs. **A.** absorption spectra of supernatant containing produced NPs (Supernatant+$FeCl_3.6H_2O$). **B.** aqueous solution of iron salt ($FeCl_3.6H_2O$ solution). **C.** iron salt solution in nutrient broth medium (NB+$FeCl_3.6H_2O$).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.4.9]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.30]



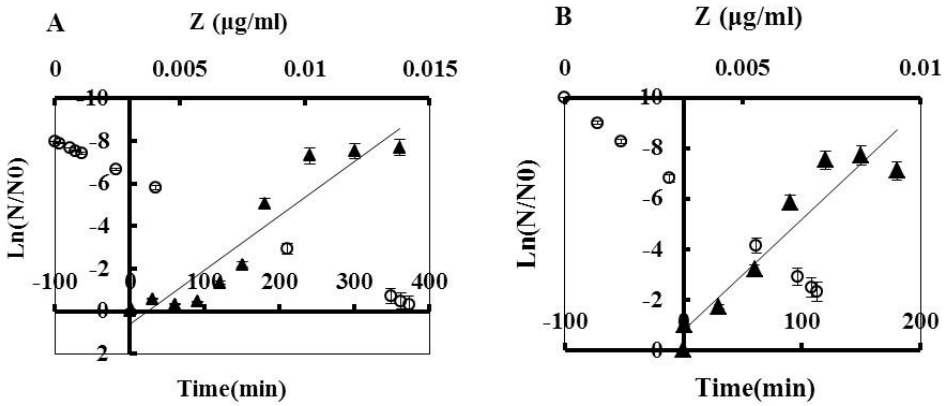
شکل ۲- نمودار توزیع اندازه نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن حاصل از تکنیک DLS. **A.** نانوذرات تولید شده در سوپرناتانت با pH طبیعی معادل ۸/۵ **B.** نانوذرات تولید شده در سوپرناتانت با pH قلیایی معادل ۱۱.

Fig. 2. Size distribution diagram of biosynthesized iron oxide NPs by DLS technique. **A.** Produced NPs in natural supernatant with pH equal to 8.5. **B.** Produced NPs in alkaline supernatant with pH equal to 11.

جدول ۱- میانگین مقادیر ضریب حساسیت‌های بدست آمده برای هر یک از باکتری ها در حضور نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن.

Table 1. The sensitivity coefficient mean values obtained for each of the bacteria in contact with iron oxide NPs.

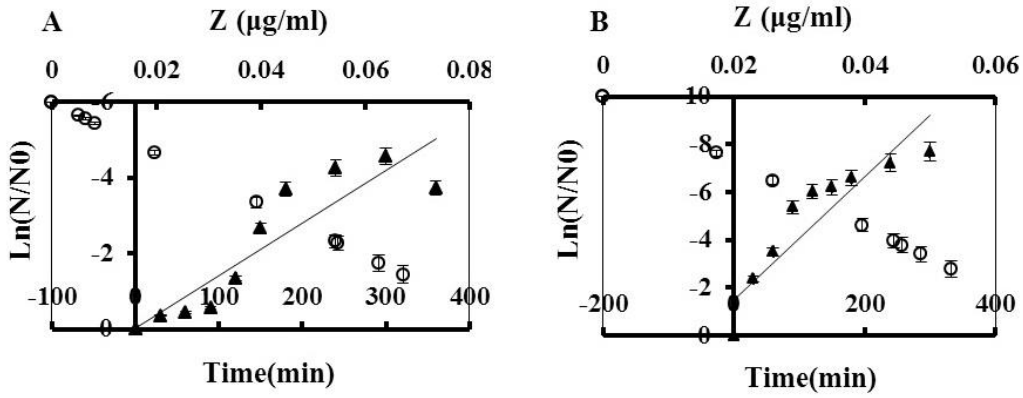
غلظت نانو ذره مغناطیسی اکسید آهن تولید شده / سویه باکتری	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*
یک برابر غلظت ممانعت کننده رشد (1xMIC) (µg/ml)	۰/۰۲۸	۰/۰۰۵۶
دو برابر غلظت ممانعت کننده رشد (2xMIC) (µg/ml)	۰/۰۳۳	۰/۰۰۳۹



شکل ۳- تغییرات سینتیک مرگ باکتری اشرشیاکلی و مقدار ضریب حساسیت آن. **A.** غلظت یک برابر مقدار MIC. **B.** غلظت دو برابر مقدار MIC (▲ نانوذره اکسید آهن-سینتیک، ○ نانوذره اکسید آهن- مقدار Z).

Fig. 3. The variation of *E. coli* mortality kinetics and its sensitivity coefficient. **A.** Concentration equal to the amount of MIC. **B.** Concentration twice the amount of MIC. (▲Iron oxide NP-kinetics, Iron oxide NP-Z value).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.4.9]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.30]



شکل ۴- تغییرات سینتیک مرگ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و مقدار ضریب حساسیت آن. **A.** غلظت یک برابر مقدار MIC . **B.** غلظت دو برابر مقدار MIC (▲ نانوذره اکسید آهن-سینتیک، ○ نانوذره اکسید آهن- مقدار Z).

Fig. 4. The variation of *S. aureus* mortality kinetics and its sensitivity coefficient. **A**. Concentration equal to the amount of MIC. **B**. Concentration twice the amount of MIC. (▲ Iron oxide NP-kinetics, ○ Iron oxide NP-Z value).

غلظت نانوذرات از یک برابر مقدار MIC به دو برابر MIC، افزایش یافته است ولی میانگین ضریب حساسیت محاسبه شده برای *E. coli* در برابر نانوذرات اکسید آهن با افزایش غلظت (از یک برابر مقدار MIC به دو برابر MIC)، کاهش نشان داده است. در گام بعدی تغییرات جمعیت باکتری‌های در تماس با سوسپانسیون نانو ذرات نسبت به زمان تماس آن‌ها و در نتیجه سینتیک مرگ آن‌ها محاسبه گردید. تغییرات جمعیت باکتری‌ها نسبت به زمان و نسبت به مقدار ضریب حساسیت (Z) در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است. نتایج بررسی سینتیک مرگ باکتری‌ها نشان داد نسبت بقا با افزایش غلظت نانوذرات در هر دو باکتری کاهش یافته است. با ترسیم حالت لگاریتمی نسبت بقای باکتری‌ها در مقابل زمان تماس، ملاحظه می-شود که جمعیت باکتری‌ها نسبت به زمان به طور خطی کاهش یافته است. از سوی دیگر همان‌طور که در شکل ۴ B مشاهده می شود، مقدار ضریب حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس با افزایش زمان تماس و مقدار نانوذره، افزایش نشان داده است.

نتایج بررسی سینتیکی نشان داد که با افزایش غلظت نانو ذرات، جمعیت باکتری‌ها کاهش می‌یابد. در غلظت یک برابر MIC رشد مجدد باکتری‌ها وجود داشت اما با افزایش غلظت به مقدار دو برابر MIC، پس از کاهش جمعیت باکتری‌ها، رشد مجدد آن‌ها وجود ندارد.

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش به وضوح نشان‌دهنده خصلت ضد باکتریایی قابل توجه در نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن تولید شده به این روش است. پژوهش‌های متنوعی پیرامون خصلت ضد میکروبی نانوذرات اکسید آهن و مکانیسم‌های پیشنهادی مرتبط با آن‌ها صورت گرفته است. Arakha و همکاران در دو پژوهش مجزا ضمن بررسی جامع مکانیسم ضد میکروبی نانوذرات اکسید آهن و اکسید مس روی دو سویه اشرشیا کلی و باسیلوس سوبتیلیس اظهار داشتند که وقتی نانوذرات درون محیط‌های کشت زیستی قرار می گیرند با سطوح زیستی متفاوتی روبرو می شوند؛ این سطوح زیستی ناشی از حضور اجزای مختلف و متنوع درون و برون سلولی از جمله DNA، پروتئین‌ها، لیپیدها، پلی ساکاریدها، فلاوونوئیدها و غیره است که هر یک ویژگی‌های منحصر به خود را دارد. بنابراین سرنوشت و عمل‌کرد یک نانوذره درون یک سیستم زیستی به خواص متعدد فیزیکوشیمیایی آن و متعاقباً میان‌کنش‌های ایجاد شده با سطوح زیستی بستگی دارد. نانوذرات به دلیل ابعاد بسیار کوچک، نسبت سطح به حجم بالایی دارند و این ویژگی منجر به تمرکز انرژی آزاد فراوان در سطح آن‌ها می شود. از آنجایی که نانوذرات با سطوح زیستی متعددی برخورد می کنند، در راستای کاهش این انرژی و رسیدن به پایداری بیشتر و با توجه به نیروهای الکترواستاتیک موجود در محیط های بیولوژیک، آن دسته از میان‌کنش‌هایی که در فاصله مناسب بتوانند بر سد انرژی نانوذره فائق آیند؛ باعث ایجاد جفت

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.4.9]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.30]

الکترون-حفره یا همان الکترون آزاد می شوند. الکترون آزاد درون سیستم‌های زیستی به تولید گونه‌های آزاد اکسیژن فعال (ROS) و در پی آن القای استرس اکسیداتیو می‌انجامد(Arakha *et al*., 2015).

از مجموع این مطالعه و سایر پژوهش‌ها می توان دریافت که در وهله اول نانوذرات با اندازه کوچک (عموماً کمتر از ۳۰ نانومتر) بواسطه نفوذ به درون غشای سلولی و ایجاد تداخل در فرایندهای غشایی منجر به مرگ باکتری می شوند. در مرتبه بعد نانوذرات بزرگ تر بر اساس میان‌کنش‌های الکترواستاتیک حاصل از پتانسیل زتای مثبت سطح نانوذره و بار سطحی منفی دیواره باکتری‌ها جذب شده، نفوذ به درون سلول و القای استرس اکسیداتیو (به روش‌های یاد شده) را باعث می شوند. نانوذرات تولید شده در این روش میانگین اندازه حدود ۷۲ نانومتر (در pH:۸/۵) و ۵۰/۲ نانومتر (در pH:۱۱) داشتند و بنابراین احتمال اثرگذاری از طریق مکانیسم دوم محتمل‌تر است. هرچند از آنجا که با کاهش اندازه نانوذرات از ۷۲ به ۵۰/۲ نانومتر خاصیت ضد باکتریایی افزایش یافت، به نظر می رسد احتمال مشارکت هر دو مکانیسم بسته به اندازه نانوذرات به طور نسبی وجود دارد. در هر صورت می توان گفت ایجاد استرس اکسیداتیو بر اثر تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد، حلقه نهایی تمام مکانیسم‌های پیشنهادی برای اثر ضد میکروبی نانوذرات فلزی است. ضمن اینکه حضور و عبور نانوذرات از غشای باکتری در غلظت‌های بالا از نظر فیزیکی نیز منجر به آسیب جدی و از بین رفتن یکپارچگی و پیوستگی غشا شده، نابودی میکروارگانیسم را به همراه خواهد داشت (Seil & Webster, 2012; Thukkaram *et al*., 2014). همچنین کاهش اندازه و در پی آن افزایش سطح مخصوص به عنوان عامل افزایش تعداد گروه‌های فعال بر روی سطح ذرات، به عنوان مهمترین فاکتورهای مؤثر بر افزایش سمیت نانو ذرات ذکر شده‌اند.

با در نظر گرفتن نتایج حاصل از این مطالعه مشاهده می شود؛ مرگ و میر باکتری‌ها در حضور نانوذرات تولید شده از سینتیک درجه اول تبعیت می نماید. با توجه به شکل‌های ۳ و ۴، با رسم نسبت لگاریتمی باکتری‌های زنده مانده و زمان مواجهه به عنوان محورهای عمودی و افقی در مقابل هم؛ مشاهده می گردد که جمعیت هر دو سویه باکتریایی به صورت خطی کاهش می‌یابد. هنگامیکه نسبت لگاریتمی زنده ماندن باکتری‌ها به زمان دارای شیب منفی باشد، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات از فعالیت ضد میکروبی قوی برخوردار هستند. بر اساس نتایج حاصل از جدول ۱، با افزایش غلظت نانو ذرات از یک برابر به دو برابر مقدار MIC، مقدار پارامتر Z کاهش نشان داده و می‌توان نتیجه گرفت احتمالا در غلظت‌های بالاتر سازگاری و مقاومت نسبت به نانوذرات ایجاد می گردد. این سازگاری می تواند بر اثر بروز مکانیسم‌های دفاعی مؤثر در مقاومت نسبت به غلظت‌های بالای نانوذرات فلزی، در برخی سویه‌ها از جمله باکتری‌های گرم منفی ایجاد گردد. ساختار و خواص فیزیکی لایه پلی ساکاریدی دیواره باکتری، برخی محصولات ژن‌هایی که روی پلاسمیدها قرار گرفته اند (و در جهت کاهش اثرات استرس اکسیداتیو ایجاد شده بر اثر نانوذرات فعالیت می کنند)، توانایی تثبیت و پایدار سازی غشای پلاسمایی و یا بیرون رانی نانوذرات از فضای داخلی؛ از جمله مکانیسم‌های دفاعی مطرح شده در این زمینه هستند (Hajipour *et al*., 2012). در مطالعه پیش رو خاصیت ضد باکتریایی نانو ذرات اکسید آهن علیه باکتری‌های استافیلو-کوکوس اورئوس و اشرشیاکلی بررسی شد و بر اساس نتایج آزمایش‌ها، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشرشیاکلی حساسیت بالاتری نسبت به نانو ذره مورد بررسی از خود نشان داد. علاوه بر این شیب منفی نسبت زنده ماندن هر دو سویه باکتری در مقابل زمان، بیانگر اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه نانوذرات تولید شده است. بنابراین با توجه به نیاز روز افزون به عوامل ضدباکتریایی جدید و قابلیت‌های زیاد نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن تولید شده به روش زیستی، می توان در آینده ای نزدیک از این روش ساده و ارزان به عنوان یکی از منابع تأمین نانوذرات دارای خاصیت ضد باکتریایی با کاربرد وسیع بهره برد. با این حال بهره بردای کامل از نانوذرات تولید شده طی این پژوهش نیازمند مطالعات آزمایشگاهی بیشتر حول موضوعات پایدارسازی، اصلاح سطح، پوشش دار کردن و همچنین بررسی میزان سمیت این نانوذرات بر روی سلول‌ها و بافت‌های انسانی خواهد بود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی است. نگارندگان از دانشگاه حکیم سبزواری بخاطر فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی در انجام این تحقیق قدردانی کنند.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.4.9]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.30]

REFERENCES

Arakha, M., Pal, S., Samantarrai, D., Panigrahi, T.K., Mallick, B.C., Pramanik, K., Mallick, B. and Jha, S. 2015. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanopar-ticle-bacteria interface. – Sci. Rep. 5: 1-12.

Bhabra, G., Sood, A., Fisher, B., Cartwright, L., Saunders, M., Evans, W.H., Surprenant, A., Lopez-Castejon, G., Mann, S., Davis, S.A., Hails, L.A., Ingham, E., Verkade, P., Lane, J., Heesom, K., Newson, R. and Case, C.P. 2009. Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. – Nat. Nanotechnol. 4: 876-883.

Bharde, A., Rautaray, D., Bansal, V., Ahmad, A., Sarkar, I., Yusuf , S.M., Sanyal, M. and Sastry, M. 2006. Extracellular biosynthesis of magnetite using fungi. – Small. 2: 135-141.

Bharde, A., Wani, A., Shouche, Y., Joy, P.A., Prasad, B.L.V. and Sastry, M. 2005. Bacterial aerobic synthesis of nanocrystalline magnetite. – J. Am. Chem. Soc. 127: 9326-9327.

Brar, S. K. and Verma, M. 2011. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. – Trends Anal. Chem. 30: 4-17.

Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., Aberasturi, D.J. De, Larramendi I.R. De, Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W.J. and Mahmoudi, M. 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. – Trends Biotechnol. 30: 499-511.

Hulkoti, N.I. and Taranath, T.C. 2014. Biosynthesis of nanoparticles using microbes- a review. – Colloids Surf. B Biointerfaces 121: 474-83.

Ismail, R. A., Sulaiman, G.M., Abdulrahman, S. A. and Marzoog, T.R. 2015. Antibacterial activity of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized by laser ablation in liquid. – Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 53: 286-297.

LIoyd, J.R., Byrne, J.M. and Coker, V.S. 2011. Biotechnological synthesis of functional nanom-aterials. – Curr. Opin. Biotechnol. 22: 509-515.

Makarov, V.V., Makarova, S.S., Love, A.J., Sinit-syna, O.V., Dudnik, A.O., Yaminsky, I.V., Taliansky, M.E. and Kalinina, N.O. 2014. Biosynthesis of stable iron oxide nanoparticles in aqueous extracts of *Hordeum vulgare* and *Rumex acetosa* Plants. – Langmuir. 30: 5982-5988.

Nasrollahi, Y.K., Kim, B.H. and Jung, G. 2009. Antifungal activity of silver nanoparticles on some fungi. – Plant Dis. 93: 1037-1043.

Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M. V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V. and Thompson, M. 2009. Understanding biop-hysicochemical interactions at the nano-bio interface. – Nat. Mater. 8: 543-557.

Panáček, A., Kolář, M., Večeřová, R., Prucek, R., Soukupová, J., Kryštof, V., Hamal, P., Zbořil, R. and Kvítek, L. 2009. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. – Biomat-erials. 30: 6333-6340.

Seil, J.T. and Webster, T.J. 2012. Antimicrobia applications of nanotechnology: methods and literature. – Int. J. Nanomedicine. 7: 2767-2781.

Stoimenov, P.K., Klinger, R.L., Marchin, G.L. and Klabunde, K.J. 2002. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. pdf. – Langmuir. pp 6679-6686.

Thukkaram, M., Sitaram, S., Kannaiyan, S.K. and Subbiahdoss, G. 2014. Antibacterial efficacy of iron-oxide nanoparticles against biofilms on different biomaterial surfaces. – Int. J. Biomater. 2014:1-6.

Tran, N., Mir, A., Mallik, D., Sinha, A., Nayar, S. and Webster, T.J. 2010. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on Staphylococcus aureus. – Int. J. Nanomedicine 5: 277-283.

Yoon, K.Y., Byeon, J.H., Park, J.H. and Hwang, J. 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanopar-ticles. – Sci. Total Environ. 373: 572-575.

*****

How to cite this article:

Fatemi, M., Mollania, N., Momeni-Moghaddam, M. and Sadeghifar, F. 2019. The anti-bacterial effects of magnetic iron oxide nanoparticles produced by biological method and the kinetic study of mortality of common strains in clinical infections. – Nova Biol. Reperta 6: 30-38.

فاطمی، م.، ملانیا، ن.، مومنی‌مقدم، م. و صادقی‌فر، ف. ۱۳۹۸. اثرات ضدباکتریایی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن زیستی و بررسی سینتیک مرگ و میر سویه‌های شایع در عفونت های بالینی. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۳۰-۳۸.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.4.9]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.30]