



Scan online to view this article

## Study on the antimicrobial effects of iron oxide nanoparticles synthesized by cytoplasmic extract of *Lactobacillus fermentum*

Mina Fani<sup>1</sup>, Fereshte Ghandehari<sup>1\*</sup>, Malahat Rezaee<sup>2</sup>, Mahnoosh Fatemi<sup>3</sup>

1- Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2- Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

3- Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

### Abstract

**Aim and Background:** In recent years, science and industry have focused on preparing nanoparticles based on the principles of green chemistry. For this purpose, various types of biological structures such as bacteria, yeasts, and string molds are used. Due to the resistance of bacteria to antibiotics, the need to replace effective antimicrobials, with fewer side effects is less. The aim of this research was to synthesis the iron oxide nanoparticles by *Lactobacillus fermentum* cytoplasmic extract and investigate its antimicrobial effects against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

**Materials and Methods:** In this study, after preparing cytoplasmic extract of *Lactobacillus fermentum* from frees-thow method, iron sulfate solution  $10^{-3}$  M were added and incubated for 3 weeks in the presence of 5 % carbon dioxide. Production of nanoparticles was investigated by X-ray Diffraction (XRD) and Transmission Electron Microscopy (TEM) and finally, the antimicrobial effects of standard strains of two bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) were determined using agar diffusion method.

**Results:** Changing the color of solution to black is an indication of iron oxide nanoparticles production. The formation of iron oxide nano-crystals by *Lactobacillus fermentum* cytoplasmic extract was shown by XRD analysis and the average nanoparticles sizes that determined by transmission electron microscopy TEM were found to be about 10-15 nm with a spherical shape. The mean diameter of the no-growth field indicates that the synthesized nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* in concentrations of 100 and 1000 mg/ ml, while are ineffective against *Pseudomonas aeruginosa*.

**Conclusion:** The use of cytoplasmic extract of *Lactobacillus fermentum* can be introduced as an effective biological method for the production of iron oxide nanoparticles and with more studies in this area, green nanoparticles may be used as suitable candidates for the treatment of microbial infections.

**Keywords:** iron oxide nanoparticles, *Lactobacillus fermentum*, probiotic, XRD, TEM

Corresponding author:

Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Email: ghandehari@iaufala.ac.ir



## مطالعه اثرهای ضد میکروبی نانوذرات اکسید آهن سنتز شده توسط عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس فرمنتوم

مینا فانی<sup>۱</sup>، فرشته قندهاری\*<sup>۱</sup>، ملاحی رضایی<sup>۲</sup>، مهنوش فاطمی<sup>۳</sup>

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲- گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۳- گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** در سال های اخیر توجه علم و صنعت به تهیه نانو ذرات مبتنی بر اصول شیمی سبز متمرکز شده است و بدین منظور از انواع گوناگونی از ساختارهای زیستی هم چون باکتری ها، مخمرها و کپک های رشته ای استفاده می شود. با توجه به مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها، نیاز به جایگزین نمودن عوامل ضد میکروبی مؤثر با عوارض جانبی کم تر، بیش تر است. هدف از این پژوهش سنتز نانوذرات اکسید آهن توسط عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس فرمنتوم و بررسی اثرهای ضد میکروبی آن بر علیه باکتری استافیلوکوکوس آرتوس و سودوموناس آئروجینوزا است.

**مواد و روش ها:** در این پژوهش، پس از تهیه عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس فرمنتوم به روش ذوب و یخ، محلول سولفات آهن (III) با غلظت  $10^{-3}$  مولار، به آن اضافه و در حضور ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۳ هفته انکوبه شد. به منظور بررسی تولید نانوذرات آنالیزهای پراش پرتو ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) انجام گردید و در نهایت اثرهای ضد میکروبی نانوذرات بر روی ۲ سویه استاندارد از باکتری های بیماری زای (استافیلوکوکوس آرتوس و سودوموناس آئروجینوزا) به روش انتشار چاهک مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته ها:** تغییر رنگ محلول به رنگ سیاه نشان دهنده تولید نانوذرات اکسید آهن بود، آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD)، تشکیل نانوکریستال های اکسید آهن به وسیله عصاره سیتوپلاسمی باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم را نشان داد و اسکن میکروسکوپ الکترونی TEM شکل نانوذرات را کروی و میانگین اندازه آن را ۱۵ - ۱۰ نانومتر تعیین کرد. میانگین قطر هاله عدم رشد بیانگر آن است که نانوذرات سنتز شده در غلظت های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر رشد باکتری استافیلوکوکوس آرتوس را مهار، در حالی که بر علیه سودوموناس آئروجینوزا فاند اثر مهار کننده است.

**نتیجه گیری:** استفاده از عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس فرمنتوم را می توان به عنوان یک روش بیولوژیک کارآمد برای تولید نانوذرات اکسید آهن معرفی نمود و با مطالعه های بیش تر در این زمینه شاید بتوان از نانوذرات سنتز شده به روش سبز به عنوان کاندیدای مناسبی در درمان عفونت های میکروبی استفاده نمود.

**واژه های کلیدی:** نانوذرات اکسید آهن، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، پروبیوتیک، XRD، TEM

### مقدمه

یکی از زمینه های مهم تحقیقات در نانوتکنولوژی استفاده از نانو ذرات مختلف فلزی است.

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

پست الکترونیکی: ghandehari@iaufala.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱/۵/۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: ۲۴/۱۱/۱۳۹۷

## روش کار

### خریداری و کشت باکتری

سوش باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم با شناسه ( PTCC 1638) از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم در شرایط استریل در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تزریق و پس از انتقال در محیط کشت MRS Broth<sup>۴</sup> به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

### سنتز نانوذرات اکسید آهن توسط عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس فرمنتوم و تست‌های تشخیصی

ابتدا عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس فرمنتوم به روش freeze-thaw پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون محیط‌های کشت MRS Broth حاوی باکتری به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. پس از اتمام سانتریفوژ روشن شدن دور ریخته شد و به رسوب حاصله ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد (مرحله شستشو با بافر فسفات نمکی سه بار تکرار شد). سپس به مدت ۱۵ دقیقه داخل تانک ازت (نیتروژن مایع ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. بعد از آن به مدت ۱۵ دقیقه درون حمام بخار ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در پایان در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی به عنوان عصاره سیتوپلاسمی جمع آوری گردید (۳). محلول آبی اکسید آهن<sup>۳+</sup> ۱۰<sup>-۳</sup> مولار تهیه و به عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس فرمنتوم به نسبت حجمی مساوی (۱۰ % V/V) اضافه و پس از تنظیم pH محلول در ۵/۶ به مدت ۳ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد دی‌اکسید کربن و در تاریکی انکوبه گردید (۴). بعد از این مدت تجمع خارج سلولی ذرات فلز با تغییر رنگ محیط مشاهده شد. تغییر رنگ از بی‌رنگ به حالت سیاه نشان دهنده تولید نانوذرات اکسید آهن بود. پس از این مدت محلول حاوی نانوذرات داخل لوله‌های فالتون استریل ریخته شدند و در دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید، مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله دو بار با آب یون زدوده استریل و یک بار با استون شستشو داده شد. در پایان محلول واکنش توسط دستگاه خشک کن به پودر تبدیل شد و با نزدیک کردن آهن ربا مغناطیسی در مجاورت نانوذرات اکسید آهن سنتز شده زیستی خاصیت مغناطیسی نانوذرات مشاهده شد. برای بررسی تولید نانوذرات از دستگاه پراش پرتو

نانوذرات اکسید آهن اغلب در اندازه‌های کوچک‌تر از ۲۰ نانومتر تولید می‌شوند این ترکیب‌های به علت ویژگی‌های مغناطیسی مناسب، سازگاری زیستی بالا، سمیت بسیار اندک، نسبت به نانوذرات دیگر پیش‌تر توجه محققین را به خود جذب کرده‌اند. روش‌های بسیاری برای سنتز نانوذرات وجود دارد، بسیاری از تکنیک‌ها از نظر مصرف مواد و انرژی مقرون به صرفه نبوده و آلودگی‌های زیست محیطی را به همراه دارند از این‌رو، تمایل به تهیه ذرات با ابعاد نانو مبتنی بر اصول شیمی سبز و استفاده بالقوه از آن‌ها با توجه خصوصیت‌های منحصر به فردشان روز به روز در حال افزایش است و به این منظور انواع گوناگونی از ساختارهای زیستی از جمله گیاهان، جلبک‌ها و میکروارگانیسم‌هایی از قبیل باکتری‌ها، کپک‌های رشته‌ای و مخمرها جهت تهیه نانوذرات استفاده می‌شوند (۱). میکروارگانیسم‌ها در روش میکروبی کارخانجات کوچک و زنده در جهت تولید نانو مواد بکار می‌روند که با استفاده از عوامل احیاءکننده ارزان و تجدیدپذیر خود مانند لاکتات یا استات قادرند نانوذرات فلزی را در سایز ۱ تا ۲۰۰ نانومتر در دمای اتاق یا دمای بالاتر در مورد گرمادوست‌ها سنتز نمایند. مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها روز به روز در حال افزایش است. این مسأله بشر را به فکر جایگزین کردن عوامل ضد میکروبی مؤثر با عوارض جانبی کم‌تر به جای مواد ضد میکروبی با اثر کم‌تر و عوارض ناخواسته پیش‌تر سوق می‌دهد. در حال حاضر نانوتکنولوژی در زمینه نانوانتی‌بیوتیک نیز سودمند است، این تکنولوژی به وسیله دستکاری در اندازه و مقیاس باعث افزایش عملکرد این مواد می‌شود (۲). ماده در ابعاد نانو به علت بالابودن نسبت سطح به حجمشان در مقایسه با همان ماده در ابعاد بزرگتر، خواص متفاوتی را از خود نشان می‌دهد. مطالعه‌های نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید فلزی هم‌چون اکسید آهن دارای اثرهای زیست سازگاری و قدرت اثرگذاری بهتری را از خود نشان می‌دهند لذا یک کاندید انتخابی مناسب جهت مقابله با عوامل بیماری‌زا هستند. در این پژوهش سنتز نانوذرات اکسید آهن مبتنی بر شیمی سبز<sup>۴</sup> توسط عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس فرمنتوم<sup>۱</sup> سنتز و در نهایت اثرهای ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس آرتوس<sup>۲</sup> و سودوموناس آئروجینوزا<sup>۳</sup> بررسی گردید.

<sup>1</sup> *Lactobacillus fermentum*

<sup>2</sup> *Staphylococcus aureus*

<sup>3</sup> *Pseudomonas aeruginosa*

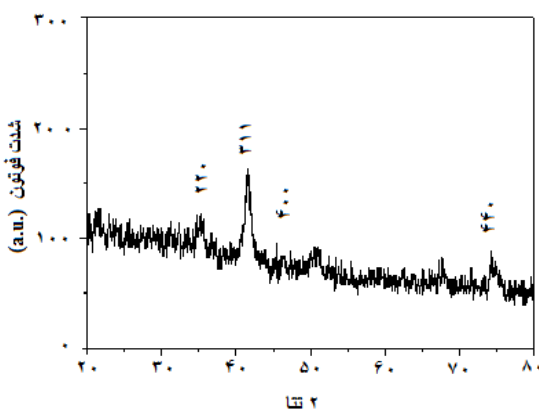
<sup>4</sup> Green synthesis

<sup>5</sup> De Man Rogosa and Sharpe Broth

یون‌های آهن توسط عصاره سیتو پلاسمی لاکتوباسیلوس فرمنتوم به رنگ سیاه درآمد.

### آنالیز XRD<sup>۵</sup>

به منظور اثبات تشکیل نانوذرات اکسید آهن آنالیز XRD انجام گرفت. با توجه به شکل (۱) براساس یافته‌های به دست آمده پیک‌ها مربوط به زوایای  $2\theta$  برابر  $35.43, 47.74, \dots$  بود که به ترتیب مربوط به اندیس‌های میلر در سطوح  $220, 311, 400, 440$  است. این پیک‌ها با الگوی پراش اشعه X ماده  $Fe_3O_4$  تطابق داشته و فاز جانبی دیگری مشاهده نمی‌شود. اندازه نانوذرات به کمک رابطه دبای شرر ۱۵ نانومتر محاسبه شد.



شکل ۱- منحنی پراش پرتو ایکس نانوذرات اکسید آهن سنتز شده به روش سبز، اندازه نانوذرات را ۱۵ نانومتر نشان داد

### آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری

تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM<sup>۶</sup>) نانوذرات اکسید آهن سنتز شده در شکل (۲) نشان داده شده است. این تصاویر برای تأیید مرفولوژی و اندازه نانوذرات اکسید آهن استفاده می‌شود. با توجه به تصویر نانوذرات اکسید آهن دارای شکل کروی و اندازه نانوذرات بین ۱۵-۱۰ نانومتر است.

### نتایج حاصل از فعالیت ضد میکروبی تأثیر نانوذرات اکسید آهن بر علیه باکتری های استافیلوکوکوس آرتوس و سودوموناس آئروجینوزا

مطابق روش انتشار چاهک، اثر ضد میکروبی غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰، میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانو ذرات اکسید آهن سنتز شده به روش سبز بر روی دو باکتری استافیلوکوکوس آرتوس و سودوموناس آئروجینوزا بررسی شد. نتایج حاصل از میانگین قطر هاله عدم رشد بیانگر آن است که غلظت‌های

ایکس مدل (Philips 1×1800) استفاده شد. نمونه بر روی بستر شیشه‌ای قرار داده شد و اسکن با زاویه  $2\theta$  و محدوده  $2\theta$  تا ۸۰ درجه انجام شد. ولتاژ استفاده شده ۴۰KV و جریان ۳۰ میلی آمپر بود. اندازه ذرات با استفاده از رابطه دبای شرر و از طریق فورمول زیر محاسبه گردید:

$$D = 0.9\lambda / \beta \cos\theta$$

جهت بررسی شکل و اندازه نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل (Philips 208S 100Kv, Netherlands) استفاده شد. ابتدا نانوذرات بر روی توری مسی پوشیده شده از کربن ثابت و پس از خشک شدن با لامپ مادون قرمز عکس برداری با دقت ۲/۳۲ آنکسترم انجام شد.

### تهیه سوبه‌های میکروبی و بررسی اثرهای ضد میکروبی نانوذرات اکسید آهن سنتز شده

سوبه‌های میکروبی استاندارد باکتری استافیلوکوکوس آرتوس (ATCC 25923) و سودوموناس آئروجینوزا (ATCC 27853) از شرکت داروش تهران خریداری گردید. در این روش سوش استاندارد باکتری استافیلوکوکوس آرتوس بر روی محیط کشت بلاد آگار و سودوموناس آئروجینوزا روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. در نهایت جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید آهن از روش انتشار از چاهک استفاده شد (۵). در این روش ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده به روش جارویی در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار با کدورت نیم مک فارلند ( $10^8$  CfU/ml)  $1/5 \times$  به طور یکنواخت کشت داده شد. سپس در سطح محیط چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌لیتر حفر نموده و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات اکسید آهن سنتز شده درون چاهک مربوطه ریخته شد. از ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی و سوسپانسیون آنتی‌بیوتیک خالص سفالکسین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به ترتیب به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت استفاده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد (۵). تمام داده‌ها و نتایج حاصل از پژوهش توسط آزمون واریانس یک طرفه آنالیز و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel (version 2010) ترسیم گردید.

### یافته‌ها

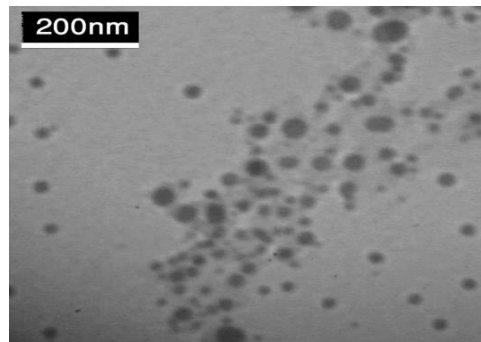
اولین نشانه از تشکیل نانوذرات اکسید آهن تغییر رنگ محلول بعد از سه هفته بود. رنگ محلول سولفات آهن بعد از احیاء

<sup>5</sup> X-ray powder diffraction

<sup>6</sup> Transmission Electron Microscopy

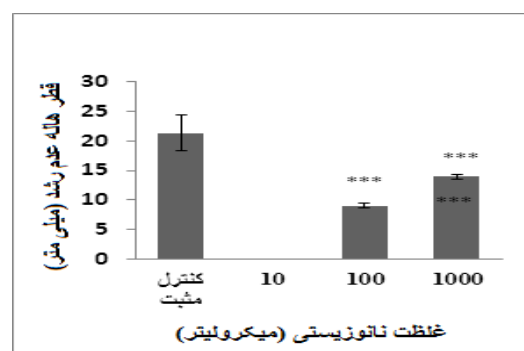
## بحث

در تولید بیولوژیکی، میکروارگانیسم‌ها قادرند یون‌های فلزی را احیاء کننده که در این فرآیند احیاء انواعی از آنزیم‌ها، پلی-ساکاریدهای خارج سلولی و مواد احیاء کننده، مؤثر هستند. یکی از دلایل تولید نانوذرات فلزی توسط میکروارگانیسم‌ها، کاهش اثرهای سمی یون‌های فلزی موجود در محیط رشد میکروب‌ها است (۶). میکروارگانیسم‌ها این عمل را از طریق احیاء بیولوژیکی یون‌های فلزی سمی (با استفاده از آنزیم‌های خاص NADH ردوکتاز و یا نیترات ردوکتاز) به عناصر فلزی با سمیت کم‌تر، انجام می‌دهند، علاوه بر این حضور برخی پلی-ساکاریدها و مواد آلی تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها در درون سلول‌ها و نیز محیط کشت سبب تولید نانوذرات فلزی می‌گردد. این مواد آلی از طریق گروه‌های عملکردی خود مانند سیستمین، هیستیدین، آلدئیدها، کتون‌ها و... موجب احیاء یون‌های فلزی به ناذرات فلز می‌شوند (۶). نتایج به‌دست آمده در این تحقیق حاکی از آن است که عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس فرمنتوم توانایی تولید نانوذرات اکسید آهن را دارد، نانوذرات تولید شده کوچک، با اندازه ۱۵ نانومتر و کروی شکل هستند. در این راستا در مطالعه‌ای توسط امید و همکاران در سال ۲۰۱۴ در بررسی سنتز نانوذرات نقره توسط مایع رویی باکتری لاکتوباسیلوس فرمنتوم، اندازه نانوذرات نقره تولید شده را بسیار کوچک و با اندازه متوسط ۱۵ نانومتر، با شکل کروی و تأثیر پذیری بالا بیان کردند (۴). مطالعه‌های هواگ و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که میانگین اندازه نانوذرات آهن سنتز شده توسط برگ گیاه کاملیاسینسیس ۵ تا ۱۵ نانومتر است (۷). مقایسه مطالعه حاضر با سایر مطالعه‌های بیانگر آن است که نانوذرات اکسید آهن به‌دست آمده با استفاده از عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس فرمنتوم در راستای سایر مطالعه‌های است و این روش را می‌توان یک روش مؤثر و کارآمد، بدون استفاده از عوامل شیمیایی احیاء کننده و پایدارکننده برای سنتز نانوذرات اکسید آهن دانست و به‌نظر می‌رسد، به‌دلیل احیاء یون‌های فلزی توسط آنزیم‌های اکسیداسیون احیاء و سایر ترکیب‌های احیاء کننده در عصاره سیتوپلاسمی لاکتوباسیلوس فرمنتوم، نانوذرات اکسید آهن سنتز گردیده است. در سال‌های اخیر، مقاومت به دارو یک



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی نانو ذرات اکسید آهن سنتز شده به روش سبز، شکل نانو ذرات را کروی و میانگین اندازه آن را ۱۵-۱۰ نانومتر نشان داد. Bar=150 nm

۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانو ذرات سنتز شده به روش سبز اثرهای ضد میکروبی مؤثری را بر علیه *استافیلوکوکوس آرتوس* نشان داده درحالی که بر علیه باکتری *سودوموناس آتروجینوزا* اثرهای مهاری مشاهده نشد. نتایج آنالیز آماری حاصل از بررسی مقایسه اثر ضد میکروبی نانوذرات اکسید آهن تولید شده به روش سنتز سبز نسبت به گروه کنترل مثبت بر روی باکتری *استافیلوکوکوس آرتوس* بیانگر آن است که غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل مثبت به‌طور معناداری ( $p \leq 0/001$ ) اختلاف نشان می‌دهد، مقایسه غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات اکسید آهن سنتز شده بیانگر آن است که اختلاف معناداری در سطح ( $p \leq 0/001$ ) بین این دو غلظت دیده می‌شود. نتایج حاکی از آن است که با افزایش غلظت نانوذرات اثر ضد میکروبی افزایش یافته و اثرهای ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده وابسته به دوز است (نمودار ۱).



نمودار ۱- اثر ضد میکروبی نانوذرات سنتز شده سبز بر علیه *استافیلوکوکوس آرتوس*. هر نقطه روی نمودار بیانگر میانگین سه روز آزمایش و هر روز سه تکرار است. Error bar = Mean  $\pm$  SD. ستاره‌های بالای نمودار مقایسه غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سنتز سبز نسبت به کنترل مثبت و ستاره‌های زیر نمودار مقایسه غلظت ۱۰۰۰ نسبت به ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. نمودار بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار ترسیم شده است و سطح معنی دار به شکل ( $P \leq 0/05$ )، ( $P \leq 0/01$ )، ( $P \leq 0/001$ ) در نظر گرفته شده است.

نگرانی جهانی است زیرا مصرف نامناسب و غیرمنطقی داروهای ضد میکروبی، شرایط مناسبی را برای ایجاد میکروب‌های مقاوم به دارو، فراهم می‌کند. عفونت‌هایی که به علت میکروارگانیزم‌های مقاوم ایجاد می‌شوند به درمان‌های معمول پاسخ نمی‌دهند و این امر منجر به طولانی شدن بیماری و افزایش خطر مرگ می‌گردد. نانو مواد به علت خصوصیت‌های ویژه‌ای چون بزرگ بودن نسبت سطح به حجم و فعالیت واکنشی بالا از اهمیت زیادی برخوردار هستند. نانوذرات در شرایط نامساعد مانند دمای بالای استریلیزاسیون، که آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم غیرفعال می‌شوند، فعال هستند. از طرفی دیگر اثبات شده است نانوذرات اکسید فلزی هم‌چون آهن، منیزیوم و روی در مقایسه با نانوذرات نقره و مس از سمیت کم‌تری در بدن برخوردارند اما به دلیل داشتن فعالیت ضدباکتریایی مؤثر بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی و هم‌چنین کم هزینه بودن، این نانوذرات می‌توانند کاندید انتخابی مناسب جهت مقابله و پیش‌گیری از عوامل بیماریزا باشند (۸،۹). نتایج حاصل از ارزیابی اثرهای ضد میکروبی مطالعه حاضر بیانگر آن است که نانوذرات سبز اثرهای ضد میکروبی مؤثری را بر علیه *استافیلوکوکوس آئروجینوزا* نشان داده در حالی که بر علیه *سودوموناس آئروجینوزا* فاقد اثرهای مهاری است. با وجودی که اثرهای کشندگی نانوذرات سنتز شده سبز به اندازه کنترل مثبت نیست، ولی با افزایش غلظت، اثر کشندگی نانو ذرات بر علیه باکتری افزایش یافته است. پس در یک دیدگاه کلی نتایج حاصله حاکی از آن است که غلظت نانوذرات اکسید آهن سنتز شده با استفاده از عصاره سیتوپلاسمی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* با خاصیت ضد میکروبی آن نسبت مستقیم دارد. به طوری که در غلظت‌های بالاتر نانوذرات اثر ضد میکروبی بیش‌تری را بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس آئرووس* از خود نشان داده است. در مطالعه انجام شده توسط ابراهیمی‌نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز نشان داده شد که، نانوذرات اکسید آهن مانند یک شمشیر دو لبه عمل کرده و در غلظت‌های بالا اثرهای مخرب-شان بر روی میکروارگانیزم‌ها بیش‌تر از اثرهای مفیدشان است و میزان افزایش رشد میکروبی وابسته به غلظت نانوذرات بوده و در غلظت‌های اندک، نانوذرات می‌توانند به عنوان منابعی جهت تأمین یون آهن مورد نیاز میکروارگانیزم عمل کرده و

رشد را بهبود بخشند و با افزایش غلظت نانوذرات اثرهای مانع کننده از رشد پدیدار می‌شوند (۱۰). در مطالعه ما مشخص شد که بسته به نوع باکتری‌ها اثرهای مهاری نانوذرات متفاوت بوده و باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس آئروس* نسبت به باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروجینوزا* حساسیت بیش‌تری از خود نشان داده است. در این راستا رایبی و همکاران در سال ۲۰۰۸ طی تحقیقی نشان دادند حساسیت باکتری‌ها نسبت به نانوذرات فلزات مختلف وابسته به گونه باکتری تولید کننده نانوذرات، سایز، شکل و غلظت نانوذرات و نوع نانوذرات تولیدی و نیز شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط واکنش است (۱۰). از آن‌جائی که باکتری‌های گرم مثبت دارای دیواره سلولی با محتوی پپتیدوگلیکان چند لایه و ضخیم هستند در حالی که باکتری‌های گرم منفی دارای پپتیدوگلیکان نازک‌تر اما غشای خارجی آن‌ها دارای لیپو پلی ساکارید است که نفوذ پذیری کمی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل ضد میکروبی دارد. به همین دلیل مقاومت باکتری‌های گرم منفی بیش‌تر از باکتری‌های گرم مثبت است (۱۳، ۱۲). اختلاف بین بار منفی میکروارگانیزم و بار مثبت نانوذرات، به صورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذرات عمل کرده و به دنبال اتصال نانوذرات به سطح سلول باعث مرگ سلول می‌شود. در نهایت تعداد زیادی از این تماس‌ها منجر به اکسید شدن مولکول‌های سطحی میکروب‌ها و مرگ سریع آن‌ها می‌شوند (۱۳) البته این امکان وجود دارد که برخی باکتری‌ها ی گرم مثبت در برابر تنش حاصله اسپور مقاوم تشکیل دهند که در این صورت امکان حذف آن‌ها با هر ترکیب شیمیایی و غیر شیمیایی سخت‌تر خواهد شد. احتمال داده می‌شود یون‌های آزاد شده از نانو مواد با گروه‌های تیول پروتئین‌های سطحی سلول‌های باکتریایی واکنش دهند. تعدادی از این پروتئین‌های غشای سلول‌های باکتریایی عمل انتقال مواد معدنی از سطح دیواره را به عهده دارند؛ که نانو مواد با اثر بر روی این پروتئین‌ها باعث غیر فعال شدن و نفوذناپذیری غشاء می‌شوند. در مطالعه ما مشخص شد نانوذرات اکسید آهن بر اساس نسبت سطح به حجم، با اندازه میانگین ۱۵-۱۰ نانومتر و شکل کره‌ای خود توانستند خاصیت ضدباکتریایی متفاوتی را نشان دهند. در همین راستا مونتیرو و همکاران در سال

۲۰۰۹ در بررسی تأثیرهایی آنتی باکتریال نانوذرات نقره بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرنوس* و *اشرشیاکلای* بیان نمودند که نانوذرات نقره با اندازه ۱۴ نانومتر و به شکل کروی قادر به حذف درصد بالایی از باکتری‌های مذکور هستند (۱۴). کاواتا و همکاران در سال ۲۰۰۹ عنوان کردند که، کبالت و آهن در مقایسه با سایر نانوذرات اکسید فلزی مثل نقره دارای اثرهای زیست سازگاری بهتری هستند و نیز قدرت اثرگذاری مناسبی را از خود نشان می‌دهند لذا یک عامل انتخابی مناسب برای کاربردی نمودن این نانوذرات جهت مقابله و پیش‌گیری از این عوامل بیماری‌زا هستند (۸).

### نتیجه‌گیری

مقایسه پژوهش حاضر با سایر پژوهش‌ها بیانگر این است که با کاهش اندازه نانوذرات آهن شاهد اثر ضد میکروبی بهتری هستیم و این می‌تواند به احتمال به دلیل افزایش سطح به حجم نانوذرات اکسید آهن و در دسترس بودن سطح بیشتری جهت واکنش با پروتئین‌های باکتریایی و یا به دلیل قابلیت نفوذ بیشتر نانوذرات کوچک‌تر به درون سلول باکتری باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نیز نشان داد که به‌طور کلی سنتز نانوذرات مبتنی بر شیمی سبز را می‌توان یک روش ایمن، ساده و دوست‌دار با محیط زیست معرفی نمود و با انجام

1. Mandal D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006; 69(5): 485–92.
2. Athirah Nur A. Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles on Multi Drug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. *World Acade of Science, Engineering & Technology (WASET)*. 2012; 6 (7): 258-261.
3. Wang Z, Zhang L, Tan T. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* GS<sub>2</sub> for selenium-enriched yeast production. *Korean J Chem Engin*. 2010; 27(6): 1836-1840.
4. Omid B, Hashemi J, Bayat M, Larijani K. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Lactobacillus fermentum*. *Bull. Env. Pharmacol Life Sci*. 2014; 3(12): 186-192.
5. Dutta PK, Tripathi S, Mehrotra GK, Dutta J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem*. 2009; 114 (4): 1173–1182.
6. Mollazadeh Moghaddam K. An introduction to microbial metal nanoparticle preparation method. *J Young Invest*, 2010; 19(19): 18-24.
7. Hoag GE, Collins JB, Holcomb JL, Hoag JR, Nadagouda MN, Varma RS. Degradation of bromothymol blue by greener nanoscale zero valent iron synthesized using tea polyphenols. *J Mater Chem*. 2009; 19(45): 8671–8677.
8. Kawata K, Osawa M, Okabe S. In vitro toxicity of silver nanoparticles at non-cytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol*. 2009; 43(15): 6046-6051.
- 9- Tayel AA, El-Tras WF, Moussa S ,El-Baz AF, Mahrous H, Salem MF, et al. Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens. *J Food Saf*. 2011; 31(2): 211-8.
10. Ebrahiminezhad A, Davaran S, Rasoul-Amini S, Barar J, Moghadam M, Ghasemi Y. Synthesis characterization and anti-*Listeria monocytogenes* effect of amino acid coated magnetite nanoparticles. *Curr Nanosci*. 2012; 8(6): 868-874.
11. Rai M, Yadave A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009; (27)1: 76-83.
12. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007; 3(1): 95-101.
13. Feng Q, Wu J, Chen G, Cui F, Kim T, Kim J. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*. 2000; 4(52): 662-668.
14. Moniteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, Camargo-Barbosa DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effects of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob*. 2009; 2(34): 103-110.