اثر نانوذرات اکسید روی بر تولید پیگمان جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا

محبوبه نخعی مقدم*[۱]، ملیحه نجفی[۲]

۱) گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۲) گروه زیست شناسی ، واحد دامغان ، دانشگاه آزاد اسلامی ، دامغان، ایران

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۲/۱۷ **تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۱۵**

چکیده

مقدمه: نانوذرات با اندازه ها، خصوصیات شیمیایی و سطحی متفاوت می توانند کاربردهای مختلفی داشته باشند. سودوموناس آئروجینوزا باکتری فرصت طلبی است که توانایی تولید پیگمان دارد. هدف این تحقیق بررسی اثر نانوذرات اکسید روی بر تولید پیگمان جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی مقطعی، ۱۵ جدایه بالینی سودوموناس آئروجینوزا از بیمارستان های مشهد جمع آوری گردید. باکتری ها با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی و واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) با پرایمر اختصاصی ژن exoA شناسایی شدند. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) نانوذرات اکسید روی(قطر nm ۷-۴) با روش رقت در آگار تعیین شد. برای بررسی اثر نانوذره بر تولید پیگمان، از محیط گلیسرول آلانین(GA) حاوی غلظت های مختلف نانوذره(۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰mg/ml) استفاده شد. پیگمان با افزودن کلروفرم استخراج شد.

یافته های پژوهش: تمامی جدایه های بالینی با روش های بیوشیمیایی به عنوان سودوموناس آئروجینوزا شناسایی شدند و ژن exoA در آن ها ردیابی شد. میانگین MIC نانوذرات ۶۰ mg/ml و MBC آن ۷۰ mg/ml تعیین شد. میزان تولید پیگمان پیوسیانین در تمامی جدایه ها بررسی و مقایسه شد. با افزایش غلظت نانوذره میزان تولید پیگمان به طور معنی داری کاهش یافت($P<0.05$).

بحث و نتیجه گیری: نانوذره اکسید روی اثر مهاری بر این باکتری و تولید پیگمان آن داشت و با افزایش غلظت نانوذره، تولید پیگمان کاهش یافت. از نانوذره اکسید روی می توان برای پیشگیری و یا کمک به درمان عفونت های سودوموناس آئروجینوزا استفاده کرد.

واژه های کلیدی: پیوسیانین، نانوذرات، اکسید روی، سودوموناس آئروجینوزا

***نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران**

Email: mahboobe_nak@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.107]

مقدمه

نانو یک مقیاس جدید در فناوری ها و یک رویکرد جدید در تمام رشته ها است(۱). نانوذرات با ترکیبات، اندازه ها، شکل و خصوصیات شیمیایی و سطحی مختلف می توانند کاربردهای زیستی و زیست پزشکی مختلفی داشته باشند. کاهش اندازه مواد در مقیاس نانو می تواند اغلب باعث تغییر الکتریکی، مغناطیسی، خواص ساختاری و شیمیایی آن ها شود. نانوذرات به علت دارا بودن ویژگی هایی چون بالا بودن نسبت سطح به حجم و کوچک بودن ابعاد، با نفوذ به میکروارگانیسم ها خواص ضد باکتریایی و مغناطیسی دارند، هم چنین با داشتن خواص فتوکاتالیستی، کاتالیستی و یونی، کاربرد گسترده ای در مبارزه با میکروب های بیماری زای انسانی، باکتری ها، قارچ ها و ویروس ها دارند(۲). مطالعه های اخیر ثابت می کنند که نانوذرات سولفیدی و اکسید فلزات دارای خواص ضدمیکروبی بسیار خوبی هستند(۳). اکسید روی با خواص فیزیکی و شیمیایی خاص خودش یک ماده چند عملکردی است که در صنایع مختلفی مثل الکترونیک، اپتوالکترونیک، لیزر و همین طور صنایع سرامیک، نساجی، کشاورزی، آرایشی و داروسازی کاربرد دارد و به خاطر سمیت پایین آن و قابلیت تجزیه زیستی یک ماده مناسب برای تحقیقات زیست پزشکی و سیستم های طرفدار محیط زیست است. اکسید روی به علت ویژگی های ضد میکروبی، ضدعفونی کنندگی و خشک کننده اش به طور گسترده در تولید انواع مختلف داروها استفاده می شود(۴).

سودوموناس ها باسیل های هوازی، گرم منفی و غیرتخمیری هستند که به صورت گسترده ای در طبیعت پراکندگی دارند. سودوموناس آئروجینوزا پاتوژن فرصت طلب مهمی است که می تواند به سرعت در برابر دارو مقاوم شود(۵،۶). اگزوتوکسین A سم اصلی تولید شده توسط این باکتری یکی از عوامل مرگ و میر می باشد. این سم به صورت کروموزمی کد می شود و در ۹۰ درصد از سویه های سودوموناس آئروجینوزا وجود دارد(۷). این باکتری یکی از عوامل شایع عفونت های بیمارستانی به ویژه در زخم ها و سوختگی ها است که منجر به تولید چرک آبی مایل به سبز می شود. هم چنین این باکتری می تواند باعث مننژیت، عفونت دستگاه ادراری، تنفسی، اووتیت خارجی بدخیم در بیماران دیابتی، عفونت چشمی و سپسیس شود(۸،۹). این باکتری توانایی تولید رنگدانه های محلول در آب نظیر رنگدانه غیر فلوئورسنتی آبی رنگ به نام پیوسیانین(محلول در آب و کلروفرم) و رنگدانه فلوئورسنتی سبز رنگ به نام پیوردین(محلول در آب و استیک اسید) را دارد. پیگمان پیوسیانین(۱-هیدروکسی ۵-متیل فنازین)، یک ترکیب سبز-آبی حل شونده در کلروفرم و از اعضای خانواده ترکیبات سه حلقه ای فنازین است. این ترکیب نقش مهمی در توانایی سودوموناس برای پایداری در ریه افراد مبتلا به بیماری سیستیک فیبروزیس و افراد با نقص سیستم ایمنی دارد. هم چنین در زنش مژک های تنفسی، تولید ایمونوگلوبولین ها توسط لنفوسیت های B و رشد سلول های اپی تلیال و غیره اختلال ایجاد می کند(۶،۱۰).

مطالعات نشان می دهند که توانایی تولید رنگدانه در میکروارگانیسم ها، سبب مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت به فلزات سنگین در محیط می گردد. رنگدانه در این باکتری ها مانند سدی در مقابل نفوذ آنتی بیوتیک از دیواره و غشای سیتوپلاسمی باکتری عمل می کند. پیگمان به عنوان ماده آنتی اکسیدان عمل می کند و موجب در امان ماندن باکتری در برابر رادیکال های آزاد اکسیژن می شود(۱۰). ژن های اپرون فنازین در بیوسنتز پیوسیانین نقش دارند(۱۱).

سویه های سودوموناس آئروجینوزا که پیوسیانین تولید نمی کنند، بیماری زایی کمتری دارند و حساسیت بیشتری به پاسخ ایمنی دارند(۱۱). پیوسیانین یک فاکتور بیماری زایی مهم و مولکولی کوچک و فعال از نظر اکسیداسیون احیا است که نقش اساسی در بیماری زایی عفونت های ناشی از سودوموناس آئروجینوزا بازی می کند. ترکیباتی که بیوسنتز پیوسیانین را مهار می کنند می توانند مهارکننده فرآیند حسگری با تعداد آستانه باشند که خود در بیماری زایی این باکتری نقش دارد. مهار تولید پیوسیانین یک روش مورد توجه برای درمان عفونت های ناشی از سودوموناس آئروجینوزا شناخته شده است(۱۲).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.107]

تاکنون مطالعات فراوانی در مورد اثرات ضد باکتریایی نانوذرات انجام شده است، اما مطالعات در رابطه با اثرات نانوذرات بر تولید پیگمان باکتری ها کمتر به چشم می خورد. بنا بر این در این تحقیق بر آن شدیم که اثرات نانوذرات اکسید روی را بر تولید پیگمان در باکتری های سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از نمونه های بالینی بررسی نماییم.

مواد و روش ها

جداسازی و شناسایی باکتری ها: باکتری های سودوموناس آئروجینوزا از نمونه های مختلف بیماران بستری در اواخر سال ۱۳۹۳ و اوایل ۱۳۹۴ از بیمارستان های قائم و امام رضای شهر مشهد جمع آوری شدند. نمونه ها شامل خون، ادرار، ریه، گوش، تراشه، زخم و مایع صفاقی بودند. سپس باکتری ها با استفاده از آزمایش های بیوشیمیایی مرسوم(نظیر آزمایش اکسیداز، کاتالاز، سیمون سیترات، اندول، حرکت، رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد، کشت در محیط ستریمایدآگار و TSI آگار) شناسایی شدند(۱۳). در این تحقیق از سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزا (ATCC 1074) خریداری شده از سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران نیز استفاده شد.

برای شناسایی تاییدی از روش کلنی PCR که روشی برای تکثیر قطعه DNA با استفاده از کلنی خالص باکتری است و نیازی به استخراج DNA ندارد(۱۴)، استفاده شد. برای انجام PCR از پرایمرهای ژن اگزوتوکسین A (exoA) برای تکثیر قطعه ای با طول bp ۳۹۶ استفاده شد(۱۵) که توالی پرایمرها عبارت بودند از:

F-5'-GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC-3'
R-5'- CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT-3'

واکنش کلنی PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۴ µM از هر یک از پرایمرها، ۰/۲ mM از dNTPs، ۱/۵ mM کلرید منیزیم، ۱/۲۵ واحد آنزیم smar Taq DNA پلی مراز انجام شد. یک کلنی تک با نوک سمپلر استریل به محتویات میکروتیوب اضافه شد. تکثیر DNA در ترموسایکلر(Kyratec، کشور کره) با برنامه دمایی واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد، ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال ۶۸ درجه سانتی گراد و گسترش ۷۲ درجه سانتی گراد هر مرحله ۱ دقیقه و گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. سپس برای اطمینان از تکثیر ژن مورد نظر، الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی green viewer به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت انجام و با استفاده از دستگاه Gel document عکس تهیه شد.

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد نانوذرات اکسید روی: نانوذرات اکسید روی به صورت پودر با خلوص ۹۹ درصد، کروی و میانگین قطر ۷-۴ نانومتر از شرکت نانوسانی در مشهد خریداری شدند. برای تهیه سوسپانسیون نانوذره، ۱۰۰ میلی گرم از پودر در ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی مخلوط شد و هر بار قبل از استفاده، محتویات با ورتکس بخوبی مخلوط شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد(MIC) از روش رقت در آگار با میکروپلیت در محیط مولر هینتون آگار و میکروپلیت ۲۴ خانه ای پلی استیرنی استفاده شد. غلظت های مختلف نانوذرات(صفر تا ۷۰ mg/mL) در محیط مذاب مولر هینتون آگار با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد آماده شد. بعد از بستن محیط از سوسپانسیون باکتریایی استاندارد(OD_{620}=0.01) در سطح محیط چاهک ها تلقیح شد. میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت رشد و عدم رشد باکتری در غلظت های مختلف نانوذرات اکسید روی تعیین شد. برای تعیین MBC (حداقل غلظت باکتریسیدی) از سطح چاهک های فاقد رشد به محیط های کشت در پلیت های فاقد نانوذرات کشت داده شد. در این پلیت ها، پایین ترین غلظت نانوذره که باکتری در آن رشد نداشت، به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

استخراج پیوسیانین: برای استخراج پیگمان، یک کلنی خالص از هر باکتری به محیط لوریا برتانی (Luria bertani) تلقیح شد. لوله به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس جذب نوری(OD) آن در ۶۲۰ نانومتر ۰/۰۱ تنظیم شد. به ۲۵ میلی لیتر محیط GA(۱۶)، ۲۵۰

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.107]

میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی اضافه شد و در انکوباتور شیکر دار ۳۷ درجه سانتی گراد با دور ۲۰۰ rpm به مدت ۲۴-۱۸ ساعت قرار داده شد. سپس نمونه ها در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جمع آوری و فیلتر(قطر منافذ ۰/۲۲µ) شد. به ۷/۵ میلی لیتر مایع رویی ۴/۵ میلی لیتر کلروفرم اضافه شد و ۱۰ مرتبه به مدت ۲ ثانیه، ورتکس شد. این مرحله ۳ بار برای هر جدایه تکرار شد. کلروفرم در ته لوله قرار می گیرد و به تدریج آبی مایل به سبز می شود، چون پیوسیانین در کلروفرم حل می شود. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. ۳ میلی لیتر از لایه آبی در ته لوله(کلروفرم و پیوسیانین) به لوله جدید منتقل گردید. در مرحله بعدی ۱/۵ میلی لیتر از اسید کلریدریک ۰/۲M به هر لوله اضافه و ورتکس شد تا محیط اسیدی شود. در این مرحله رنگ آبی به صورتی تغییر یافت. نمونه ها به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. ۱ میلی لیتر از مایع صورتی به کووت منتقل و جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. مراحل فوق برای سویه استاندارد و تمامی جدایه ها انجام و سه بار تکرار شدند(۱۵).

اثر نانوذرات اکسید روی بر تولید پیگمان: غلظت های صفر(شاهد)، ۲۰ و ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر از نانوذره اکسید روی در ۲۵ میلی لیتر از محیط GA در ارلن ها آماده شد. ۲۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی خالص(OD_{620}) به هر ارلن تلقیح شد. ارلن ها در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی گراد با دور ۲۰۰ rpm به مدت ۲۴-۱۸ ساعت قرار داده شدند. برای اطمینان از قابلیت رشد باکتری ها در این محیط ها، از ارلن های حاوی نانوذرات به محیط EMB آگار فاقد نانوذرات تلقیح شد. تشکیل کلنی بر سطح پلیت، زنده بودن باکتری ها را تایید می کند. سپس نمونه ها در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جمع آوری و با فیلتر دارای منافذ ۰/۲۲ میکرون صاف شد. بقیه مراحل مشابه روش قبل انجام گرفت. آزمایش برای سویه استاندارد و تمامی جدایه ها سه بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS vol.20 انجام شد. برای تعیین معنی داری از نتایج آزمایشات و ارزیابی آن ها از آزمون دانکن، ANOVA و LSD استفاده شد و P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش

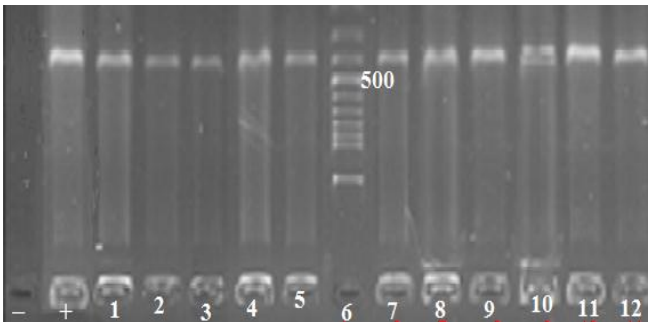
از نظر ویژگی های بیوشیمیایی مورد آزمایش تمامی جدایه ها به عنوان سودوموناس آئروجینوزا شناسایی شدند. وجود ژن exoA در تمامی جدایه های سودوموناس آئروجینوزا، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ردیابی شد. شکل شماره ۱ الکتروفورز محصول واکنش کلنی PCR را در کنار مارکر ژنی (۱/۵ Kb) نشان می دهد.

میانگین حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت باکتری کشی نانوذرات اکسید روی برای جدایه ها به ترتیب حدود ۵۹/۳±۵/۸ mg/ml و ۶۹/۳±۵/۸ mg/ml تعیین شد. MBC نانوذرات اکسید روی از MIC بیشتر بود که نشان می دهد، نانوذرات در غلظت MIC فقط از رشد باکتری ها ممانعت می کنند و در غلظت های بالاتر باکتری را می کشند. بنا بر این در غلظت MIC اثر باکتریواستاتیک داشتند.

جدول شماره ۱ تولید پیگمان را در جدایه ها بر اساس OD_{520} نشان می دهد. تمامی جدایه ها قادر به تولید پیگمان پیوسیانین بودند و تولید پیگمان در جدایه های ۲ و ۱۰ از بقیه جدایه های بالینی و سویه استاندارد بیشتر بود. کمترین میزان تولید پیگمان مربوط به جدایه ۱۱ بود. شکل شماره ۲ تولید پیگمان باکتریایی را برای دو جدایه در محیط GA نشان می دهد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.107]



شکل شماره ۱. ژل الکتروفورز محصول کلنی PCR ژن exoA با اندازه ۳۹۶ جفت باز در کنار مارکر bp ۱۵۰۰ در برخی از جدایه های سودوموناس آئروجینوزا(کنترل مثبت+؛ کنترل منفی-؛ ۱۲-۱ نمونه ها)

جدول شماره ۱. نتایج استخراج پیگمان از جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا بر اساس جذب نوری(OD_{520})

باکتری	جذب نوری(OD)		
	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم
سویه استاندارد(ATCC ۱۰۷۴)	۰/۵۰۱	۰/۵۰۴	۰/۵۰۲
جدایه ۱	۰/۵۵۲	۰/۵۵۶	۰/۵۵۴
جدایه ۲	۱/۱۹۳	۱/۱۸۹	۱/۱۹۰
جدایه ۳	۰/۴۹۴	۰/۴۹۸	۰/۴۹۶
جدایه ۴	۰/۶۸۲	۰/۶۷۹	۰/۶۸۰
جدایه ۵	۰/۲۸۷	۰/۲۸۳	۰/۲۸۰
جدایه ۶	۰/۳۲۷	۰/۳۲۳	۰/۳۲۵
جدایه ۷	۰/۳۸۵	۰/۳۸۹	۰/۳۸۷
جدایه ۸	۰/۴۲۵	۰/۴۲۰	۰/۴۲۳
جدایه ۹	۰/۳۰۸	۰/۳۱۲	۰/۳۱۰
جدایه ۱۰	۰/۹۶۳	۰/۹۶۸	۰/۹۷۰
جدایه ۱۱	۰/۲۶۳	۰/۲۶۷	۰/۲۶۵
جدایه ۱۲	۰/۵۷۰	۰/۵۶۷	۰/۵۶۹
جدایه ۱۳	۰/۳۰۰	۰/۳۰۳	۰/۳۰۱
جدایه ۱۴	۰/۵۵۴	۰/۵۵۰	۰/۵۵۲
جدایه ۱۵	۰/۷۸۹	۰/۷۸۵	۰/۷۸۶
میانگین±SE	۰/۲	۰/۲	۰/۲
	±۰/۵۳۹	±۰/۵۳۹	±۰/۵۳۹

جدول شماره ۲ نتایج جذب نوری تولید پیگمان را در محیط GA در حضور غلظت های مختلف نانوذرات اکسید روی در جدایه های سودوموناس آئروجینوزا نشان می دهد. همان طور که در این جدول و هم چنین نمودار شماره ۱ مشخص است در حضور غلظت های ۴۰mg/ml و ۲۰ نانوذرات(غلظت های زیر MIC) تولید پیگمان در جدایه ها بر اساس جذب نوری کاهش یافته است. بر اساس آنالیز آماری LSD و دانکن با افزایش غلظت نانوذرات اکسید روی میزان جذب نوری پیگمان در مقایسه با شاهد به طور معنی داری کاهش یافته است($P<0.05$).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-29]

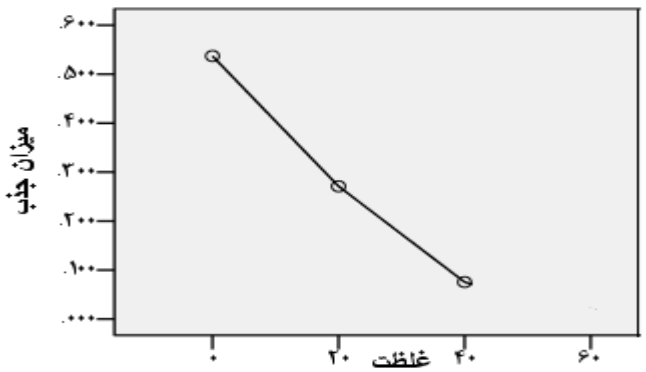
[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.107]



شکل شماره ۲. تولید پیگمان توسط باکتری سودوموناس آئروجینوزا در محیط GA قبل از استخراج پیگمان

جدول شماره ۲. تولید پیگمان در جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا بر اساس جذب نوری(OD_{520}) در حضور غلظت های مختلف نانوذرات اکسیدروی(اعداد میانگین جذب نوری را پس از سه بار تکرار نشان می دهند)

باکتری	جذب نوری (OD)		
	غلظت ۰ (شاهد)	غلظت ۴۰ mg/ml	غلظت ۴۰ mg/ml
سویه استاندارد	۰/۵۰۲	۰/۲۵۷	۰/۰۷۰
جدایه ۱	۰/۵۵۴	۰/۳۰۴	۰/۰۹۲
جدایه ۲	۱/۱۹۱	۰/۵۰۱	۰/۱۴۲
جدایه ۳	۰/۴۹۶	۰/۲۱۴	۰/۰۶۳
جدایه ۴	۰/۶۸۰	۰/۳۳۰	۰/۰۹۷
جدایه ۵	۰/۲۸۱	۰/۱۰۱	۰/۰۴۳
جدایه ۶	۰/۳۲۵	۰/۱۶۶	۰/۰۵۳
جدایه ۷	۰/۳۸۷	۰/۲۲۲	۰/۰۷۴
جدایه ۸	۰/۴۲۳	۰/۲۴۱	۰/۰۵۴
جدایه ۹	۰/۳۱۰	۰/۱۳۳	۰/۰۲۵
جدایه ۱۰	۰/۹۷۰	۰/۵۴۵	۰/۱۲۶
جدایه ۱۱	۰/۲۶۵	۰/۱۳۴	۰/۰۳۲
جدایه ۱۲	۰/۵۶۹	۰/۲۸۲	۰/۰۸۵
جدایه ۱۳	۰/۳۰۱	۰/۱۴۶	۰/۰۴۳
جدایه ۱۴	۰/۵۵۲	۰/۲۶۵	۰/۰۷۰
جدایه ۱۵	۰/۷۸۷	۰/۴۹۶	۰/۰۴۰
میانگین±SE	۰/۵۳۷±۰/۲۵	۰/۲۷۱±۰/۱۳	۰/۰۷۵±۰/۰۳



نمودار شماره ۱. کاهش جذب نوری(OD_{520}) تولید پیگمان در جدایه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا در حضور نانوذرات اکسید روی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.107]

بحث و نتیجه گیری

سودوموناس آئروجینوزا یکی از عوامل فرصت طلب و جدی در عفونت های بیمارستانی مانند سوختگی های شدید و بیماران دچار سیستیک فیبروزیس است. این باکتری به علت مقاومت آنتی بیوتیکی توانسته است به تنهایی ۳۰ درصد عفونت های بیمارستانی را به خود اختصاص بدهد(۱۷). اکسید روی از عناصر ضروری و غیر سمی برای انسان محسوب می شود. اکسید روی خاصیت سمی برای سلول های انسانی ندارد. ایمن بودن این ماده به وسیله انجمن غذا و دارو اعلام شده است(۱۸).

در تحقیق حاضر نانوذره اکسید روی با اندازه ۷-۴ نانومتر اثر ضد باکتریایی علیه ۱۵ جدایه بالینی سودوموناس آئروجینوزا داشت. MIC و MBC ذرات علیه جدایه های بالینی به ترتیب حدود ۵۹ و ۶۹ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نانوذرات در غلظت MIC اثر باکتریواستاتیک داشتند. هم چنین نانوذره در غلظت های زیر MIC تولید پیگمان پیوسیانین را کاهش داد. تمامی جدایه های بالینی در مطالعه حاضر حامل ژن exoA بودند.

امینی و همکاران وجود ژن exoA را با روش PCR در سودوموناس آئروجینوزا بررسی کردند که نشان دادند ۹۰ درصد باکتری های جدا شده دارای ژن exoA هستند(۱۹).

ژانگ و همکاران در مطالعه خود نشان دادند با کاهش اندازه نانوذرات اکسید روی، فعالیت ضد باکتریایی آن افزایش می یابد. آن ها در مطالعه خود اثر ضد سودوموناسی نانوذرات ZnO را با قطر ذرات ۵ و ۱۰۰ نانومتر بررسی کردند و مشخص گردید کاهش اندازه نانوذرات، با بروز فعالیت ضد باکتریایی بیشتری همراه است. احتمال دارد کوچکی اندازه نانوذرات این قابلیت را به وجود آورد تا راحت تر بتواند از منافذ سطحی باکتری عبور کند و به ساختار های درونی یا سطح غشای سیتوپلاسمی آسیب برساند(۲۰). در این تحقیق هم از نانوذرات ZnO با قطر ۷-۴ نانومتر استفاده شد که فعالیت ضد باکتریایی از خود نشان داد. رجایی و همکاران در مطالعات خود اثر ضد سودوموناسی نانوذرات با قطر ۵ و ۱۰۰ نانومتری را بررسی کردند. نانوذرات اکسید روی ۵ نانومتری در غلظت های ۱۰۰-۵۰-۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و نانوذرات با قطر ۱۰۰ نانومتر در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری های سودوموناس آئروجینوزای جدا شده از زخم های سوختگی را داشتند(۲۱). در تحقیق دیگری مشخص شد که نانوذرات اکسید روی اثر مهاری علیه سودوموناس آئروجینوزا دارند و از تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری جلوگیری می کنند(۲۲).

در یک بررسی که بر روی عصاره سیر انجام شد، مشخص شد که غلظت های کم تر از غلظت بازدانده رشد موجب تغییرات ریخت شناسی، افزایش قدرت همولیز سویه و کاهش تولید پیوسیانین می شود(۲۳). در مطالعه ای دیگر نیز مشخص شد که عصاره سیر علیه سودوموناس آئروجینوزا اثر دارد و در غلظت های پایین، تولید کاتالاز و تولید پیوسیانین توسط سودوموناس آئروجینوزا را کاهش می دهد(۲۴). Garcia-Lara و همکاران در تحقیق خود مشابه تحقیق حاضر گزارش کردند که نانوذرات ZnO تولید پیوسیانین را در سویه های محیطی و بالینی سودوموناس آئروجینوزا کاهش داد و این ذرات شاید جایگزین مناسبی برای درمان عفونت های مرتبط با این باکتری باشند(۲۵). نتایج یک تحقیق در رابطه با پیگمان سازی قارچ فوزاریوم(F. culmarium) نشان داد که اثر نانوذرات نقره بر پیگمان سازی به مقدار غلظت نانوذره بستگی دارد. در غلظت پایین تر(۷ ppm) پیگمان سازی تا حدودی کمتر و نزدیک به گروه شاهد بود و اختلاف معنی داری با شاهد نداشت. اما در غلظت های بالاتر(۳۵ و ۷۰ ppm) در قارچ فوزاریوم مورد آزمایش، سطح تولید پیگمان در سمت پشت کشت ها بیشتر القاء شد. آنالیز متابولیت ها دلالت داشت بر این که در این شرایط تحت تاثیر نانونقره قارچ، آروفورازین(Aurofusarin) را با شدت بیشتری بیوسنتز می کند و تبدیل روبرافورازین (Rubrofusarin) به آروفورازین در مقایسه با کشت شاهد تشدید می شود(۲۶).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نانوذرات اکسید روی با اندازه ۷-۴ نانومتر می توانند مانع رشد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.107]

سودوموناس آئروجینوزا شوند. این ذرات در غلظت های بالا اثر ضدباکتریایی خود را بر سودوموناس آئروجینوزا، نشان دادند. آزمایشات بررسی تولید پیگمان در جدایه ها از طریق استخراج با کلروفرم و خواندن جذب نوری(OD_{520}) پیگمان در pH اسیدی، وجود پیگمان پیوسیانین را در تمامی جدایه های بالینی نشان داد. در میان باکتری ها، جدایه شماره ۲ بیشترین تولید پیگمان را داشت. تولید پیگمان باکتری که یکی از عوامل بیماری زایی باکتری سودوموناس محسوب می شود، در حضور نانوذرات اکسید روی در غلظت های زیر MIC (۴۰mg/ml و ۲۰) در مقایسه با شاهد با استفاده از آزمون دانکن کاهش معنی داری را نشان داد($P<0.05$).

References

1. Chen X, Schluesener HJ. Nano silver in medical application. Toxic Lett 2008; 176: 1-12.

2. Salata OV. Applications of nanoparticles in biology and medicine. J Nanobiotech2004;2: 3-4.

3. Kelsall R, Hamely I, Geohegan M. Nanoscale science and technology. Wiley Publication. 2005;P.231.

4. Kolodziejczak A, Jesionowski T. Zinc oxide from synthesis to application. Materials 2014; 7: 2833-81.

5.Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology. 27th ed. McGraw Hill Publication. 2015;P.188-9.

6.Chuard C, Hermman M, Lew D. Successful of treatment experimental chronic infection due to Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Age Chemother 2010; 5: 2611-6.

7.Hancock R, Siehnel R, Martin N. Outer membrane proteins of Pseudomonas. Mol Microbiol1990;4:1069-75.

8.Connell B, Tullo A, Morgan P. Armstrong M. Pseudomonas aeruginosa microbial keratitis secondary to cosmetic coloured contact lens wear. Br J Ophthalmol 2004; 88:1603-4.

9. Favero MS, Carson LA, Bond WW, Petersen NJ. Pseudomonas aeruginosa growth in distilled water. Science1971;173:836-8.

10. Hassett DJ, Charniga L, Bean K, Ohman DE, Cohen MS. Response of Pseudomonas aeruginosa to pyocyanin mechanisms of resistance antioxidant defenses and demonstration of a manganese cofactored superoxide dismutase. Infect Immun1992;60:328-36.

11.Nowroozi J, Akhavansepahi A, Rashnonejad A. Pyocyanine biosynthetic genes in clinical and environmental iIsolates of Pseudomonas aeruginosa and detection of pyocyanine's antimicrobial effects with or without colloidal silver nanoparticles. Cell J2012;14:7-18.

12.Morkunas B, Gal B, Galloway W RJD, Hodgkinson JT, Ibbeson BM, Tan YS, et al. Discovery of an inhibitor of the production of the Pseudomonas aeruginosa virulence factor pyocyanin in wild type cells. Beilstein J Org Chem 2016; 12: 1428-33.

13. Muqing C, Yu F, Yan G, Junmin P. Chlamydomonas colony PCR. Protoplasma2008; 235:107-10.

14. Xu J, Moore JE, Murphy PG, Millar BC, Elborn S. Early detection of Pseudomonas aeruginosa comparison of conventional versus molecular PCR detection directly from adult patients with cystic fibrosis. Ann Clin Microbiol Antimicrob2004,3:21.

15. Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, Griswold JA, et al. Analysis of quorum sensing deficient clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. J Med Microbiol 2004; 53, 841-53.

16. Dietrich LE, Pricewhelan A, Petersen A, Whitele M, Newman DK. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of Pseudomonas aeruginosa. Mol Microbiol2006;61:1308-21.

12.

17. Rossolini G, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant Pseudomonas aeruginosa. Clin Microbiol Infect 2005;11:17-32.

18. Chitra K, Annadurai G. Antimicrobial activity of wet chemically engineered spherical shaped ZnO nano particles on

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.107]

food pathogen. Int Food Res J 2013; 20: 59-64.
19. Amini B, Kamali M, Zareimahmodabadi A, Mortazavi Y, Ebrahimhabibi A, Bayat E, et al. [Cloning of catalytic domain of exotoxin a from Pseudomonas aeruginosa]. Zanjan Med Sci Uni J 2010; 18: 24-33. (Persian)
20. Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Povy M, York D. Investigating into the antibacterial behavior of suspension of ZnO nanoparticles. J Nanopart Res 2007; 9: 479-89.
21. Rajaie S, Mohammadi Sichani M, Yousefi MH. [Study on the inhibitory activity of zinc oxide nanoparticles against Pseudomonas aeruginosa isolated from burn wounds]. Qom Med Sci Uni J 2015; 9:30-7. (Persian)
22. Hassani Sangani M, Nakhaei Moghaddam M, Forghanifard MM. Inhibitory effect of zinc oxide nanoparticles on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation. Nanomed J 2015;2:121-8.
23. Hesami Sh. [Effect of garlic extract (Allicin) on morphological and biochemical properties Pseudomonas aeruginosa]. Tarbiat Modarres Uni J1999;2:23-8.(Persian)
24. Akhavansepahi A, Khanafari A, Sojoudi S, Yarigarravesh M, Jamshidi A, Rezazadeh S. [The effects of garlic and cardamom extracts on morphology and physiology properties Methicillin resistant Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa]. J Med Plants 2008; 1:29-38.(Persian)
25.Garcialara B, Saucedomora MA, Roldansanchez JA, Perezeretza B, Ramasamy M, et al. Inhibition of quorum sensing dependent virulence factors and biofilm formation of clinical and environmental Pseudomonas aeruginosa strains by ZnO nanoparticles. Lett Appl Microbiol2015; 61:299-305.
26. Kasprowicz MJ, Gorczyca A, Frandsen RJN. The effect of nanosilver on pigments production by Fusarium culmorum sacc. Polish J Microbiol 2013; 62: 365-72.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.107]

Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on the Pigment Production of Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa

Nakhaei Moghaddam M[1], Najafi M[2]*

(Received: March 7, 2016 Accepted: November 5, 2016)

Abstract

Introduction: Nanoparticles with the different sizes, surfaces and chemical characteristics can have different applications. Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacterium that has the ability to produce pigment. The aim of this study was to investigate the effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on pigment production of clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa.

Materials & methods: In this description cross-sectional study, 15 clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa were collected from hospitals in Mashhad. Bacteria were identified using biochemical tests and polymerase chain reaction (PCR) by specific primers of exoA gene. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of zinc oxide nanoparticles (diameter of 4-7 nm) were determined by agar dilution method. Glycerol- alanine (GA) medium containing different concentrations (0, 20, 40 and 60 mg/ml) of nanoparticles were used for investigation of the effect of ZnO nanoparticles on pigment production. The pigment was extracted by adding chloroform.

Findings: All clinical isolates were identified by biochemical experiments as P. aeruginosa and exoA gene was detected in all bacteria. The average MIC and MBC of ZnO nanoparticles were 60 mg/ml and 70 mg/ml, respectively. All isolates were examined and compared for pyocyanin pigment production. The pigment production was significantly reduced with increasing concentrations the ZnO nanoparticles ($p < 0.05$).

Discussion & Conclusion: Zinc oxide nanoparticles had inhibitory effect on bacteria and pigment production. Pigment production decreased with increasing concentrations of nanoparticles. ZnO nanoparticles could be used in prevention or helping to treat P. aeruginosa infections.

Keywords: Pyocyanin, Nanoparticles, Zinc oxide, Pseudomonas aeruginosa

1. Dept of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
2. Dept of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
** Correspondin author Email: mahboobe_nak@yahoo.com*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.18869/acadpub.sjimu.24.6.107]