



## Original Research Paper

## The antibacterial effect of iron oxide and graphene oxide nanoparticles and their nanocomposites against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria

Farkhondeh Rezaii\*

Agriculture Department, Payame Noor University, Iran

### Key Words

Nanoparticles  
Nanocomposite  
Iron Oxide  
Graphene Oxide  
Antibacterial

### Abstract

**Introduction:** Excessive use of antibiotics in the livestock and poultry industry has led to antibiotic resistance in livestock and humans. The use of metal Nano-oxides and nanocomposites has been considered as a new strategy to combat infectious diseases. In this study, the antibacterial activity of iron oxide and graphene oxide nanoparticles and their nanocomposites were investigated.

**Materials & Methods:** For this purpose, antibacterial activity of iron oxide (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; F), Graphene oxide (GO), 0.018g reduced graphene oxide-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanocomposite (FG<sub>1</sub>), 0.036g reduced graphene oxide-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanocomposite (FG<sub>2</sub>), 0.072g reduced graphene oxide-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanocomposite (FG<sub>3</sub>) against Gram-negative (*Escherichia coli*; *E. coli*) and Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) bacteria was screened. The antibacterial activity of the five different nanoparticles was assessed by minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and the time-kill assay methods.

**Result:** The antibacterial results showed that except for FG<sub>1</sub>, for the rest of the nanoparticles MIC were 60 µL/mL for *E. coli* and 50 µL/mL for *S. aureus*. Moreover, the time-kill assay revealed that the growth of both bacteria was inhibited from the 2nd hour onwards for all nanoparticles.

**Conclusion:** In general, the results of this study showed that iron oxide and graphene oxide nanocomposites increase their antibacterial effect.

\* Corresponding Author's email: [frezaii@pnu.ac.ir](mailto:frezaii@pnu.ac.ir)

## مقاله پژوهشی

## بررسی اثر آنتی باکتریال نانوذرات اکسید آهن و اکسید گرافن و نانوکامپوزیت های آنان علیه باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس

فرخنده رضائی\*

بخش کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

## کلمات کلیدی

نانوذرات  
نانوکامپوزیت  
اکسید آهن  
اکسید گرافن  
آنتی باکتریال

## چکیده

**مقدمه:** استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک ها در صنعت دام و طیور سبب ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در دام و انسان شده است. استفاده از نانواکسیدهای فلزی و نانوکامپوزیت ها به عنوان راهکار جدید مقابله با بیماری های عفونی مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش فعالیت ضدباکتری نانوذرات اکسید آهن، اکسید گرافن و نانوکامپوزیت های این دو ماده مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** برای این منظور از نانوذرات اکسید آهن (F)، اکسید گرافن (GO)، نانوکامپوزیت های ۰/۰۱۸ گرم اکسید گرافن کاهش یافته با اکسید آهن (FG<sub>1</sub>)، ۰/۰۳۶ گرم اکسید گرافن کاهش یافته با اکسید آهن (FG<sub>2</sub>) و ۰/۰۷۲ گرم اکسید گرافن کاهش یافته با اکسید آهن (FG<sub>3</sub>) در برابر باکتری های گرم منفی اشرشیا کلی و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد. فعالیت ضدباکتریایی پنج نانوذره مختلف با روش های حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC: Minimum Inhibitory Concentration)، حداقل غلظت کشندگی (MBC: Minimum Bactericidal Concentration) و روش سنجش زمان کشتن (time-kill assay) بررسی شد.

**نتایج:** نتایج ضدباکتریایی نشان داد که به جز FG<sub>1</sub>، برای بقیه نانوذرات MIC ۶۰ میکرولیتر در میلی لیتر برای اشرشیا کلی و ۵۰ میکرولیتر در میلی لیتر برای استافیلوکوکوس اورئوس بود. علاوه بر این، سنجش زمان کشتن نشان داد که رشد هر دو باکتری از ساعت ۲ به بعد برای همه نانوذرات مهار می شود.

**نتیجه گیری و بحث:** به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که نانوکامپوزیت اکسید آهن و اکسید گرافن اثر آنتی باکتریایی آن ها را تقویت می کند.

\* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: frezaii@pnu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۷ فروردین ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۲۸ اردیبهشت ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۲۳ تیر ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۲۸ مرداد ۱۳۹۹

(DOI): 10.22034/aej.2021.139029

## مقدمه

مکانیکی عالی و هزینه کم تولید به عنوان ماده نانو همه کاره و نوید دهنده محسوب می شود. علاوه بر این، مشخص شده است که اکسید گرافن فعالیت ضدباکتریایی خوبی در برابر انواع باکتری های بیماری زا دارد (Bora و همکاران، ۲۰۱۳؛ Liu و همکاران، ۲۰۱۱؛ Matharu و همکاران، ۲۰۲۰). علاوه بر اثرات آنتی باکتریال نانوذرات اکسیدهای فلزی، در سال های اخیر اثرات آنتی باکتریال نانوکامپوزیت های مختلف آهن نیز مورد بررسی قرار گرفته است. نانوکامپوزیت ها به دلیل اثر آنتی باکتریال قوی در غلظت بسیار کم می توانند در مبارزه با پاتوژن های باکتریایی مورد استفاده قرار گیرند (Bhushan و همکاران، ۲۰۱۸؛ Jiang و همکاران، ۲۰۱۶؛ Somaraj و همکاران، ۲۰۱۷). مکانیسم های مختلفی برای اثر آنتی باکتریال نانوذرات مختلف فلزی شناسایی شده است. معمولاً اثر آنتی باکتریال نانومواد به عوامل مختلفی مانند خصوصیات کاتالیزوری، فوتوکتیو، نوری و حرارتی منحصر به فرد آن ها و همچنین اندازه ذرات و مورفولوژی آن ها نسبت داده می شود (Brayner و همکاران، ۲۰۱۰؛ Zhang و همکاران، ۲۰۱۰). هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر آنتی باکتریال اکسید آهن، اکسید گرافن و کامپوزیت های آن ها علیه باکتری های گرم منفی / اشرشیا کلی و گرم مثبت / استافیلوکوکوس اورئوس بود.

## مواد و روش ها

در این آزمایش اثر آنتی باکتریال نانوذرات اکسید آهن و کامپوزیت های گرافن آن بر باکتری گرم منفی / اشرشیا کلی (به شماره ATCC25922) و گرم مثبت / استافیلوکوکوس اورئوس (به شماره PTCC1112) مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات مورد استفاده از دانشکده فیزیک دانشگاه صنعتی شاهرود تهیه شد و شامل اکسید آهن (F)، اکسید گرافن (GO)، نانوکامپوزیت های ۰/۱۸ گرم اکسید گرافن کاهش یافته با اکسید آهن (FG<sub>1</sub>)، ۰/۳۶ گرم اکسید گرافن کاهش یافته با اکسید آهن (FG<sub>2</sub>) و ۰/۷۲ گرم اکسید گرافن کاهش یافته با اکسید آهن (FG<sub>3</sub>) بود. به منظور فعال سازی باکتری ها ابتدا سوبیه های خریداری شده به محیط کشت BHI (Brain Heart Infusion) منتقل شد و حدود ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و احیا شد و سپس در محیط بلاه آگار برای اثبات اخلاص کلنی کشت داده شد (صفرقلی تبار و همکاران، ۱۳۹۲). برای بررسی اثر آنتی باکتریال نانوذرات اکسید آهن و نانوکامپوزیت آن از سه روش آنتی باکتریال MIC، MBC و Time kill استفاده شد.

**حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC):** غلظت های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر از هر نانوذره با دی متیل سولفوکسید (DMSO) آماده شد و با ۴۵۰ میکرولیتر نوترینت براس و ۵۰ میکرولیتر باکتری تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون شد (Ravikumar و همکاران، ۲۰۱۱).

ترکیباتی که ویژگی آنتی باکتریال دارند سبب می شوند که رشد باکتری محدود شود یا این که به طور کامل باکتری را از بین می برند، اما به سلول ها و بافت های اطراف آسیبی نمی رسانند. آنتی بیوتیک هایی مانند پنی سیلین و سفالوسپورین که به طور معمول برای مبارزه با بیماری های مسری انتخاب می شوند دارای مواد آلی با وزن مولکولی کم هستند، اما در حال حاضر استفاده گسترده و سوء استفاده از آنتی بیوتیک ها سبب ظهور مقاومت باکتریایی شده است (Huh و همکاران، ۲۰۱۱؛ Moritz و همکاران، ۲۰۱۳؛ Zhang و همکاران، ۲۰۱۱). بنابراین روش های جدید برای مبارزه با باکتری های پاتوژن مورد نیاز است تا توانایی محدود کردن رشد باکتری های بیماری زا را داشته باشد (Blecher و همکاران، ۲۰۱۱). به همین دلیل شرکت های داروسازی و پژوهشگران به دنبال یافتن داروهای جدید ضدباکتری هستند. از بین تمام راهکارهای جدید، استفاده از مواد نانو به عنوان امیدوارکننده ترین جایگزین آنتی بیوتیک های سنتی با مسیرهای عمل متفاوت در حال گسترش است. مهم ترین مزیت استفاده از داروهای ضدباکتریایی معدنی نسبت به مواد آلی که به طور سنتی مورد استفاده قرار می گیرند، پایداری بیش تر آن ها در دما و فشار بالا بدون از بین رفتن خاصیت دارویی است (Chipara و همکاران، ۲۰۱۵). برای این کاربرد می توان از اشکال مختلف نانومواد معدنی مانند پودر، روکش ترکیبی آلی معدنی و غیره استفاده کرد. نانو مواد در خنثی کردن طیف گسترده ای از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی کاملاً موفق عمل کرده اند و اخیراً علاقه زیادی به ساخت نانوذرات اکسیدهای فلزی و عملکرد آنتی باکتریال آن ها به وجود آمده است که باکتری ها هنوز در مقابل آن ها مقاومت ندارند. یکی از نانو موادی که به دلیل فعالیت های بی نظیر ضدقارچی و ضدباکتریایی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است اکسید آهن، هماتیت با  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  است. هماتیت یک ماده پایدار، زیست سازگار و غیرسمی است که خواص آن به شدت تحت تأثیر مورفولوژی، اندازه کریستالی و بلوریت مواد قرار دارد (Bhushan و همکاران، ۲۰۱۸؛ Hassan و همکاران، ۲۰۱۵؛ Rufus و همکاران، ۲۰۱۷؛ Somaraj و همکاران، ۲۰۱۷). اثر آنتی باکتریال نانو اکسید آهن در برابر باکتری های گرم منفی / اشرشیا کلی و گرم مثبت / استافیلوکوکوس اورئوس توسط مطالعات بررسی و تأیید شده است (Bhushan و همکاران، ۲۰۱۸؛ Hassan و همکاران، ۲۰۱۵؛ Khan و همکاران، ۲۰۲۰؛ Rufus و همکاران، ۲۰۱۷؛ Sharma و همکاران، ۲۰۲۰). اکسید گرافن یک ورق گرافن با گروه های کربوکسیلیک در لبه های آن و گروه فنل هیدروکسیل و اپوکسید در صفحه اصلی خود است. اکسید گرافن را می توان به صورت شیمیایی از اکسید گرافیت استخراج کرد. اخیراً، گرافن به دلیل هدایت الکتریکی و حرارتی فوق العاده بالا، استحکام

میلی لیتر با استفاده از MIC و MBC در برابر هر دو سویه مورد آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج MIC نشان داد که به جز نانوذره FG<sub>1</sub> (که هیچ اثر مهاری در غلظت‌های مورد استفاده در این مطالعه نشان نداد)، بقیه نانوذرات (F, GO, FG<sub>2</sub> و FG<sub>3</sub>) اثر مهاری در برابر اشرشیا کلی در غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر داشتند.

جدول ۱: حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات اکسید آهن و نانوکامپوزیت اکسید آهن- گرافن در برابر اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس

نانوذرات <sup>۱</sup>	استافیلوکوکوس اورئوس		اشرشیا کلی	
	غلظت <sup>۲</sup> (میکروگرم بر میلی لیتر)			
	MIC	MBC	MIC	MBC
F	-	-	۵۰	۶۰
GO	-	-	۵۰	۶۰
FG <sub>1</sub>	-	-	-	-
FG <sub>2</sub>	-	-	۵۰	۶۰
FG <sub>3</sub>	-	-	۵۰	۶۰

<sup>۱</sup> = هماتیت، G = اکسید گرافن، FG<sub>1</sub> = کامپوزیت هماتیت-اکسیدگرافن کاهش یافته (۰/۰۱۸ گرم)، FG<sub>2</sub> = کامپوزیت هماتیت-اکسیدگرافن کاهش یافته (۰/۰۳۶ گرم)، FG<sub>3</sub> = کامپوزیت هماتیت-اکسیدگرافن کاهش یافته (۰/۰۷۲ گرم).  
<sup>۲</sup> = اثری مشاهده نشد.

**بررسی زمان کشتن:** با توجه به معنی‌دار شدن آزمون موخلی و عدم قبول فرض کرویت، نتایج آزمون گرین هوس-گیسر نشان داد که اینترکشن بین زمان و نوع نانوذره برای هر دو باکتری معنی‌دار است (p < ۰/۰۰۱). به بیان دیگر، تفاوت معنی‌داری بین میانگین چگالی نوری (OD: Optical Density) در گروه‌های مختلف نانومواد مورد آزمایش در طول زمان وجود دارد.

**میانگین OD باکتری اشرشیا کلی:** اثر آنتی‌باکتریال نانوذرات مختلف مورد آزمایش بر میانگین OD باکتری اشرشیا کلی در هر زمان در شکل ۱ ارایه شده است. نتایج نشان داد که در ساعت ۱ و ۳ میانگین OD در گروه‌های F, GO, FG<sub>1</sub> و FG<sub>3</sub> به طور معنی‌داری نسبت به میانگین OD گروه شاهد کم‌تر بود. در زمان‌های ۲، ۴ و ۵ ساعت پس از کشت نیز تمامی گروه‌های نانو نسبت به شاهد از OD کم‌تری برخوردار بودند (p < ۰/۰۰۱). اما بین میانگین OD در انواع مختلف نانواکسید آهن و کامپوزیت‌های آن تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در زمان ۳ علاوه بر تفاوت گروه‌های مورد مطالعه با گروه شاهد، نانو اکسید آهن به طور معنی‌داری سبب کاهش OD در مقایسه با سایر نانوکامپوزیت‌ها شد (p < ۰/۰۰۱).

MIC کم‌ترین غلظت نانوذره‌ای بود که براساس کدورت اجازه رشد هیچ باکتری را در ۲۴ ساعت نداد.

**حداقل غلظت کشندگی (MBC):** به منظور تشخیص قدرت کشندگی نانوذرات اکسید آهن، اکسید گرافن و نانوکامپوزیت‌های آنان علیه باکتری‌های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس، MBC با سری رقت‌های مورد استفاده در MIC اندازه‌گیری شد و کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در پلیت‌های حاوی آگار با استفاده از لوپ ۰/۰۱ به مدت ۲۴ ساعت انجام شد (Ravikumar و همکاران، ۲۰۱۱). کم‌ترین غلظتی که از رشد کلنی‌های باکتری در این محیط جامد پیشگیری کرد به عنوان MBC مد نظر قرار گرفت.

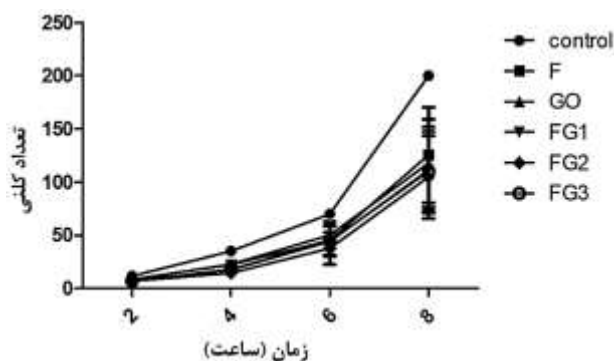
**روش بررسی زمان کشتن (Time-Kill test):** غلظتی از نانو ذرات که بالاترین پتانسیل ضدباکتریایی را در برابر اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس (۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر) داشتند در معرض سنجش زمان کشتن نیز قرار گرفتند. برای تهیه محیط کشت گروه تست ۱ میلی لیتر از محلول باکتری با غلظت ۱۰<sup>۲</sup> × ۱/۵ cells/mL به ۹ میلی لیتر از محیط کشت TSB (Tryptic Soy Broth) که حاوی ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوذرات F, GO, FG<sub>1</sub>, FG<sub>2</sub> و FG<sub>3</sub> بود اضافه شد. درب ظروف حاوی محیط‌های کشت گروه آزمایشی (باکتری + نانوذرات) و گروه شاهد (فاقد نانوذرات) با رعایت شرایط استریل پوشانده شده و به صورت هوازی در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت پس از کشت جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Biotech-novaapec-England) اندازه‌گیری شد. مقادیر معادل ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از لوله‌های کشت گرفته شده و در پلیت‌های حاوی آگار مولر هینتون در فاصله زمانی ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت منتقل شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و در پایان تعداد کلنی‌ها شمارش شد (سیدالحسینی و همکاران، ۱۳۹۹).

**آنالیز آماری:** داده‌ها با استفاده از نسخه ۲۱ نرم‌افزار IBM SPSS Statistic آنالیز شدند. اثر متقابل زمان و نوع نانومواد با استفاده از آزمون repeated measure دو متغیره آنالیز واریانس بررسی شد. در صورتی که آزمون موخلی برای فرض کرویت معنی‌دار بود، از تصحیح گرین هوس-گیسر برای درجه آزادی استفاده شد. مقدار p < ۰/۰۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه ۵) ترسیم شدند.

## نتایج

MIC و MBC: نتایج اثر ضدباکتریایی نانوذرات F, GO, FG<sub>1</sub>, FG<sub>2</sub> و FG<sub>3</sub> در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکروگرم بر

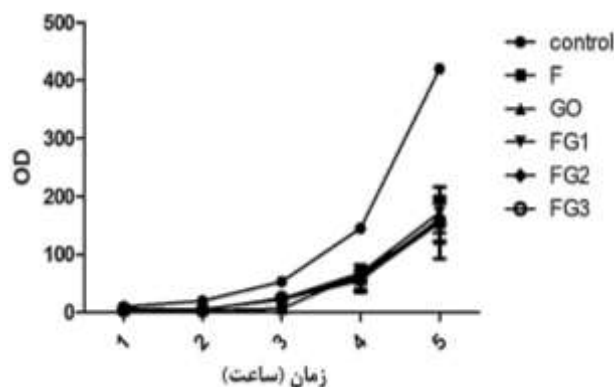
تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $p < 0.001$ ). استفاده از ترکیبات GO، FG<sub>1</sub>، FG<sub>2</sub> و FG<sub>3</sub> سبب کاهش معنی‌دار میانگین OD باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با گروه شاهد F شد. در زمان ۲ ساعت پس از کشت بین میانگین OD گروه شاهد و همه گروه‌های مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $p < 0.001$ ) و همه گروه‌های نانومواد سبب کاهش معنی‌دار OD شدند. در این زمان اختلاف تیمار F با سایر نانوکامپوزیت‌ها (GO، FG<sub>1</sub>، FG<sub>2</sub> و FG<sub>3</sub>) معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). در زمان ۳ ساعت پس از کشت بین میانگین تعداد OD گروه شاهد و همه گروه‌های حاوی نانومواد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $p < 0.001$ ). همه گروه‌های نانومواد سبب کاهش معنی‌دار OD شدند. در این زمان اختلاف تیمار F با نانوکامپوزیت‌های (GO، FG<sub>1</sub> و FG<sub>3</sub>) معنی‌دار بود ( $p < 0.001$ ) و در مقایسه با FG<sub>2</sub> جذب را به‌طور معنی‌داری بیش‌تر کاهش داد. در زمان ۴ ساعت پس از کشت به‌جز تفاوت گروه GO - FG<sub>1</sub> و FG<sub>2</sub> - FG<sub>3</sub> همه اثرات معنی‌دار بودند ( $p < 0.05$ ) به‌طوری‌که در این زمان علاوه بر این‌که استفاده از ترکیبات نانو همگی سبب کاهش بسیار معنی‌دار OD باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شدند ( $p < 0.001$ ).



شکل ۲: تأثیر آنتی‌باکتریال نانوذرات اکسید آهن و کامپوزیت اکسید آهن - گرافن بر تعداد کلنی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

F=هماتیت، G=اکسیدگرافن، FG<sub>1</sub>=کامپوزیت هماتیت-اکسیدگرافن کاهش یافته (۰/۱۸ گرم)، FG<sub>2</sub>=کامپوزیت هماتیت-اکسیدگرافن کاهش یافته (۰/۳۶ گرم)، FG<sub>3</sub>=کامپوزیت هماتیت-اکسیدگرافن کاهش یافته (۰/۷۲ گرم)

اختلاف بین نانو اکسید آهن و کامپوزیت‌های گرافن آن نیز معنی‌دار بود و نانو کاپوزیت‌های آهن در مقایسه با نانو اکسید آهن اثر آنتی‌باکتریال قوی‌تری نشان دادند. در زمان ۵ ساعت پس از کشت بین میانگین تعداد OD گروه شاهد و همه گروه‌های حاوی نانومواد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $p < 0.001$ ). در این زمان بین انواع مختلف نانومواد مورد استفاده نیز اختلاف‌ها معنی‌دار بود به‌طوری‌که نانو کاپوزیت‌های آهن در مقایسه با نانو اکسید آهن اثر آنتی‌باکتریال قوی‌تری را نشان دادند و بهترین عملکرد آنتی‌باکتریال در این زمینه در مورد ماده FG<sub>1</sub> مشاهده شد و پس از آن به ترتیب GO و سپس FG<sub>2</sub> بهترین عملکرد آنتی‌باکتریال را نشان دادند.



شکل ۱: اثر آنتی‌باکتریال نانوذرات اکسید آهن و نانو کامپوزیت اکسید آهن - گرافن بر میانگین OD باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

F=هماتیت، G=اکسیدگرافن، FG<sub>1</sub>=کامپوزیت هماتیت-اکسیدگرافن کاهش یافته (۰/۱۸ گرم)، FG<sub>2</sub>=کامپوزیت هماتیت-اکسیدگرافن کاهش یافته (۰/۳۶ گرم)، FG<sub>3</sub>=کامپوزیت هماتیت-اکسیدگرافن کاهش یافته (۰/۷۲ گرم)

#### تعداد کلنی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*: با توجه به معنی‌دار شدن

آزمون موخلی و عدم قبول فرض کرویت نتایج آزمون گرین هوس-گیسر نشان داد که اینترکشن بین زمان و گروه معنی‌دار است ( $p < 0.001$ ).  $F(5/3 \text{ و } 31/9) = 5/5$ . یعنی بین میانگین تعداد کلنی *استافیلوکوکوس اورئوس* گروه‌های مختلف نانومواد مورد آزمایش در طول زمان تفاوت معنی‌داری وجود دارد. مقایسه میانگین تعداد کلنی *استافیلوکوکوس اورئوس* در گروه‌های مختلف در هر زمان در شکل ۲ نشان داده شده است. در زمان ۲ ساعت پس از کشت، گروه‌های FG<sub>1</sub>، FG<sub>2</sub> و FG<sub>3</sub> تعداد کلنی‌ها را در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش دادند ( $p < 0.05$ ), اما بین خود گروه‌های نانو تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در زمان ۴ ساعت پس از کشت، همه گروه‌های نانو در مقایسه با شاهد تعداد کلنی را به‌طور بسیار معنی‌داری کاهش دادند ( $p < 0.001$ ). بهترین عملکرد را در زمان ۴ ساعت گروه FG<sub>2</sub> نشان داد که تعداد کلنی‌های آن به‌طور معنی‌داری از گروه‌های GO و F نیز کم‌تر بود ( $p = 0.001$ ). در زمان ۶ و ۸ ساعت پس از کشت نیز همه گروه‌ها (به‌جز GO در زمان ۶ ساعت) سبب کاهش معنی‌دار تعداد کلنی‌ها در مقایسه با گروه شاهد شدند اما بین گروه‌های مختلف نانو تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

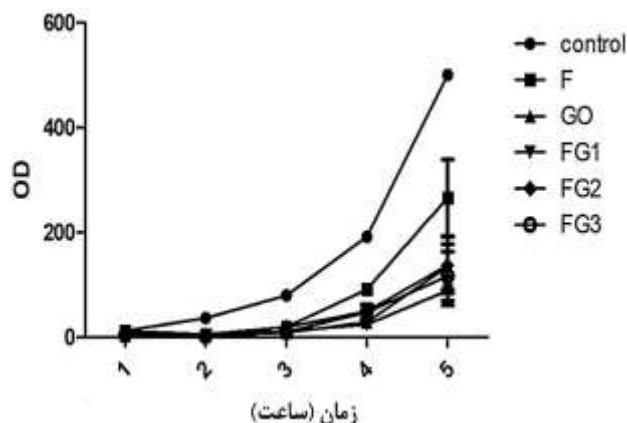
#### میانگین OD باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*: با توجه به

معنی‌دار شدن آزمون موخلی و عدم قبول فرض کرویت نتایج آزمون گرین هوس-گیسر نشان داد که اینترکشن بین زمان و گروه معنی‌دار است ( $p < 0.001$ ).  $F(5/2 \text{ و } 31/1) = 55/2$ . یعنی بین میانگین تعداد کلنی *استافیلوکوکوس اورئوس* گروه‌های مختلف نانومواد مورد آزمایش در طول زمان تفاوت معنی‌داری وجود دارد. مقایسه میانگین تعداد کلنی *استافیلوکوکوس اورئوس* در گروه‌های مختلف در هر زمان در شکل ۳ ارائه شده است. در زمان یک ساعت پس از کشت بین میانگین OD گروه شاهد و همه گروه‌های حاوی نانومواد (به‌جز نانو اکسید آهن)

از کشت نیز همه مواد نانو تمایل داشتند ( $p < 0.01$ ) که تعداد کلنی های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را در مقایسه با شاهد کاهش دهند. در زمان ۸ ساعت پس از کشت همه مواد مورد آزمایش تعداد کلنی های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را در مقایسه با شاهد به طور معنی داری کاهش دادند ( $p < 0.01$ ). اما بین نانومواد استفاده شده تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

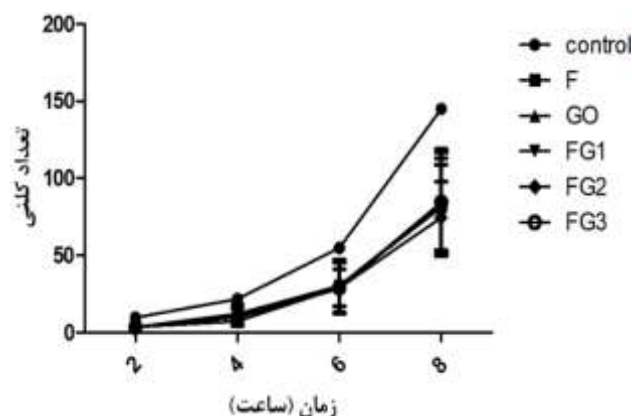
## بحث

نتایج آنتی باکتریال پژوهش حاضر نشان داد که تمام نانوذرات مورد استفاده در این آزمایش اثرات ضد/شرشیا کلی و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند. این یافته ها منطبق بر نتایج مطالعات مختلف دیگری است که نشان می دهند نانو اکسید فلزات و کامپوزیت های آن ها می توانند اثرات ضد باکتریایی داشته باشند. این نانوذرات بیش تر نانو اکسید فلزاتی مانند مگنتیت (Ravikumar و همکاران، ۲۰۱۱؛ Tran و همکاران، ۲۰۱۰)، هماتیت (Belkhedkar و همکاران، ۲۰۱۶؛ Hassan و همکاران، ۲۰۱۵؛ Mohamed و همکاران، ۲۰۱۵؛ Rufus و همکاران، ۲۰۱۷)، اکسید منیزیم (Azam و همکاران، ۲۰۱۲)، اکسید منیزیم (Ravikumar و همکاران، ۲۰۱۱؛ Gokulakrishnan و همکاران، ۲۰۱۲)، و اکسید مس (Azam و همکاران، ۲۰۱۲) و نانوکامپوزیت هایی مانند  $\text{GO-Fe}_2\text{O}_3$  (Geo و همکاران، ۲۰۱۳)، اکسید کیتوزان-گرافن مغناطیسی (Jiang و همکاران، ۲۰۱۶) (Magnetic chitosan-graphene oxide)،  $\text{chitosan}/\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (Somaraj و همکاران، ۲۰۱۷) و  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Co}_3\text{O}_4$  (Bhushan و همکاران، ۲۰۱۸) هستند. Sharma و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که نانوذرات اکسید آهن به عنوان یک ماده ضد باکتری عالی در برابر باکتری های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب با غلظت های ۸۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر عمل می کند. برخی مطالعات نشان داده اند که نانوکامپوزیت اکسید آهن با اکسید گرافن اثر آنتی باکتریایی آن ها را بیش تر می کند (Geo و همکاران، ۲۰۱۳). Bhushan و همکاران (۲۰۱۸) نیز مشاهده کردند که نانوکامپوزیت های آهن اثر آنتی باکتریال قوی تری نسبت به نانو اکسید آهن به تنهایی دارد که منطبق بر نتایج این پژوهش است که در بیش تر موارد نانوکامپوزیت های اکسید آهن و گرافن اثر آنتی باکتریال قوی تری نسبت به اکسید های فلزی به تنهایی نشان دادند. اثرات ضد باکتریایی نانو اکسید های فلزی به عواملی مانند اندازه ذرات (Yamamoto، ۲۰۰۱)، pH (Makhluf و همکاران، ۲۰۰۵)، غلظت اکسید فلزی (Zhang و همکاران، ۲۰۰۸)، و سطح نانوذرات (Li و همکاران، ۲۰۱۲) بستگی دارد. هم چنین اثر عواملی دیگری مانند تولید اکسیژن فعال نیز در مورد اثر آنتی باکتریال نانوذرات فلزها مشخص شده است (Bhushan و همکاران، ۲۰۱۸؛ Li و همکاران، ۲۰۱۲؛ Tran و همکاران، ۲۰۱۰).



شکل ۳: تأثیر آنتی باکتریال نانوذرات اکسید آهن و کامپوزیت اکسید آهن - گرافن بر میانگین OD باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

F=هماتیت، G=اکسید گرافن، FG1=کامپوزیت هماتیت-اکسید گرافن کاهش یافته (۰/۰۱۸)، FG2=کامپوزیت هماتیت-اکسید گرافن کاهش یافته (۰/۰۳۶ گرم)، FG3=کامپوزیت هماتیت-اکسید گرافن کاهش یافته (۰/۰۷۲ گرم)



شکل ۴: تأثیر آنتی باکتریال نانوذرات اکسید آهن و کامپوزیت اکسید آهن - گرافن بر تعداد کلنی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

F=هماتیت، G=اکسید گرافن، FG1=کامپوزیت هماتیت-اکسید گرافن کاهش یافته (۰/۰۱۸)، FG2=کامپوزیت هماتیت-اکسید گرافن کاهش یافته (۰/۰۳۶ گرم)، FG3=کامپوزیت هماتیت-اکسید گرافن کاهش یافته (۰/۰۷۲ گرم)

## تعداد کلنی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*: با توجه به

معنی دار شدن آزمون موخلی و عدم قبول فرض کرویت نتایج آزمون گرین هوس - گیسر نشان داد که اینترکشن بین زمان و گروه معنی دار است ( $p < 0.001$ ). یعنی بین میانگین تعداد کلنی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گروه های مختلف نانومواد مورد آزمایش در طول زمان تفاوت معنی داری وجود دارد. مقایسه میانگین تعداد کلنی *اشرشیا کلی* در گروه های مختلف در هر زمان در جدول ۴ ارائه شده است. در زمان های ۲ و ۴ ساعت پس از کشت همه مواد نانو تعداد کلنی های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را در مقایسه با شاهد به طور بسیار معنی داری کاهش دادند ( $p < 0.001$ ), اما بین نانومواد استفاده شده تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در زمان ۶ ساعت پس

مقاومت و جذب فلزات سنگین نیکل و وانادیوم در باکتری‌های جداسازی شده از سواحل جزیره خارک به‌منظور پاکسازی زیستی فلزات. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۵، شماره ۴، صفحات ۳۷ تا ۴۸.

3. **Azam, A.; Ahmed, A.S.; Oves, M.; Khan, M.S.; Habib, S.S. and Memic, A., 2012.** Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International journal of nanomedicine*. Vol. 7, pp: 6003.
4. **Belkhedkar, M.; Ubale, A.; Sakhare, Y.; Zubair, N. and Musaddique, M., 2016.** Characterization and antibacterial activity of nanocrystalline Mn doped Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> thin films grown by successive ionic layer adsorption and reaction method. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*. Vol. 21, pp: 38-44.
5. **Bhushan, M.; Kumar, Y.; Periyasamy, L. and Viswanath, A.K., 2018.** Antibacterial applications of  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites and study of their structural, optical, magnetic and cytotoxic characteristics. *Applied Nanoscience*. Vol. 8, pp: 137-53.
6. **Blecher, K.; Nasir, A. and Friedman, A., 2011.** The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. Vol. 2, pp: 395-401.
7. **Bora, C.; Bharali, P.; Baglari, S.; Dolui, S.K. and Konwar, B.K. 2013.** Strong and conductive reduced graphene oxide/polyester resin composite films with improved mechanical strength, thermal stability and its antibacterial activity. *Composites Science and Technology*. Vol. 87, pp: 1-7.
8. **Brayner, R.; Dahoumane, S.A.; Yepremian, C.; Djediat, C.; Meyer, M.; Coute, A. and Fievet, F., 2010.** ZnO nanoparticles: synthesis, characterization, and ecotoxicological studies. *Langmuir*. Vol. 26, pp: 6522-6528.
9. **Burello, E. and Worth, A.P., 2011.** A theoretical framework for predicting the oxidative stress potential of oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. Vol. 5, pp: 228-235.

به‌طور کلی نشان داده شده که در محیط آبی درون سلول باکتریایی، نانوذرات اکسیدهای فلزی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS: Reactive oxygen species) را تولید می‌کنند. ROS مولکول‌های کوچک، ناپایدار و بسیار واکنش‌پذیری هستند که می‌توانند پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA را اکسید کنند. ROS به‌وسیله احیاء ناقص یک الکترون اکسیژن تشکیل می‌شوند و شامل آنیون‌های اکسیژن، رادیکال‌های آزاد از جمله سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسیدها مانند پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) می‌شوند. تصور می‌شود که تولید ROS ناشی از استرس اکسیداتیو (استرس اکسیداتیو زمانی ایجاد می‌شود که بین تظاهرات سیستماتیک گونه‌های فعال یا واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) و توانایی یک سیستم زیستی در خنثی کردن و مهار میانجی‌های سمی آن یا ترمیم آسیب‌های وارده عدم تعادل به‌وجود بیاید، به‌عبارت دیگر میزان تولید ROS از میزان خنثی شدن آن بیش‌تر باشد) که در اثر استفاده از نانوذرات ایجاد می‌شود، مکانیسم اصلی اثر ضدباکتریایی آن‌ها باشد (Burello و همکاران، ۲۰۱۱؛ Xia و همکاران، ۲۰۰۸). ROS می‌تواند تقریباً به تمام مولکول‌های آلی زیستی از جمله کربوهیدرات‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها، آسیب برساند. آن‌ها هم‌چنین با مواد ژنتیکی باکتریایی ارتباط برقرار کرده و تکثیر و رونویسی DNA و سنتز پروتئین را مختل می‌کنند که منجر به مرگ باکتری‌ها می‌شود (Li و همکاران، ۲۰۱۲). در این پژوهش خواص ضد باکتریایی مؤثر نانوذرات اکسید آهن، اکسید گرافن و نانوکامپوزیت‌های آن‌ها در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تأیید شد. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد که نانوکامپوزیت اکسید آهن و اکسید گرافن اثر آنتی‌باکتریایی آن‌ها را تقویت می‌کند. بنابراین، می‌توان آن‌ها را به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های قدرتمند نسل جدید برای مقابله با بیماری‌های مسری ناشی از باکتری‌ها مورد استفاده قرار داد.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشکده فیزیک دانشگاه صنعتی شاهرود برای تهیه نانو مواد و نانوکامپوزیت‌ها و همکاری صمیمانه در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

۱. سیدالحسینی، ه.؛ یحیوی، م. و یزدان‌پناه‌گوهرریزی، ل.، ۱۳۹۹. تأثیر اسانس‌های آویشن، زیره، دارچین و سیر بر باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس اینیایی در محیط برون‌تنی. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۱۲، شماره ۲، صفحات ۲۷۵ تا ۲۸۲.
۲. صفرقلی تبار مرزونی، س.؛ امتیازجو، م.؛ تاج‌آبادی‌ابراهیمی، م.؛ گرجیان‌عربی، م.ح. و مظهر، ف.، ۱۳۹۲. بررسی الگوی

19. **Makhluf, S.; Dror, R.; Nitzan, Y.; Abramovich, Y.; Jelinek, R. and Gedanken, A., 2005.** Microwave-assisted synthesis of nanocrystalline MgO and its use as a bactericide. *Advanced Functional Materials*. Vol. 15, pp: 1708-1715.
20. **Matharu, R.K.; Tabish, T.A.; Trakoolwilaiwan, T.; Mansfield, J.; Moger, J.; Wu, T.; Lourenco, C.; Chen, B.; Ciric, L.; Parkin, I.P. and Edirisinghe, M., 2020.** Microstructure and antibacterial efficacy of graphene oxide nanocomposite fibres. *Journal of Colloid and Interface Science*. Vol. 571, pp: 239-252.
21. **Mohamed, R.M.; Syed Zameer Ahmed, K.; Prem Nazeer, K. and Siva Kumar, D., 2015.** Synthesis, Characterization and Magnetic Properties of Hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Nanoparticles on Polysaccharide Templates and their Antibacterial Activity. *Appl. Nanosci*. Vol. 5, pp: 515-520.
22. **Moritz, M. and Geszke-Moritz, M., 2013.** The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*. Vol. 228, pp: 596-613.
23. **Ravikumar, S.; Gokulakrishnan, R.; Selvanathan, K. and Selvam, S., 2011.** Antibacterial activity of metal oxide nanoparticles against ophthalmic pathogens. *Int J Pharm Res Dev*. Vol. 3, pp: 122-127.
24. **Rufus, A.; Sreeju, N.; Vilas, V. and Philip, D., 2017.** Biosynthesis of hematite ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanostructures: size effects on applications in thermal conductivity, catalysis, and antibacterial activity. *Journal of Molecular Liquids*. Vol. 242, pp: 537-549.
25. **Sharma, D.; Ledwani, L.; Mehrotra, T.; Kumar, N.; Pervaiz, N. and Kumar, R., 2020.** Biosynthesis of hematite nanoparticles using Rheum emodi and their antimicrobial and anticancerous effects in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Vol. 20, pp: 111841.
26. **Somaraj, M.; John, N. and Tharayil, N., 2017.** DNA assisted synthesis of chitosan/ $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposites for antioxidant and antimicrobial activities. *Bulletin of Materials Science*. Vol. 40.
10. **Chipara, M.; Ibrahim, E.; Yust, B.; Padilla, D. and Chipara, D., 2015.** Nanoparticles and bacteria. *J. Nanomed*. Vol. 2, pp: 00033.
11. **Gao, N.; Chen, Y. and Jiang, J., 2013.** Ag@Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-GO nanocomposites prepared by a phase transfer method with long-term antibacterial property. *ACS Appl Mater Interfaces*. Vol. 5, pp: 11307-11314.
12. **Gokulakrishnan, R.; Ravikumar, S. and Raj, J.A., 2012.** In vitro antibacterial potential of metal oxide nanoparticles against antibiotic resistant bacterial pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. Vol. 2, pp: 411-413.
13. **Hassan, A.A.; Oraby, N.H.; El-Dahshan, E. and Ali, M., 2015.** Antimicrobial potential of iron oxide nanoparticles in control of some causes of microbial skin affection in cattle. *European Journal of Academic Essays*. Vol. 2, pp: 20-31.
14. **Huh, A.J. and Kwon, Y.J., 2011.** "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of controlled release*. Vol. 56, pp: 128-145.
15. **Jiang, Y.; Gong, J.L.; Zeng, G.M.; Ou, X.M.; Chang, Y.N.; Deng, C.H.; Zhang, J.; Liu, H.Y. and Huang, S.Y., 2016.** Magnetic chitosan-graphene oxide composite for anti microbial and dye removal applications. *International journal of biological macromolecules*. Vol. 82, pp: 702-710.
16. **Khan, S.; Shah, Z.H.; Riaz, S.; Ahmad, N.; Islam, S.; Raza, M.A. and Naseem, S., 2020.** Antimicrobial activity of citric acid functionalized iron oxide nanoparticles Superparamagnetic effect. *Ceramics International*. Online published.
17. **Li, Y.; Zhang, W.; Niu, J. and Chen, Y., 2012.** Mechanism of Photogenerated Reactive Oxygen Species and Correlation with the Antibacterial Properties of Engineered Metal-Oxide Nanoparticles. *ACS Nano*. Vol. 6, pp: 5164-5173.
18. **Liu, S.; Zeng, T.H.; Hofmann, M.; Burcombe, E.; Wei, J.; Jiang, R.; Kong, J. and Chen, Y., 2011.** Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress. *ACS nano*. Vol. 5, pp: 6971-6980.



27. **Tran, N.; Mir, A.; Mallik, D; Sinha, A.; Nayar, S. and Webster, T.J., 2010.** Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *International journal of nanomedicine*. Vol. 5, pp: 277.
28. **Xia, T.; Kovoichich, M.; Liang, M.; Madler, L.; Gilbert, B.; Shi, H.; Yeh, J.I.; Zink, J.I. and Nel, A.E., 2008.** Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS nano*. Vol. 2, pp: 2121-2134.
29. **Yamamoto, O., 2001.** Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *International Journal of Inorganic Materials*. Vol. 3, pp: 643-436.
30. **Zhang, H.; Chen, B. and Banfield, J.F., 2010.** Particle size and pH effects on nanoparticle dissolution. *The Journal of Physical Chemistry*. Vol. 114, pp: 14876-14884.
31. **Zhang, L.; Ding, Y.; Povey, M. and York, D., 2008.** ZnO nanofluids—A potential antibacterial agent. *Progress in Natural Science*. Vol. 18, pp: 939-944.
32. **Zhang, Q.; Lambert, G.; Liao, D.; Kim, H.; Robin, K.; Tung, C.k.; Pourmand, N. and Austin, R.H., 2011.** Acceleration of emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments. *Science*. Vol. 333, pp: 1764-1767.