# The synergy effect of nanoparticles of magnesium oxide and antibiotics on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*

**Siasi E. [*], Mehrabian S., Rafiei A.**

*Department of Microbiology, Faculty of Biological science, Islamic Azad University, Tehran North Branch, emi_biotech2006@yahoo.com*

## Abstract

Aim and Background: Prevalence of multidrug resistant bacteria,to be necessary simultaneous use of metal nanoparticles and antibiotics for synergistic antimicrobial effects. In this study was studied the synergy antimicrobial effect of magnesium oxide nanoparticles specific concentrations with antibiotics on the standard strains of *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and Methods: After preparation of nano particles and bacteria was used antibiogram by disk diffusion. The antimicrobial properties of nanoparticles were studied by using MIC (Minimum Inhibition concentration) and MBC (Minimum Bactericidal concentration), blank discs and liquid medium. Synergistic effects for bacteria were detected by combining of specific concentration of nanoparticles with antibiotic disks and solution of antibiotics (well-method).

Results: The results of the MIC and MBC and liquid medium were confirmed antimicrobial properties of these nanoparticles. *E. coli* other than the bacteria was more sensitive to lower concentrations of the nanoparticles. Synergistic effect was showed between different concentrations of nanoparticles with methicillin disk in *E. coli* but, synergistic effect can be observed for three bacteria in the well-method.

Conclusion: The results showed synergy effect was observed in all of the bacteria at low concentrations with antibiotics, so this property can be used to reduce the dosage and number of consuming antibiotics.

Keywords: Magnesium oxide nanoparticles, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

# بررسی اثر سینرژیسمی نانو ذره منیزیوم اکساید و آنتی بیوتیک‌ها بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا

**الهام سیاسی*، صدیقه مهرابیان، علی رفیعی**

*گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران*

## چکیده

**سابقه و هدف:** شیوع باکتری‌های مقاوم به چند دارو لزوم استفاده هم زمان از نانو ذرات فلزی و آنتی‌بیوتیک‌ها را که سبب افزایش خاصیت ضد میکروبی و اثر بخشی آنها می‌گردد، مشخص نموده است. در این مطالعه تأثیر ضد میکروبی نانو ذرات منیزیوم اکساید و تأثیر سینرژیسمی آن در غلظت‌های مشخص با آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی سویه‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** پس از تهیه باکتری‌ها و نانو ذرات، آنتی بیوگرام به روش دیسک گذاری انجام شد. خاصیت ضد میکروبی نانو ذرات به روش حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی، دیسک بلانک و کشت بر روی محیط مایع مورد بررسی قرار گرفت. اثر سینرژیسمی ترکیب غلظت‌های مشخص نانو ذرات با دیسک‌های آنتی بیوتیکی و با محلول آنتی بیوتیک‌ها (با روش چاهک گذاری) برای هر باکتری انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی و کشت بر روی محیط مایع خاصیت ضد میکروبی بودن این نانو ذره را نشان داد. باکتری اشریشیاکلی نسبت به دو باکتری دیگر به غلظت‌های پایین‌تر این نانو ذره حساس بود. اثر سینرژیسمی نانو ذره تنها با دیسک متی سیلین در اشریشیاکلی نشان داده شد ولی برای هر سه باکتری با چاهک گذاری اثر سینرژیسمی مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد برای هر سه باکتری در غلظت‌های پایین نانو ذره با آنتی بیوتیک‌ها اثر سینرژیسمی وجود دارد که می توان از این خاصیت برای کاهش تعداد و میزان دوز آنتی‌بیوتیک‌های مورد مصرف استفاده نمود.

**کلمات کلیدی:** نانو ذرات منیزیوم اکساید، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا

## مقدمه

ظهور مقاومت و اثرات جانبی، استفاده از آنتی بیوتیک ها را به شدت محدود کرده است. ترکیبات بیولوژیکی در مقیاس نانو دارای خصوصیات فیزیکی- شیمیایی بی همتایی می باشند که در سال های اخیر کارایی چندین رده از نانو حامل ها و نانو ذرات آنتی میکروبیال در درمان بیماری های عفونی به اثبات رسیده است. همچنین استفاده از نانو ذرات به عنوان نشانگر در تشخیص مولکولی به جای نشانگرهای فعلی باعث افزایش حساسیت قابلیت انتخاب و ظرفیت چند بعدی شناسائی گردیده است. مواد در مقیاس نانو (۱۰۰-۱ نانومتر)، نسبت سطح به حجم بالاتر، خصوصیات الکتریکی، مغناطیسی، و نوری تغییر یافته و واکنش پذیری بالاتری را نشان می دهند (۱). برخی نانو ذرات فلزی دارای فعالیت ضد میکروبی ذاتی می باشند. این ذرات در زمینه کنترل بیماری های عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرند و پاتوژن های میکروبی قادر به توسعه مقاومت در مقابل این ذرات نمی باشند. نانو ذراتی که خاصیت ضد باکتریایی دارند شامل فلزات و و اکسیدهای فلزی اند، که به طور طبیعی پایه ضد میکروبی آنها بر اساس نانو مواد کربنی و نانو امولسیون های مبتنی بر سورفاکتانت است (۲). مکانیسم‌های ضد میکروبی نانو ذرات عبارتند از، تولید فتوکاتالیستی اکسیژن فعال سطحی (ROS) که به ترکیبات ویروسی و سلولی آسیب می رساند، به خطر انداختن دیواره و غشاء باکتری، ایجاد وقفه در انتقال انرژی، مهار فعالیت آنزیمی و سنتز DNA (۳). نانوذرات ضد میکروبی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های متداول مزیت‌های فراوانی درکاهش اثرات جانبی داروها، مقاومت و هزینه‌های درمان عرضه می‌کنند.

**آدرس نویسنده مسئول:** گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

**پست الکترونیکی:** emi_biotech2006@yahoo.com

**تاریخ دریافت مقاله:** ۱۳۹۹/۰۷/۱۴

**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۷/۲۳

نانو حامل‌های دارویی نیز در زمینه‌های بهبود فارماکوکنیتیک داروها و کاهش اثرات جانبی تأثیر قابل توجهی دارند. از لحاظ تئوری، نانو حامل‌ها در مقایسه با مولکول‌های آنتی‌بیوتیک در بدن طولانی تر نگه داشته می‌شوند که برای رسیدن به اثرات درمانی بلند مدت مفید می‌باشد. تحویل آنتی بیوتیک به وسیله نانو ذرات موجب مزایایی از جمله، توزیع کنترل شده و نسبتا یکنواخت در بافت هدف، بهبود انحلال، انتشار پایدار و کنترل شده، بهبود رضایت بیمار، کاهش عوارض جانبی، افزایش ورود به درون سلول، شده است (۴). همچنین نانو ذرات بوسیله مکانیسم هایی با مقاومت میکروبی مبارزه می‌کنند که عبارتند از، عملکردهای چندگانه و هم زمان اثرگذاری بر میکروب‌ها و بسته‌بندی ترکیبات ضد میکروبی متعدد در درون این ذرات، که بر کاهش جذب دارو توسط باکتری غلبه کرده و انتشار آن را افزایش می‌دهند (۷ ، ۶ و ۵). از تشکیل بیوفیلم جلوگیری یا بر آن غلبه می‌کنند و با باکتری‌های درون سلولی مبارزه می‌کنند (۸) و عامل ضد میکروبی را در محل عفونت هدف قرار می‌دهند (۹). بنابراین فناوری نانو، نویدبخش پیشرفت‌های گسترده‌ای در تمامی زمینه‌های ایمنی‌سازی، طراحی دارو، دارورسانی، تشخیص و کنترل بیماری‌های عفونی می‌باشد (۱۰).

منیزیوم اکساید یکی از مواد معدنی مهم است که دارای محل‌های اتصال فراوان است (۱۱) و در بسیاری از موارد مورد استفاده قرار می‌گیرد از جمله برای تجزیه، کاتالیزور پشتیبان، سم زدایی باقی مانده زباله‌ها، مواد نسوز و جاذب، افزودنی در روغن سوخت سنگین، ابر رسانا در باتری‌های یونی لیتیومی (۱۲). در پزشکی از منیزیوم اکساید برای تسکین سوزش معده، درد معده و بازسازی استخوان استفاده می‌شود (۱۳). به تازگی از نانو ذرات منیزیوم اکساید به عنوان نشانگر در درمان سرطان استفاده شده است (۱۴). برای نانو ذرات منیزیوم اکساید خاصیت ضد میکروبی مشاهده گردیده که با مکانیسم‌های ذیل اثربخش است. اتصال راحت به غشاء باکتری و تخریب آن، نفوذ به سلول و اتصال به یک هدف خاص، تولید اکسیژن فعال بر روی سطح خود که به نوبه خود استرس‌های اکسیداتیو درون سلولی را

تحریک و افزایش می‌دهد. همچنین باکتری به سختی می تواند در برابر این نانو ذرات مقاومت پیدا کند زیرا نیاز به جهش در چندین ژن دارد. فعالیت ضدباکتریایی نانو ذرات منیزیوم اکساید به شدت وابسته به اندازه و غلظت ذرات است و در برابر هردو طیف باکتری گرم مثبت و منفی موثر است (۱۶ ، ۱۵). این نانو ذره به عنوان یک عامل ضد میکروبی مؤثر در نظر گرفته می‌شود، زیرا هم برای سلول های پستانداران و هم برای محیط زیست بی ضرر است. همچنین نانو ذرات منیزیوم اکساید به تنهایی یا در ترکیب با دیگر مواد به عنوان یک عامل ضد میکروبی برای بهبود سلامت مواد غذایی پیشنهاد شده است (۱۷). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که مکانیسم ضد باکتری نانو ذرات منیزیوم اکساید با توجه به شکل‌گیری اکسیژن فعال مانند آنیون سوپر اکسید است. همچنین باکتری‌های گرم منفی و مثبت و باکتری‌های اسپوردار با قرار گرفتن در معرض منیزیوم اکساید با گذشت ۲۰ دقیقه کاملاً غیر فعال می شوند. غیر فعال شدن عوامل پاتوژن ممکن است به فاکتور - های مختلفی از قبیل تماس نانو ذرات منیزیوم اکساید با باکتری، شرایط قلیائی سطح ذره و سطح تماس ویژه، زمان تماس و دسترسی به اکسیژن سطحی وابسته باشد (۱۸). همچنین ترکیبات فعال رادیکالی با حمله به گروه‌های کربونیل موجود در پیوند پپتیدی می‌توانند باعث تخریب پروتئین شوند و ذرات با اندازه کوچک می‌توانند یون‌های سوپراکسید بیشتری تولید کنند و فرایند نابودی باکتری‌ها را سرعت بخشند. بنابراین هدف از این تحقیق شناسائی و درمان بیماری‌های عفونی با استفاده از نانو ذرات آنتی میکروبیال و نانو حامل‌های دارویی بود و به بررسی اثر ضد میکروبی محلول نانو ذرات منیزیوم اکساید بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا و اثر ضد میکروبی این نانو ذرات به همراه چند آنتی بیوتیک که باکتری‌ها نسبت به آنها مقاوم شده‌اند، پرداخته شده است تا بتوان از آن نانو ذرات در درمان مؤثرتر عفونت‌ها استفاده نمود.

## مواد و روش‌ها

**۱- تهیه محلول اولیه و کشت باکتری‌ها**

باکتری‌های مورد نظر (استافیلوکوکوس اورئوس سویه استاندارد ATCC25923، اشریشیاکلی سویه استاندارد ATCC25922 و سودوموناس ائروژینوزا سویه استاندارد ATCC27853 به صورت پودر آماده تهیه گردید. برای تهیه سوسپانسیون اولیه از باکتری‌های مورد نظر ۲ سی سی از محلول BHI براث را به درون باکتری‌ها به وسیله سرنگ استریل تزریق کرده و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس به وسیله فیلدوپلاتین باکتری را بر روی محیط BHI آگار کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد.

**۲- رنگ آمیزی گرم**

از نمونه های سه باکتری کشت یافته لام گسترش تهیه شد و رنگ آمیزی گرم انجام گرفت.

**۳- کشت باکتری‌ها در محیط‌های کشت افتراقی**

باکتری‌های استاندارد بر روی محیط‌های کشت بیوشیمیایی شامل TSI، مانیتول سالت آگار، سیمون سیترات، SIM، MRVP، اوره آز، EMB، مک کانکی آگار، بلادآگار کشت داده شدند و مورد بررسی قرار گرفتند.

**۴- تست آنتی‌بیوگرام با روش دیسک گذاری**

ابتدا سوسپانسیون باکتری تهیه شد به این ترتیب که سه لوله بلند جدا کرده و در هر لوله ۳ سی سی آب مقطر ریخته و آن را به وسیله اتوکلاو استریل کرده سپس به وسیله لوپ استریل یک کلنی از هر یک از ۳ باکتری مورد مطالعه، که به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شده بودند جدا کرده و در کنار شعله آن را در هر لوله حل کرده و بر روی ورتکس قرار داده شد و میزان کدورت با لوله نیم مک فارلند مقایسه شد. سپس به وسیله یک سواپ استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار از سوسپانسیون تهیه شده از هر باکتری کشت متراکم داده شد. سپس به وسیله یک پنس استریل دیسک های آنتی بیوتیکی شامل آمپی سیلین، آمیکاسین، اریترومایسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، تری متوپریم سولفامتانول، افلوکساسین، نالیدیک اسید، پنی سیلین، آموکسی سیلین- کلاولانیک اسید، متی سیلین، کلرامفنیکل، در فاصله‌ای معین و

در کنار شعله و با فشاری کم روی محیط کشت ثابت شد و پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

**۵- آماده سازی باکتری‌ها برای انجام آزمایش ضد باکتریایی نانو ذرات منیزیوم اکساید**

باکتری‌هایی که مقاومت آنتی بیوتیکی داشتند انتخاب شدند و آنها در محیط کشت BHI براث کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. رشد باکتری ها به وسیله اسپکتروفتومتر بررسی شد (باکتری کشت داده شده بر روی محیط BHI براث دارای OD ۰/۱ در ۶۰۰ نانومتر بود که غلظتی معادل CFU/ml ۱۰^۸ داشت). سپس تست آنتی بیوگرام به روش‌های دیسک گذاری و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) انجام گرفت. برای این منظور محلول هایی با غلظت مشخص از ذرات نانو تهیه شد.

**۵-۱- تهیه محلول اصلی نانو ذرات منیزیوم اکساید**

نانو ذرات منیزیوم اکساید در اندازه‌های ۲۰ نانومتر و به صورت پودر و خلوص بالای ۹۹ درصد بود. برای تهیه استوک اولیه از نانو ذرات ابتدا ۵۰ میلی لیترآب مقطر را به وسیله مزور اندازه گرفته و درون ارلن ۱۰۰ میلی لیتر ریخته و آن استریل شد. سپس به وسیله یک قاشک استریل ۱ گرم نانو ذره را به اب مقطر اضافه کرده و یک مگنت استریل در داخل ارلن انداخته و برای به دست آوردن یک محلول همگن بر روی ورتکس قرار داده شد. غلظت نهایی محلول ساخته شده برابر ppm ۲۰۰۰۰ بود.

**۵-۲- تهیه رقت‌های مختلف از محلول اصلی نانو ذرات منیزیوم اکساید**

برای این منظور ۱ میلی لیتر آب مقطر به ۵ لوله کوتاه اضافه نموده و به وسیله اتوکلاو استریل شدند. سپس از محلول اصلی نانو ذرات منیزیوم اکساید به وسیله پیپت استریل ۱ میلی لیتری، ۱ میلی لیتر به لوله اول اضافه کرده و لوله اول را ورتکس کرده و سپس به وسیله یک پیپت دیگر ۱ میلی لیتر از لوله اول برداشته و به لوله دوم اضافه شد. این کار تا لوله 5 ادامه پیدا کرد و در اخر ۱ میلی لیتر از لوله ۵ به بیرون ریخته شد. به این ترتیب از لوله شماره ۱ تا ۵ غلظت‌هایی از ppm ۶۲۵ تا ppm ۱۰۰۰۰ از محلول نانو ذرات تهیه شد.

**۵-۳-روش انجام آزمون آنتی بیوگرام به روش دیسک‌گذاری**- ابتدا برای تهیه سوسپانسیون باکتری‌ها از کشت ۲۴ ساعته هر یک از آن ها در محیط BHI، به وسیله لوپ استریل یک کلنی از هر باکتری را در لوله های آب مقطر حل کرده و کدورت آن با لوله نیم مک فارلند مقایسه شد. سپس با سواپ استریل باکتری ها بر روی محیط کشت مولر هینتون کشت داده شدند و بعد با یک پنس استریل از دیسک های آغشته به هر کدام از رقت های نانو ذرات برداشته و بر روی محیط کشت قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از نظر تشکیل هاله عدم رشد بررسی شدند.

**۵-۴- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)**

ابتدا به وسیله پیپت استریل و در کنار شعله ۱ میلی لیتر از هر یک از رقت های نانو ذرات منیزیوم به هر یک از ۵ لوله حاوی محیط کشت اضافه شده و ورتکس شدند. به این ترتیب بعد از افزودن نانو ذرات به محیط کشت رقت ها از ppm ۳۳۳۳/۳۳ تا ppm ۲۰۸/۳۳ بودند. در آخر به هر یک از لوله ها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد. سپس لوله ها در انکوباتور شیکردار در دور ۲۲۰ و دمای دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. سپس از روی عدم کدورت در لوله و عدم رشد باکتری در پلیت حاوی محیط کشت بدون نانو ذرات غلظت های MIC (حداقل غلظت بازدارندگی رشد باکتری) و MBC (حداقل غلظت کشندگی باکتری) تعیین شدند.

**۶- بررسی اثر سینرژیسم نانو ذرات منیزیوم اکساید به همراه آنتی بیوتیک**

**۶-۱- افزودن غلظت‌های مختلف نانو ذره با دیسک گذاری**

بعد از تهیه سوسپانسیون باکتری در سه لوله حاوی ۵ میلی لیتر آب مقطر که غلظتی معادل CFU/ml ۱۰^۸ داشت، به

وسیله یک سواپ استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت متراکم از باکتری‌ها تهیه شد. سپس دیسک‌های آنتی بیوتیک شامل، آمپی سیلین، آمیکاسین، اریترومایسین، تری متوپریم، سولفامتانول، نالیدیکسیک اسید، پنی سیلین، آموکسی سیلین- کلاولانیک اسید، متی سیلین، کلرامفنیکل به رقت‌های مختلف نانو ذره به وسیله سمپلر آغشته شدند و روی محیط کشت قرار داده شدند. پاسخ هاله عدم رشد پس از ۲۴ ساعت انکوبه در دمای ۳۷ درجه اندازه گیری شد.

**۶-۲- افزودن غلظت های مختلف نانو ذره با چاهک گذاری**

از سوسپانسیون باکتریایی که غلظتی معادل $10^8$ CFU/ml داشت کشت متراکم بر روی محیط کشت مولر هینتون اگار تهیه شد. سپس به وسیله پیپت پاستور استریل بر روی محیط‌های کشت چاهک هایی با قطری معادل ۵ میلی متر ایجاد شد. انتهای چاهک‌ها به وسیله محیط آگار- آگار پر شد. در سه چاهک به عنوان شاهد فقط ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آنتی بیوتیک‌ها ریخته شد. در ۵ چاهک دیگر از رقت های مختلف نانو منیزیوم اکساید به میزان ۴۰ میکرولیتر به همراه ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون محلول آنتی بیوتیک‌ها اضافه شد.

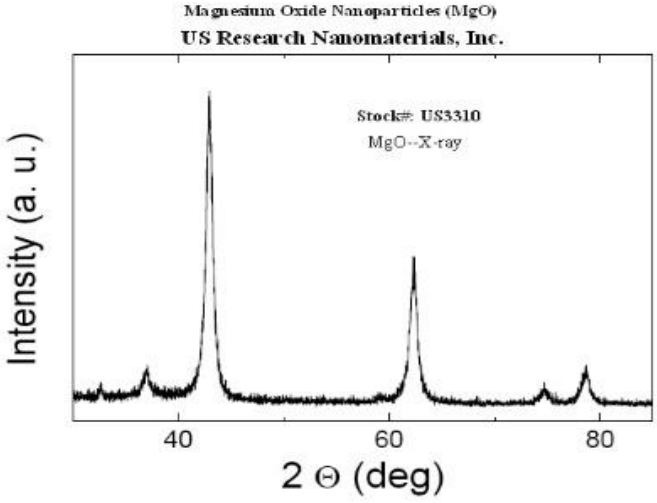
**۷- انالیز آماری نتایج**

به طور کلی برای مقایسه قطر هاله عدم رشد در بین سه نوع عامل بازدارنده، شامل نانو ذرات، آنتی بیوتیک‌ها و آنتی بیوتیک‌ها به همراه نانو ذرات از تست One Way ANOVA استفاده شد. این تست برای هر یک از آنتی بیوتیک‌ها در هر یک از باکتری به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتیجه این تست مشخص می‌شود که آیا تغییر قطر هاله عدم رشد (کاهش یا افزایش) اثر سینرژیسمی است و یا اثر افزایشی و یا اثر آنتاگونیستی و یا بدون اثر بوده است و نتایج مشخص می نماید که استفاده هم زمان آن نوع از آنتی بیوتیک با نانو ذرات منیزیم مناسب است یا خیر.

## نتایج

**۱- بررسی خصوصیات ساختاری و فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات منیزیوم اکساید**

پس از بررسی نانو ذرات منیزیوم اکساید به وسیله میکروسکوپ الکترونی مشخص شد که نانو ذرات دارای قطر ۲۰ نانومتر و درای شکل چند وجهی هستند. همچنین میزان شدت نانوذرات به وسیله X-Ray مشخص شد ( شکل شماره ۱). نانو ذرات دارای خلوص بالای ۹۸ درصد و به رنگ سفید و چگالی واقعی $3/58\ g/m^3$ بودند.




**شکل شماره ۱- تصویر X-Ray نانو ذرات منیزیوم اکساید**

## ۲- نتایج رنگ آمیزی گرم و انجام تست‌های بیوشیمیایی و کشت بر روی محیط‌های افتراقی-

### ۲-۱- نتایج تست‌های افتراقی برای تأیید استافیلوکوکوس اورئوس

نتایج تست‌های بیوشیمیایی تأیید استافیلوکوکوس اورئوس در جدول شماره ۱ آورده شده است.

**جدول شماره ۱- نتایج تست‌های بیوشیمیایی برای تأیید استافیلوکوکوس اورئوس**

| نام تست | رنگ آمیزی گرم | آزمون TSI | ازمون مانیتول سالت اگار | آزمون سیمون سیترات | آزمون کاتالاز |
|---|---|---|---|---|---|
| **نتایج** | کوکسی گرم مثبت | اسید / اسید | + | - | + |
| **نام تست** | آزمون همولیز | آزمون SIM | آزمون MR | آزمون VP | آزمون اوره از |
| **نتایج** | همولیز بتا | --- | + | + | - |

### ۲-۲- نتایج تست‌های افتراقی در تأیید اشریشیا کلی

نتایج تست‌های بیوشیمیایی تأیید اشریشیا کلی در جدول شماره ۲ آورده شده است.

### ۳- نتایج تست های افتراقی در تأیید سودوموناس آئروژینوزا

نتایج تست‌های بیوشیمیایی تأیید سودوموناس آئروژینوزا در جدول شماره ۳ آورده شده است.

**جدول شماره ۲- نتایج تست‌های بیوشیمیایی برای تأیید اشریشیا کلی**

| نام تست | رنگ آمیزی گرم | آزمون TSI | ازمون مانیتول سالت اگار | آزمون سیمون سیترات | آزمون کاتالاز |
|---|---|---|---|---|---|
| **نتایج** | کوکوباسیل گرم منفی | اسید / اسید+گاز | - | - | - |
| **نام تست** | محیط EMB | آزمون SIM | آزمون MR | آزمون VP | آزمون اوره از |
| **نتایج** | جلای فلزی | -++ | + | - | - |

**جدول ۳- نتایج تست‌های بیوشیمیایی برای تأیید سودوموناس آئروژینوزا**

| نام تست | رنگ آمیزی گرم | آزمون TSI | ازمون مانیتول سالت اگار | آزمون سیمون سیترات | آزمون کاتالاز |
|---|---|---|---|---|---|
| **نتایج** | باسیل گرم منفی | قلیایی / قلیایی | - | + | - |
| **نام تست** | محیط سیتریمید آگار | آزمون SIM | آزمون MR | آزمون VP | آزمون اوره از |
| **نتایج** | | --+ | - | - | - |

### ۳-۳- نتایج آزمایش آنتی بیوگرام

**۳-۱- نتایج آنتی بیوگرام با روش دیسک گذاری** نتایج آزمون آنتی بیوگرام در جدول شماره ۴ امده است.

**جدول۴- میزان قطر هاله عدم رشد در هر یک از باکتری‌ها پس از آزمایش دیسک گذاری**

| باکتری/ آنتی بیوتیک | AM | AN | E | TE | CP | GM | SXT | OFX | NA | P | AMX | ME | C |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **استافیلوکوکوس اورئوس** | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | R | S |
| **اشریشیا کلی** | R | S | R | S | S | S | S | S | S | R | I | R | S |
| **سودوموناس ائروژینوزا** | R | S | R | I | S | S | R | S | R | R | R | R | R |

* **R**: مقاوم / **S**: حساس / **I**: نیمه حساس

** آمپی سیلین-**AM** آمیکاسین-**AN** اریترومایسین-**E** تتراسایکلین-**TE** سیپروفلوکساسین-**CP** جنتامایسین-**GM** تری متوپریم سولفامتانول-**SXT**

افلوکساسین-**OFX** نالیدیک اسید- **NA** پنی سیلین- **P** آموکسی سیلین کلاوولانیک اسید- **AMX** متی سیلین-**ME** کلرامفینیکل-**C**

با توجه به جدول مشخص شد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به دیسک‌های نالیدیک اسید، پنی سیلین و متی سیلین، باکتری اشریشیا کلی نسبت به دیسک‌های آمپی سیلین، تتراسایکلین، پنی سیلین و متی سیلین و باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به دیسک‌های آمپی سیلین، اریترومایسین، تری متوپریم سولفامتانول، نالیدیک اسید، پنی سیلین، آموکسی سیلین-کلاوولانیک اسید، متی سیلین و کلرومفینیکل و تتراسایکلین مقاوم بوده‌اند.

### ۳-۲- نتایج تست حداقل غلظت بازدارندگی MIC و حداقل غلظت کشندگی MBC

با توجه به رقت های تهیه شده، لوله های حاوی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا در غلظت ppm ۶۶۶۶/۶۶ شفاف بوده و در بقیه لوله‌ها کدورت مشاهده گردید و در باکتری اشریشیا کلی در غلظت ppm ۲۲۲۲/۲ کدورتی مشاهده نگردید. بنابراین MIC (حداقل غلظت بازدارندگی) در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس ائروژینوزا مربوط به لوله شماره ۱ و در باکتری اشریشیا کلی مربوط به لوله شماره ۲ بود. همچنین نتایج MBC ( حداقل غلظت کشندگی) مورد بررسی قرار گرفت که پس از کشت از لوله های فوق، عدم رشد باکتری‌ها مشاهده گردید که تأیید کننده MBC بودن لوله‌های مذکور بود.

## ۴- نتایج تأثیر سینرژیسم نانو ذرات منیزیوم اکساید همراه با آنتی بیوتیک

### ۴-۱- افزودن غلظت‌های مختلف نانو ذره به دیسک‌های آنتی بیوتیکی

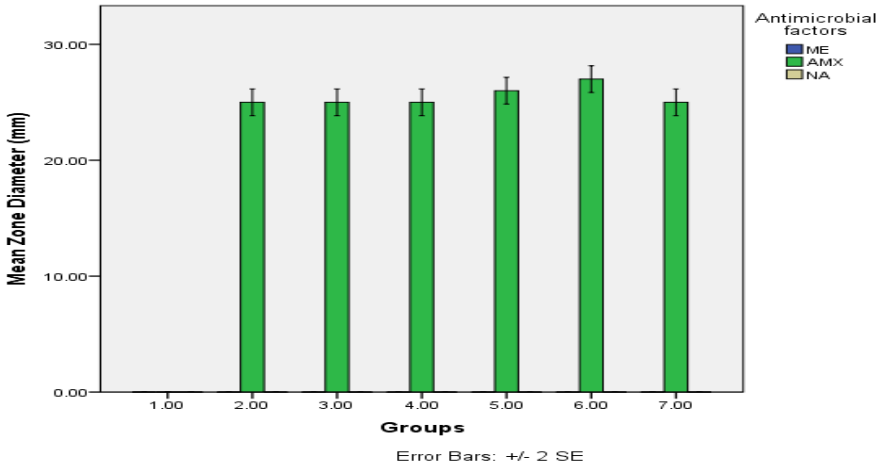
از تمام رقت‌های نانو ذره به دیسک‌های آنتی بیوتیکی که نسبت به آن باکتری‌ها مقاوم بودند، اضافه شد.

**۴-۱-۱- نتایج برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس**

برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برای هر چهار آنتی بیوتیک مقاوم همراه با نانو ذرات تفاوتی در قطر هاله‌ها ایجاد ننمود. به طوری که برای سه آنتی بیوتیک متی سیلین ، کلرامفنیکل و نالیدیکسیک اسید قطر هاله‌ها صفر بود و برای آنتی بیوتیک آموکسی سیلین کلاوولانیک اسید با توجه به اینکه P-value بیشتر از ۰/۰۵ بدست آمد، همراهی نانو ذره با آنتی بیوتیک بی تأثیر بود (شکل شماره ۱).

**۴-۱-۲- نتایج برای باکتری اشریشیا کلی**

نتایج تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذره به همراه آنتی بیوتیک در باکتری اشریشیا کلی به روش دیسک گذاری در جدول شماره ۵ آورده شده است. همچنین در شکل شماره ۲ به مقایسه تأثیر انواع غلظت نانو ذره، آنتی بیوتیک‌ها و آنتی بیوتیک‌ها به همراه نانو ذرات پرداخته شده است.



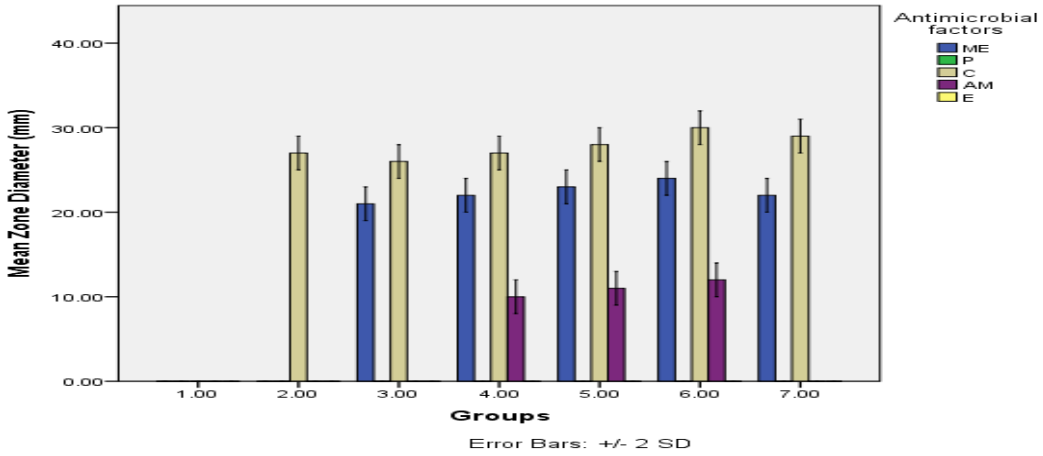

**شکل شماره ۱- مقایسه کلی تاثیر دیسک نانو ذره، آنتی بیوتیک و غلظت های مختلف نانو ذره به همراه آنتی بیوتیک در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به روش دیسک گذاری**

**جدول شماره ۵- بررسی کلی تأثیر غلظت‌های نانو ذره به همراه آنتی بیوتیک باکتری اشریشیا کلی به روش دیسک گذاری**

| میزان غلظت‌های مختلف نانو ذره | حالت تأثیر نانوذره بر حسب انواع مختلف آنتی بیوتیک‌ها | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **ME** | **C** | **AM** | **P** | **E** |
| **(10000 ppm)** | 21 S (Synergism) | 26 S (indifference) | 0 R (indifference) | 0 R (indifference) | 0 R (indifference) |
| **(5000 ppm)** | 22 S (Synergism) | 27 S (indifference) | 10 R (Additivity) | 0 R (indifference) | 0 R (indifference) |
| **(2500 ppm)** | 23 S (Synergism) | 28 S (indifference) | 11 R (Additivity) | 0 R (indifference) | 0 R (indifference) |
| **(1250 ppm)** | 24 S (Synergism) | 30 S (indifference) | 12 R (Additivity) | 0 R (indifference) | 0 R (indifference) |
| **(625 ppm)** | 22 S (Synergism) | 29 S (indifference) | 0 R (indifference) | 0 R (indifference) | 0 R (indifference) |

* **R**: مقاوم / **S**: حساس / **I**: نیمه حساس

** **AM**-آمپی سیلین **E**-اریترومایسین **P**- پنی سیلین **ME**-متی سیلین **C**-کلروامفینیکل




**شکل شماره ۲- مقایسه تأثیر نانو ذره، آنتی بیوتیک و غلظت های نانو ذره در اشریشیا کلی به روش دیسک گذاری**

**۴-۱-۳- نتایج برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا**

در این باکتری بعد از افزودن غلظت‌های مختلف نانو ذره در هیچ یک از دیسک‌ها قطر هاله عدم رشد مشاهده نگردید و باکتری از خود مقاومت نشان داد. لذا تفاوت معنی داری بین هیچ یک از حالت‌ها وجود نداشت (P-value>0.05).

**۴-۲- افزودن غلظت‌های مختلف نانو ذره به آنتی بیوتیک‌ها با روش چاهک گذاری**

این تست برای محلول هر یک از آنتی بیوتیک‌های مقاوم و در هر یک از سه باکتری مورد مطالعه به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت.

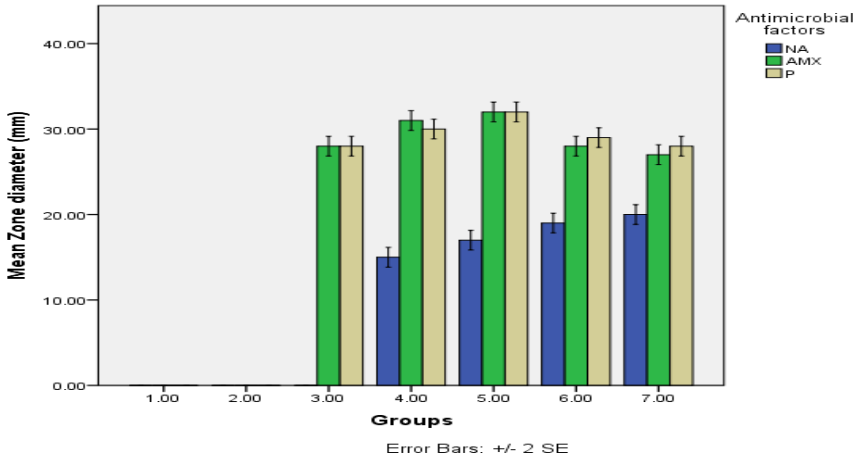
**۴-۲-۱- نتایج برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس**

نتایج تأثیر رقت‌های نانو ذره پس از افزودن به محلول آنتی بیوتیک برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در جدول شماره ۶ آورده شده است. مقایسه تأثیر نانو ذره، آنتی بیوتیک و غلظت‌های مختلف نانو ذره به همراه آنتی بیوتیک در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به روش چاهک گذاری در شکل شماره ۳ آمده است.

**جدول شماره ۶- بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذره به همراه آنتی بیوتیک در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به روش چاهک گذاری**

| میزان غلظت‌های مختلف نانو ذره | حالت تأثیر نانوذره بر حسب انواع مختلف آنتی بیوتیک‌ها | | |
|---|---|---|---|
| | **NA** | **AMX** | **P** |
| **(10000 ppm)** | 0 R (indifference) | 28 S (Synergism) | 28 S (Synergism) |
| **(5000 ppm)** | 15 I (Synergism) | 31 S (Synergism) | 30 S (Synergism) |
| **(2500 ppm)** | 17 I (Synergism) | 32 S (Synergism) | 32 S (Synergism) |
| **(1250 ppm)** | 19 S (Synergism) | 28 S (Synergism) | 29 S (Synergism) |
| **(625 ppm)** | 20 S (Synergism) | 27 S (Synergism) | 28 S (Synergism) |

***R**: مقاوم / **S**: حساس / **I**: نیمه حساس * **نالیدیک اسید- **NA** پنی سیلین- **P** آموکسی سیلین کلاوولانیک اسید- **AMX**




**شکل شماره ۳ – مقایسه تأثیر نانو ذره، آنتی بیوتیک و غلظت‌های مختلف نانو ذره به همراه آنتی بیوتیک در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به روش چاهک گذاری**

**۴-۲-۲- نتایج برای باکتری اشریشیا کلی**

نتایج تأثیر رقت های نانو ذره پس از افزودن به محلول آنتی بیوتیک برای باکتری اشریشیا کلی در جدول شماره ۷ آورده شده است. نکته قابل ذکر این است که باکتری اشریشیا کلی نسبت به آنتی بیوتیک نالیدیک اسید حساس بود، لذا در اثر مجاورت محلول این آنتی بیوتیک با رقت‌های نانو ذره اثر سینرژیسمی به گونه قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. مقایسه کلی تأثیر نانو ذره، آنتی بیوتیک و غلظت‌های مختلف نانو ذره به همراه آنتی بیوتیک در باکتری اشریشیا کلی به روش چاهک گذاری در شکل شماره ۴ آمده است.

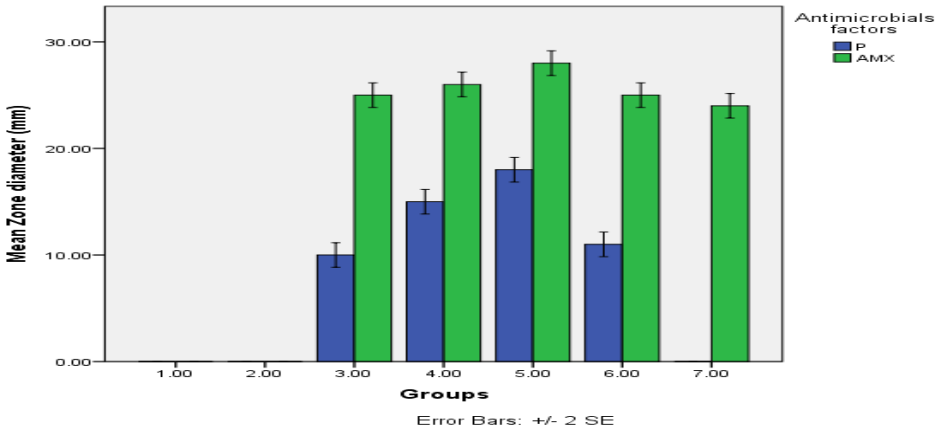
**۴-۲-۳- نتایج برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا**

نتایج تأثیر رقت‌های نانو ذره پس از افزودن به محلول آنتی بیوتیک برای باکتری سودوموناس ائروژینوزا در جدول شماره ۸ آورده شده است. مقایسه تأثیر نانو ذره، آنتی بیوتیک و غلظت‌های مختلف نانو ذره به همراه آنتی بیوتیک در باکتری سودوموناس ائروژینوزا به روش چاهک گذاری در شکل شماره ۵ آمده است.

**جدول شماره ۷- بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نانو ذره به همراه آنتی بیوتیک در باکتری اشریشیا کلی به روش چاهک گذاری**

| میزان غلظت‌های مختلف نانو ذره | حالت تأثیر غلظت نانو ذره بر حسب انواع مختلف آنتی بیوتیک‌ها | | |
|---|---|---|---|
| | **NA** | **AMX** | **P** |
| **(10000 ppm)** | >25 (Synergism) | 25 S (Synergism) | 10 R (Additivity) |
| **(5000 ppm)** | >25 (Synergism) | 26 S (Synergism) | 15 R (Synergism) |
| **(2500 ppm)** | >25 (Synergism) | 28 S (Synergism) | 18 R (Synergism) |
| **(1250 ppm)** | >25 (Synergism) | 25 S (Synergism) | 11 R (Additivity) |
| **(625 ppm)** | >25 (Synergism) | 24 S (Synergism) | 0 R (indifference) |

***R**: مقاوم / **S**: حساس / **I**: نیمه حساس **NA** **- نالیدیک اسید **P** - پنی سیلین **AMX** - آموکسی سیلین کلاوولانیک اسید

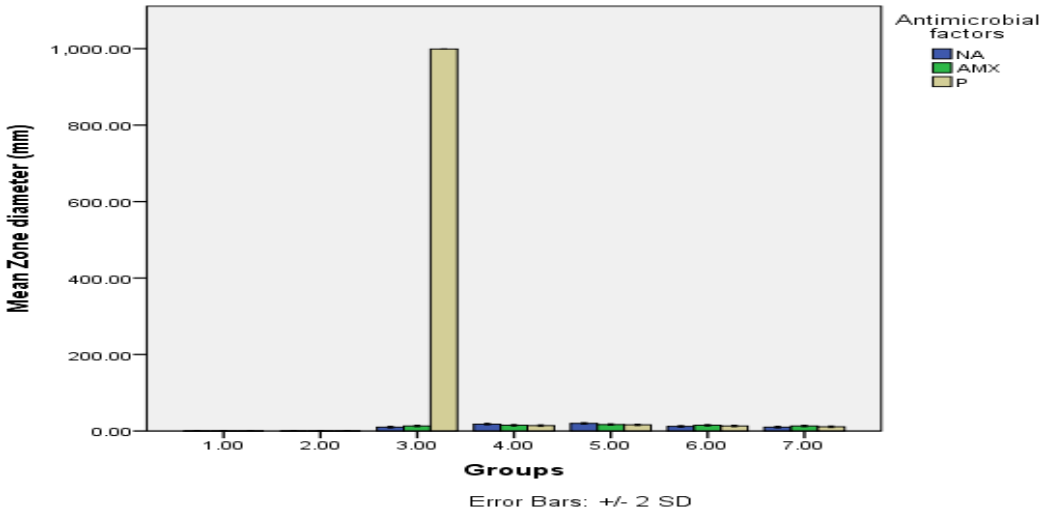



**شکل شماره ۴- مقایسه تأثیر نانو ذره، آنتی بیوتیک و غلظت های مختلف نانو ذره به همراه آنتی بیوتیک در باکتری اشریشیا کلی به روش چاهک گذاری**

**جدول شماره ۸ - بررسی تأثیر غلظت های مختلف نانو ذره به همراه آنتی بیوتیک در باکتری سودوموناس ائروژینوزا به روش چاهک گذاری**

| میزان غلظت‌های مختلف نانو ذره | حالت تأثیر غلظت نانو ذره بر حسب انواع مختلف آنتی بیوتیک‌ها | | |
|---|---|---|---|
| | **NA** | **AMX** | **P** |
| **(10000 ppm)** | ۱۰ (Additivity) | 13 R (Additivity) | 0 R (indifference) |
| **(5000 ppm)** | ۱۸ (Synergism) | 15 I (Synergism) | 14 I (Synergism) |
| **(2500 ppm)** | ۲۰ (Synergism) | 17 I (Synergism) | 16 I (Synergism) |
| **(1250 ppm)** | ۱۲ (Additivity) | 15 I (Synergism) | 13 R (Additivity) |
| **(625 ppm)** | ۱۰ (Additivity) | 13 R (Additivity) | 11 R (Additivity) |

***R**: مقاوم / **S**: حساس / **I**: نیمه حساس ****NA**- نالیدیک اسید **P**- پنی سیلین **AMX**- آموکسی سیلین کلاوولانیک اسید




**شکل شماره ۵- مقایسه تأثیر نانو ذره، آنتی بیوتیک و غلظتهای مختلف نانو ذره به همراه آنتی بیوتیک در باکتری سودوموناس ائروژینوزا به روش چاهک گذاری**

با توجه به نتایج فوق اثر سینرژیسمی متفاوتی در هر یک از سه باکتری مشاهده شد. با مقایسه جداول شماره ۶، ۷ و ۸ مشخص شد که نانو ذره منیزیوم اکساید بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اثر سینرژیسمی بیشتری داشته است. لازم به ذکر است که تمامی تست ها بر اساس سه بار تکرار با نتایج مشابه به دست آمده است.

## بحث

بیش از نیم قرن است که با کشف آنتی بیوتیک زندگی انسان های بسیار از بیماری‌های عفونی نجات پیدا کرده است. با این حال، ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی در عفونت های میکروبی یک تهدید جدی در مبارزه با بیماری‌های عفونی است. روشن است که استفاده از آنتی بیوتیک های قوی تر توسط شرکت‌های داروسازی تنها یک موفقیت موقت و محدود است. به خاطر نسبت بالا سطح به حجم و خصوصیات منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی، نانو مواد به عنوان یک عامل ضد میکروبی جدید دسته بندی شدند. نانو ذرات خود به عنوان یک عامل ضد میکروبی قوی برای انواع برنامه های پزشکی کاربرد دارند، شامل پانسمان‌هایی بر پایه نانو ذرات، ابزارهای پزشکی پوشیده شده به وسیله نانو، نانوژل‌ها و محلول‌های نانو. نانو ذرات مختلف به عنوان یک وسیله برای رساندن آنتی بیوتیک‌های کار آمد و همچنین محافظت داروهای ضدمیکروبی از مکانیسم های مقاومت میکروبی (به عنوان مثال تخریب توسط بتالاکتاماز) مورد بررسی قرار گرفته اند (۱۰). فناوری نانو با ایجاد سیستم های منحصر به فرد موجب افزایش برهم کنش‌های مولکولی می شود، در نتیجه به نانو ذرات این اجازه داده می شود که در برابر عوامل بیماری‌زای خارجی به راحتی پاسخ دهند. این سبب مکانیسم مقاومت‌های میکروبی و بهبود پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی است. ترکیب نانو ذرات و آنتی بیوتیک ها باعث می شود که دارو رسانی به طور هدفمند انجام شده و مقاومت دارویی به حداقل برسد (۱۹). نانو ذرات تیتانیوم، نقره، الماس، اکسیدهای آهن، نانو تیوب های کربنی و پلی مرهای قابل تجزیه زیستی برای استفاده در تشخیص و درمان مورد مطالعه قرار گرفته اند. در مورد تاثیر قرار گرفتن طولانی مدت در معرض نانو ذرات، بر سلامت انسان و محیط زیست هنوز اطلاعات کافی وجود ندارد (۲۰). مطالعات انجام شده بر روی سمیت ناشی از نانو ذرات نشان داده داده است که نانو ذرات مبتنی بر فلز می تواند رفتار بیولوژیکی را در سطح اندام، بافت، سلول، جایگاه درون سلولی و پروتئین تحت تأثیر قرار دهد. اندازه نانو ذرات کوچک است و برای همین به راحتی می تواند به پوست، ریه و مغز دسترسی داشته باشد و باعث عوارض تأثیر گذار

باشد (۲۱). نانو ذرات منیزیوم اکساید به دلیل داشتن مقاومت بالا در برابر شرایط سخت به عنوان یک عامل ضد باکتریایی مؤثر شناخته شده‌اند. بسیاری از روش‌های مصنوعی، مانند روش سل-ژل، روش هیدروترمال و میکروامولسیون در اماده سازی نانو ذرات منیزیوم اکساید استفاده شده است. اگر چه مکانیسم ضد باکتری نانو ذرات منیزیوم اکساید به طور دقیق مشخص نشده است، اما ۳ مکانیسم اصلی ضد باکتریایی حدس زده می شود، از قبیل تشکیل اکسیژن فعال سطحی، واکنش نانو ذره با باکتری و در نهایت اسیب رساندن به سلول باکتریایی و دارا بودن اثر قلیایی (۲۲).

در مطالعه حاضر نیز نانو ذرات منیزیوم اکساید به تنهایی اثر ضد باکتریایی بر روی هر سه باکتری استافیلوکوکوی اورئوس، اشریشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا داشتند، همچنین این نانو ذره در ترکیب با آنتی بیوتیک‌ها موجب افزایش اثر سینرژیسمی با آنتی بیوتیک‌ها گردیده‌اند. همچنین این نانو ذره نشان داده که در اثر ترکیب با سایر نانو ذرات اثر سینرژیسمی قابل ملاحظه ایجاد می‌کند. در مطالعه‌ای که توسط ژاسمین ویدیک و همکارانش صورت گرفته است اثرات ضد باکتری و ضد سم شناسی نانو ذرات اکسید روی و اکسید منیزیوم به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفته اند. نانو ذرات اکسید روی به تنهایی خاصیت ضد باکتریایی بالایی را نشان داده اما برای سلول های پستانداران سمی بود، در مقابل نانو ذرات اکسید منیزیوم تا حدی مانع رشد باکتری‌ها بوده و برای سلول‌های پستاندار بی ضرر بوده است. با ترکیب این دو نانو ذره مشخص شده است هیچ آسیبی به سلول‌های پستاندار وارد نشده و اثر ضد باکتریایی آن هم زمان افزایش پیدا کرده، به گونه‌ای که حتی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت به صورت انتخابی عمل نموده است (۲۳). یکی از نکات مهم در مورد این نانو ذرات این است که این نانو ذرات در محیط مایع دارای خاصیت ضد باکتریایی بیشتری می‌باشند که در چندین مطالعه این امر مورد تائید قرار گرفته است. در مطالعه عباس منزوی و همکارانش مشخص شده که محلول نانو ذرات منیزیوم اکساید در شرایط آزمایشگاهی و داخل بدن با حداقل سمیت، فعالیت ضد میکروبی مؤثری داشته اند (۲۴). ساوایی و همکارانش نشان دادند که اکسیدهای فلزی از جمله اکسید منیزیوم، اکسید روی و اکسید کلسیم فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی دارند. محلول اکسید منیزیوم و اکسید کلسیم در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی به طور یکسان عمل می‌کنند در حالی که اکسید روی بیشتر به عنوان یک مهار کننده برای باکتری‌های گرم مثبت است. همچنین، این پودرها در حالت محلول بر علیه اسپورهای باسیلوس سوبتیلیس، که مقاوم به حرارت و عوامل ضد میکروبی بودند فعالیت‌های بازدارنده ای را نشان دادند (۲۵). در مطالعه‌ای دیگر اثر ضد باکتریایی نانو ذرات منیزیوم اکساید در برابر پاتوژن‌های مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق حداقل غلظت مهاری نانو ذرات منیزیوم در $10^4$ (CFU/ml) کلنی تشکیل شده از کمپیلوباکتر ژژونی و اشریشیا کلی O157: H7 و سالمونلا انتریتیدیس به ترتیب ۰/۵، ۱ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر بود. برای اینکه میزان $10^{8-9}$ (CFU/ml) کلنی از سلول های باکتریایی در ۴ ساعت به طور کامل غیر فعال شوند، حداقل غلظت مهاری مورد نیاز برای کمپیلوباکتر ژژونی ۲ میلی گرم بر میلی لیتر و برای *اشریشیا کلی* O157: H7 و *سالمونلا انتریتیدیس* میزان ۸ میلی گرم بر میلی لیتر نانو ذره مورد نیاز بود. ان مطالعه نشان داد که نانو ذرات منیزیوم اکساید فعالیت ضد باکتری قوی در برابر سه پاتوژن مهم ناشی از مواد غذایی دارد. شواهد حاکی از تشکیل اب اکسیژنه از سپانسیون نانو ذرات منیزیوم اکساید می باشد، که نانو ذرات موجب بیان ژن های دفاع استرس اکسیداتیو، تغییر مورفولوژی سلول، و نشت غشاء می شوند. القای استرس اکسیداتیو و اختلال در سلامت غشاء در سلول های باکتریایی نشان دهنده فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات منیزیوم اکساید است (۲۶). ماخلوف و همکارانش نشان دادند علاوه بر محیط مایع، عوامل دیگری نیز بر خاصیت ضد میکروبی این نانو ذره دخالت دارند. آنان با بررسی خاصیت ضد میکروبی نانو ذرات منیزیوم اکساید بر روی اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند که عواملی چون اندازه، pH و فرم فعال نانو ذره منیزیوم اکساید هم در این فرایند مؤثر هستند. میزان اندازه نانو ذره از اهمیت بالایی بر خوردار بود به طوری که ریشه کن شدن عامل میکروبی با نانو ذره به شدت

وابسته به ان بود (۱۶). حال در یک بررسی تاثیر ترکیب نانو ذرات منیزیوم اکساید (در اندازه ۲۰ نانومتر) و اکسید روی (در اندازه ۲۰ نانومتر ) و گرما بر باکتری‌های اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس وجود در شیر مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها نشان دادند که نانو ذرات مورد استفاده در این مطالعه هیچ تأثیری بر روی باکتری‌ها موجود بر روی محیط کشت آگار نداشته است. با این حال، نتایج نشان داد که نانو ذرات اکسید روی و منزیوم اکساید منجر به کاهش قابل توجهی در تعداد اشریشیا کلی (P-value<0.05) و استافیلوکوکوس اورئوس (P-value<0.05) در محیط مایع شده است. ترکیبی از نانو ذرات و حرارت ملایم کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری های اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده که نشان دهنده اثرات هم افزایی نانو ذرات و گرما بوده است (۲۷).

با توجه به موارد ذکر شده از نتایج مطالعات گذشته و مشاهدات حاصله در این مطالعه می توان بر این تاکید کرد که اندازه نانو ذرات منیزیوم اکساید در فرایند بررسی اثر ضد باکتریایی و سینرژیسمی آنها بر روی محیط جامد امری بسیار مهم است. از انجایی که دیسک ها به عنوان مانعی برای عبور این نانو ذرات به حساب می آیند لذا در ابعاد بالا این نانو ذره، قادر به دریافت پاسخی قابل قبول نیست. بنابراین برای بررسی خاصیت ضد میکروبی برخی نانو ذرات از روش های جایگزین استفاده شده است. همانند مطالعه ای که توسط رجایی و همکارانش انجام یافته و فعالیت مهارکنندگی نانو ذرات اکسید روی در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به روش چاهک گذاری مورد بررسی قرار گرفته اند. در ان تحقیق فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات اکسید روی در اندازه های ۵ و ۱۰۰ نانو متر در غلظت های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲.۵، ۶.۲۵، ۳.۱۳ میلی گرم بر میلی لیتر بررسی گردید. نانو ذرات اکسید روی ۵ نانومتری در غلظت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر و اندازه ۱۰۰ نانو متر در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر دارای فعالیت ضد باکتریایی بر روی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم سوختگی بودند (۲۸). از آنجایی که این دو نانو ذره دارای مکانیسم های ضدباکتریایی مشترک بودند. لذا از این روش برای بررسی اثر سینرژیسمی این نانو ذرات استفاده شده است. نتایج حاصل از مطالعه حاضر با مقایسه با سایر تحقیقات انجام شده، بر این صحت گذاشت که نانو ذره منزیوم اکساید حتی در ابعاد بالا، در محیط مایع دارای اثر ضد باکتریایی و سینرژیسمی بهتری است و با توجه به این نکات و عدم سمی بودن آن می توان از این نانو ذره در درمان برخی بیماری‌ها استفاده نمود. زیرا می تواند به عنوان عامل مؤثری برای جلوگیری از مصرف تعداد زیاد و مقدار دوز بالای آنتی بیوتیک‌ها در درمان عفونت ها، مطرح باشد.

## نتیجه گیری

امروزه با توجه به افزایش روز افزون مقاومت‌های باکتریایی و افزایش میزان مصرف آنتی بیوتیک نانو ذرات می تواند یک عامل مؤثر برای کاهش دوز های آنتی بیوتیکی باشد. باتوجه به مطالعات انجام شده پاسخ نانو ذرات منزیوم اکساید در برابر عوامل بیماری زای خارجی و ایمن بودن این نانو ذرات، که تاکنون سمیت آن ثابت نشده می‌توان از آن به عنوان یک ماده ضدباکتریایی مؤثر در درمان استفاده کرد. همچنین سبب شده علاوه بر کاهش میزان مصرف آنتی بیوتیک، میزان مقاومت آنتی بیوتیکی و سمیت ناشی از مصرف آنتی بیوتیک‌ها کاهش یابد. طبق مطالعات صورت گرفته ترکیب آنتی بیوتیک‌ها و نانو ذرات فلزی قدرت آنتی بیوتیک‌هایی را که در گذشته به دلیل بروز مقاومت میکروبی کارایی خود را از دست داده بودند، باز می گرداند و بعلاوه نانو ذرات متصل شده به آنتی بیوتیک غلظت آنتی بیوتیک‌ها را در محل اثرشان، افزایش می دهند. ولی نکته مهم و قابل توجه میزان غلظت این نانو ذره و مدت زمان مواجه با آن است. به طوری که نانو ذره اکسید منیزیم در غلظت های پایین و مدت زمان مواجهه کوتاه اثر چندانی بر سلول ها ندارد، اما افزایش توأم غلظت و مدت زمان مواجهه با نانو ذره اکسید منیزیم باعث تشدید تغییرات مرفولوژی سلول‌ها می‌گردد. لذا همان طور که در این مطالعه هم مشخص شده است، غلظت نقش مؤثر بر روی خاصیت ضد میکروبی و اثر سینرژیسمی این نانو ذره دارد، به طوری که باعث می‌شود این نانو ذره در هر باکتری رفتارهای متفاوتی از خود نشان دهد. به این ترتیب در

صورت استفاده از این نانو ذره بر روی سلول‌های پستاندار باید این نکته در نظر گرفته شود که از بیشترین غلظتی استفاده شود که علاوه بر این که اثر سینرژیسمی دارا باشد بر روی سلول جاندار، اثر تخریبی چه در کوتاه مدت و چه در دراز مدت نداشته باشد.

## سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم در دانشکده علوم زیستی و مدیریت و کارکنان آزمایشگاه محمودیه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال که در انجام کارهای آزمایشگاهی این تحقیق کمال همکاری را مبذول فرموده اند، سپاسگزاری و تشکر می گردد.

## منابع

1- Zhang L, Pornpattananangkul D, Hu C.M.J, Huang C.M. Current Medicinal Chemistry. Bentham Science Publishers, 2010; 17: 585–594.

2- Modrea A. Strategy for the Future in Terms of Research and Development in the Field of Nano and Microtechnology. Procedia Technology, 2014; 12: 283 – 288.

3- Weir E, Lawlor A, Whelan A, Regan F. The use of nanoparticles in anti-microbial materials

4- Friedman A.J, Phan J, Schairer D.O, Champer J, Qin M, Pirouz A, Blecher-Paz K, Oren A, Liu P.T, Modlin R.L, Kim J. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan–alginate

5- Zhang L, Pornpattananangkul D, Hu C.M, Huang C.M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. Curr Med Chem, 2010; 17(6): 585–59.

6-Huang L, Dai T, Xuan Y, Tegos G.P, Hamblin M.R. Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: efficacy against bacterial burn infections. Antimicrob Agents Chemother, 2011; 55(7): 3432–3438.

7- Blecher K, Nasir A, Friedman A. The growing role of nanotechnology incombating infectious disease.Virulence , 2011; 2(5): 395–401.

8- Huh A.J, Kwon Y.J. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotic's resistant era. J Cont Relea, 2011; 56(2): 128-145.

9- Al-Gaashani R, Radiman S, Al-Douri Y, Tabet N, Daud A. R. Investigation of the optical properties of Mg (OH)2 and MgO and their characterization. Analyst, 2008; 133: 835–845.

10-Sosnik A, Carcaboso A.M, Glisoni R.J, Moretton M.A, Chiappetta D.A. New old challenges in tuberculosis: potentially effective nanotechnologies in drug delivery. Adv Drug Deliv Rev, 2010; 62: 547–559.

11- Schairer D.O, Chouake J.S, Nosanchuk J.D, Friedman A.J. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. Virulence, 2012; 3(3): 271-279.

nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens. J Inves Derm, 2012; 133(5):1231–1239.

nanostructures obtained by microwave-assisted methods. Journal of Alloys and Compounds, 2012; 52: 71-76.

12-Ouraipryvan P, Sreethawong T, Chavadej S. Synthesis crystalline MgO nanoparticle with mesporous - assembled structure via a surfactant-modified sol-gel process. Materials Letters, 2009; 63: 1862-1865.

13-Boubeta C.M, Bacells L, Cristofol R, Sanfeliu C, Rodriguez E, Weissleder R, Piedrafita S, Simeonidis K, Angelakeris M, Sandiumenge F, Calleja A, Casas L, Monty C, Martinez B. Self-assembled multifunctional Fe/MgO nanospheres for magnetic resonance imaging and hyperthermia. Nanomedicine, 2010; 6: 362-370.

14-Di D.R, He Z.Z, Sun Z.Q, Liu J. A new nano-cryosurgical modality for tumor treatment using biodegradable MgO nanoparticles. Nanomedicine, 2012; 8: 1233-1241.

15-Krishnamoorthy V, Hiller D.B, Ripper R, Lin B, Vogel S.M, Feinstein D.L, Oswald S, Rothschild L, Hensel P, Rubinstein I, Minshall R, Weinberg G.L. Epinephrine induces rapid deterioration in pulmonary oxygen exchange in intact, anesthetized rats: a flow and pulmonary capillarypressure-dependent phenomenon. Anesthesiology, 2012; 117(4): 745–754.

16- Makhulf S, Dror R, Nitzan Y, Abramovich Y, Jelinek R, Gedanken A. Microwave-assisted synthesis of nanocrystalline MgO and its use as a bactericide. Adv Funct Mater, 2005; 15: 1708–1715.

17-Jin T, He Y. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens, J Nanopart Res, 2011; 13: 6877–6885.

18-Yamamoto O, Ohira T, Alvarez K, Fukuda M. Antibacterial characteristics of CaCO3-MgO composites. Materials Science and Engineering B, 2010; 173: 208-212.

19-Blecher K, Nasir A, Friedman A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. Virulence, 2011; 2(5): 395–401.

20-Sharma V.K, Yngard R.A, Lin Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. Advances in Colloid and Interface Science, 2009; 145(1-2): 83–96.

21-Kennedy D.C, Tay L.L, Lyn R.K, Rouleau Y, Hulse J, Pezacki J.P. aggregation of cellular beta2-adrenergic receptors measured by plasmonic interactions of functionalized nanoparticles. ACS Nano, 2009; 3(8): 2329-2339.

22- Tang Z.X, Feng Lv B. MgO nanoparticles as antibacterial agent: preparation and activity. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2014; 31(3): 591 - 601.

23-Vidic J, Stankic S, Haque F, Ciric D, Le Goffic R, Vidy A, Jupille J, Delmas B. Selective antibacterial effects of mixed ZnMgO nanoparticles. J Nanopart, 2013; 15(5): 1595.

24-Monzavi A, Eshraghi S, Hashemian R, Momen-Heravi F. In vitro and ex vivo antimicrobial efficacy of nano MgO in the elimination of endodontic pathogens. Clinical Oral Investigations, 2015; 19(2): 349–356.

25- Sawai J, Igarashi H, Hashimoto A, Kokugan T, Shimizu M. Effect of ceramic powder slurry on spores of Bacillus subtilis. Journal of Chemical Engineering of Japan, 1995; 28(5): 556-561.

26-He Y, Ingudam Sh, Reed S, Gehring A, Terence P, Strobaugh J.R, Irwin P. Study on the mechanism of antibacterial action of magnesium oxide nanoparticles against food-borne pathogens. Journal of Nanobiotechnology, 2016; 14: 54.

27- Kimiaee Sadr M, Mirhosseini M, Rahimi G.H. Effects of combination of magnesium and zinc oxide nanoparticles and heat on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria in milk. Nanomed J, 2016; 3(1): 49-56.

28- Rajaie S, Mohammadi Sichani M, Yousefi M.H. Study on the inhibitory activity of zinc oxide nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds. Qom Univ Med Sci J, 2015; 9(1-2): 30-37.