[DOI: 10.29252/sjimu.27.3.138]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 2:48 IRST on Wednesday October 21st 2020

ارزیابی اثر نانوذرات زینک اکساید بر مهار باکتری های بیماریزای استاندارد تشکیل دهنده بیوفیلم و مقایسه آن با ایزوله های مقاوم به دارو

سهیلا دوائی فر[۱]، حسین شهبانی ظهیری[۲]، محمد حسین مدرسی[۱]، مهدی محمدی[۲]، کامبیز اکبری نوقابی[۲*]

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲) گروه زیست فناوری انرژی و محیطی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۸ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۱۸**

چکیده

مقدمه: داروهای سنتی غالباً به دلیل بزرگ بودن، به طور مناسبی به بافت هدف نرسیده و همین امر توجه پژوهشگران را به استفاده از نانوداروها جلب کرده است، از سویی استفاده از ترکیبات فعال زیستی بارگذاری شده بر روی نانوذرات می تواند در ارتقا اثر ضدمیکروبی آن ها موثر واقع شود. در پژوهش های پیشین نشان داده شد که نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین سنتز شده به روش بیولوژیک قابلیت مهار رشد و تشکیل بیوفیلم حاصل از برخی جدایه های بومی بالینی مقاوم به دارو را دارا می‌باشند.

مواد و روش ها: در پژوهش حاضر به جهت مقایسه، اثر این نانوذرات بر رشد و تشکیل بیوفیلم سه سویه باکتریایی بیماریزای استاندارد به دقت مورد مطالعه قرار گرفته است. کنتیک رشد باکتریایی، تولید اگزوپلی ساکارید و تشکیل بیوفیلم در حضور نانوذرات ارزیابی و به صورت میکروسکوپی آنالیز شد.

یافته های پژوهش: تیمار سویه های مورد آزمون در غلظت ۲۷۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذره سبب ممانعت از رشد تمامی آن ها گردیده و کنتیک رشد باکتری های مورد آزمایش در طول زمان با افزایش غلظت نانوذرات کاهش یافت، هم چنین آنالیزهای میکروسکوپی نشان داد که تشکیل بیوفیلم در حضور نانوذرات به مقدار قابل توجهی نسبت به نمونه های کنترل کاهش یافته است.

بحث و نتیجه گیری: در مجموع نتایج نشان داده که نانوذرات مذکور نه تنها توانایی ممانعت از گسترش بیوفیلم در سویه های مورد آزمون را داشته، بلکه می توانند با تاثیر بر رشد آن ها در کاهش قدرت بیماریزایی این سویه ها موثر باشد.

واژه های کلیدی: نانوذرات زینک اکساید، ضدباکتریایی، ضدبیوفیلم، اگزوپلی ساکارید

* نویسنده مسئول: گروه زیست فناوری انرژی و محیطی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

Email: Akbari@nigeb.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[DOI: 10.29252/sjimu.27.3.138]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 2:48 IRST on Wednesday October 21st 2020

مقدمه

اگر چه امروزه آنتی بیوتیک های مختلف برای مقابله با انواع عفونت ها در دسترس می باشند اما مشکلات حاصل از بیماری های عفونی و به ویژه بیوفیلم های باکتریایی حاصل از آن ها هم چنان به عنوان یک تهدید در دنیای پزشکی محسوب می شود و از سوی دیگر مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها یکی دیگر از چالش های درمان می باشد.

از دیگر مشکلات داروهای سنتی این است که، این داروها برای اثر بخشی باید بتوانند از سدهای دفاعی بدن مانند مخاطات عبور کنند اما غالباً به دلیل بزرگ بودن، به طور مناسبی از این سدها عبور نکرده در نتیجه برای این که مقدار مناسبی از دارو به بافت هدف برسد باید دوز مصرف دارو را بالا برد که خود می تواند عامل ایجاد سمیت های کشنده شود. استفاده از نانوداروها در مبارزه با بیماری ها به خصوص در مبارزه با آن دسته از میکروارگانیسم هایی که تولید بیوفیلم می کنند نه تنها باعث رسیدن میزان مناسبی از دارو به بافت های هدف می شود هم چنین از ایجاد مقاومت های دارویی که در بسیاری از موارد به دلیل افزایش دوز مصرف دارو است جلوگیری می کند. بنا بر این امروزه استفاده از نانوذرات مختلف به علت داشتن خواص منحصر به فرد از جمله ویژگی های ضدباکتریایی و ضدبیوفیلم آن ها بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است(۱).

خواص ویژه نانوذرات اکسید روی نسبت به سایر نانوذرات جدید از جمله پایداری شیمیایی و فتوشیمیایی، اثرات کاتالیتیکی بالا، مقاومت در دمای محیط، سمیت پائین و قرار گرفتن آن ها در دسته مواد GRAS سبب استفاده فراوان از این نانوذرات در علوم دارویی و پزشکی شده است(۴-۲).

استفاده از نانوذرات به عنوان عوامل انتقال مواد و داروها به بخش های هدف و به ویژه در درمان عفونت های ناشی از بیوفیلم های میکروبی از جمله اهداف در دست تحقیق دانشمندان می باشد(۵). از جمله ترکیبات طبیعی بارگذاری شده بر روی نانوذرات، می توان به برخی ترکیبات طبیعی(دارای خواص ضدباکتریایی) تولید شده توسط میکروارگانیسم ها اشاره نمود. این ترکیبات کمترین تداخل را با سیستم های طبیعی داشته بنا بر این بهترین انتخاب برای بارگذار شدن بر روی نانوذرات به منظور کاربرد در بخش های پزشکی می باشند که از میان آن ها می توان به رنگدانه فیکوسیانین اشاره نمود(۶،۷).

یکی از عمده ترین بیلی پروتئین هایی که توسط برخی گونه های سیانوباکتری ها تولید شده و خالص سازی گردیده است فیکوسیانین نام دارد. سیانوباکتری ها قدیمی ترین فتوسنتز کننده های اکسیژنی شناخته شده بر زمین بوده که همین امر آن ها را تبدیل به تنها موجودات فتوسنتز کننده شبیه به گیاهان کرده است. فیکوبیلی پروتئین ها رنگدانه های فتوسنتزی در سیانوباکتری ها بوده که شامل فیکوسیانین، فیکواریترین و آلوفیکوسیانین هستند. فیکوسیانین که دارای ساختار پروتئین-پیگمان می باشد علاوه بر این که یک رنگدانه کمکی و بسیار مهم در فتوسنتز می باشد دارای خواص شناخته شده از جمله خواص ضدباکتریایی، ضدالتهابی، ضدسرطان و از بین برنده رادیکال های آزاد نیز می باشد(۸).

در مطالعات پیشین تاثیر نانوذرات زینک اکساید بارگذاری شده با فیکوسیانین بر سه ایزوله بالینی مقاوم به آنتی بیوتیک ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase) Escherichia coli، ESBL Pseudomonas aeruginosa و Methicillin-Staphylococcus aureus (MRSA) resistant توسط دوائی فر و همکاران مورد ارزیابی قرار گرفت(۷). در این مطالعه تاثیر نانوذرات زینک اکساید بارگذاری شده با فیکوسیانین بر سه سویه باکتریایی استاندارد شامل E. coli (ATCC 25922)، S. aureus (ATCC 25923)، P. aeruginosa (ATCC 27853) مورد ارزیابی قرار گرفته و در ادامه پتانسیل ضدبیوفیلمی هم چنین پتانسیل مهار تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی توسط نانوذرات مذکور مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش ها

جدایه های بالینی: سویه های استاندارد مورد آزمون از کلکسیون میکروبی آمریکا تهیه شد. نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین پیش تر سنتز و تعیین خصوصیت

[DOI: 10.29252/sjimu.27.3.138]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 2:48 IRST on Wednesday October 21st 2020

شده که در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت، ۱۰۰ میلی گرم از رنگدانه لـــــیوفیلیزه شده آبی رنگ فیکوسیانین در ۵ میلی لیتر آب دیونایز حل شده و به صورت قطره قطره به محلول استات روی ۰/۰۲ مولار (که به طور مداوم توســـط مگنت و استـــیرر مخلوط می گردد) افزوده شد. پس از ۱۰ دقیقه محلول ۰/۱ مولار هیدروکسید سدیم به صورت قطره قطره به محلول در حال مخلوط شدن تا ایجاد تغییر رنگ از آبی به سفید افزوده شد. سپس محلول حاوی نانوذرات حاصله برای ۱۵ دقیقه در ۵۵۰۰ دور در دقیقه(rpm) سانتریفیوژ شده و پنج مرتبه با استفاده از آب دیونایز شست و شو شد، در نهایت در آون خلاء به مدت ۳ ساعت خشک گردیده و در ظروف مناسب به منظور انجام مطالعات بعدی نگهداری گردید(۷).

تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد و حداقل غلظت کشندگی: برای تعیین مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد(MIC) از روش رقت سازی در محیط مایع استفاده شد. دو سری رقت از نمونه های مورد آزمون شامل فیکوسیانین، نانوذرات زینک اکساید و نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین(در غلظت های ۲۵۰ تا ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در ۲ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. سوسپانسیون باکتری های مورد نظر با پایه تلقیح معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند به هر کدام از محیط های کشت اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گذاری شد(حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد کمترین غلظت از نمونه مورد آزمون می باشد که هیچ رشد قابل مشاهده ای از باکتری در آن دیده نشود). به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی(MBC) میزان ۱۰۰ میکرولیتر از همه محیط کشت هایی که رشدی در آن ها دیده نشد به محیط های کشت مولر هینتون آگار فاقد نمونه مورد آزمون تلقیح شد و پلیت ها به مدت ۲۴ ســـاعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گذاری شد(کمترین غلظت از نانوذرات که تمام باکتری های تلقیح شده اولیه را از بین ببرد به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد)(۲). در این مرحله از آزمون اثر ضدمیکروبی فیکوسیانین و نانوذرات زینک اکساید به تنهایی نیز به منظور مقایسه بیشتر گزارش گردید.

تعیین رشد وابسته به زمان در حضور فیکوسیانین، نانوذرات زینک اکساید و نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین: کنتیک رشد سویه های باکتریایی استاندارد در حضور غلظت های مختلف از نمونه های مورد آزمون ارزیابی گردید. رقت های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نمونه های مورد آزمون در ویال های جداگانه تهیه شده و به هر رقت، سویه های باکتریایی مورد نظر که از کشت تازه آن ها جداسازی شده اند تلقیح شد، سپس تمامی ویال ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه ســـانتی گراد انکوبه گذاری شده و از هر کدام از آن ها در بازه های زمانی ۲ ساعته نمونه برداری انجام شده و جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت و ثبت گردید(۲).

مهار بیوفیلم باکتریایی توسط نانوذرات: تعیین قدرت مهار بیوفیلم باکتریایی در رقت های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانو ذرات و با استفاده از روش دویندی و همکاران انجام شد و اثر تقابلی ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین و جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر در ایزوله‌های بالینی مورد آزمون بررسی شد(۹).

هم چنین ۱ درصد از هر کدام از کشت های ۲۴ ساعته هر سه سویه باکتری به ۲ میلی لیتر محیط کشت Luria-Bertani Broth (LB) بدون نانوذره (به عنوان کنترل) و با رقت های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذره در پلیت ۶ خانه ای حاوی لامل (۱×۱) انتقال داده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به طور ثابت انکوبه گذاری گردید و در نهایت بیوفیلم های اتصال یافته با استفاده از کریستال ویوله رنگ آمیزی و با میکروسکوپ مشاهده گردید. نمونه کنترل در این آزمون سویه باکتری های کشت شده در عدم حضور نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین می باشند(۱۰).

بررسی اثر ممـــانعت کنندگی نانوذرات بر تولید پلی ساکاریدهای خـــارج سلولی: تولید EPS توسط سویه های باکتریایی مورد آزمـــــون در حضور و عدم

[DOI: 10.29252/sjimu.27.3.138]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 2:48 IRST on Wednesday October 21st 2020

حضور نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین بررسی شد. به این منظور از روش خان و همکاران استفاده شد. در این روش سلول های تیمار شده توسط نانوذره با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد. بافر PBS به رسوب سلولی حاصله افزوده شده و مخلوط گردید، سپس سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. محلول رویی در ویال جمع آوری شده و برای ایجاد رسوب EPS، به میزان سه برابر حجم محلول موجود در ویال، به آن اتانول ۹۵ درصد افزوده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از EPS رسوب داده شده با ۲۰۰ میکرولیتر فنول ۵ درصد سرد و ۱ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ مخلوط شده و در نهایت جذب نوری محلول در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت گردید(۱۱).

آنالیز آماری: برای رسم نمودارها از برنامه سیگما پلات استفاده شد. هر کدام از مقادیر گزارش شده از سه آزمون مستقل با در نظر گرفتن میانگین و انحراف معیار گزارش شده اند. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه(آنوا) انجام شده و مرز معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش

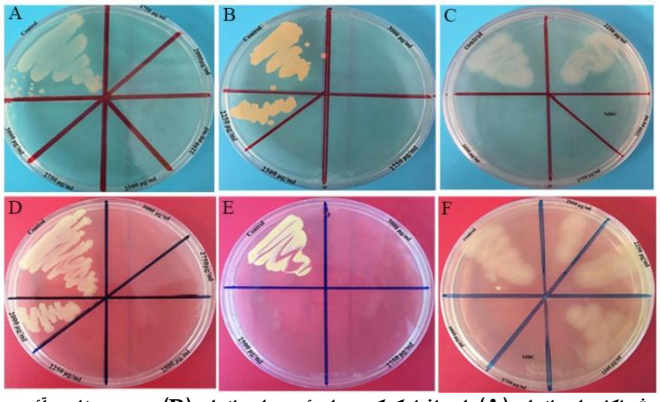
بیشترین و کمترین مقادیر MIC و MBC حاصل از نانوذرات از میان ۶ سویه مورد آزمون بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به دارو و اشرشیاکلی استاندارد، سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو و اشرشیاکلی استاندارد گزارش شد(جدول شماره ۱) که نشان دهنده حساسیت بیشتر باکتری های گرم منفی نسبت به نانوذرات در مقابل باکتری های گرم مثبت می باشد.

جدول شماره ۱. مقادیر MIC و MBC نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین بر روی سویه های مورد آزمون، واحدها برحسب میکروگرم بر میلی لیتر می باشد.

باکتری	فیکوسیانین-زینک اکساید		فیکوسیانین		زینک اکساید	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
اشرشیاکلی استاندارد	۱۷۵۰	۱۷۵۰	۶۲۵۰	۴۷۵۰	۵۲۵۰	۴۲۵۰
استافیلوکوکوس اورئوس استانداراد	۲۵۰۰	۲۲۵۰	۷۰۰۰	۶۵۰۰	۵۰۰۰	۵۰۰۰
سودوموناس آئروژینوزا استانداراد	۲۵۰۰	۲۲۵۰	۶۵۰۰	۶۵۰۰	۵۲۵۰	۴۷۵۰
اشرشیاکلی مقاوم به دارو	۲۲۵۰	۲۰۰۰	۶۰۰۰	۵۲۵۰	۴۷۵۰	۴۵۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به دارو	۲۵۰۰	۲۵۰۰	۶۵۰۰	۶۰۰۰	۵۷۵۰	۵۲۵۰
سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو	۲۷۵۰	۲۰۰۰	۷۰۰۰	۶۷۵۰	۵۵۰۰	۵۵۰۰

مقادیر مربوط به ایزوله های بالینی در مطالعات پیشین گزارش گردید(۷).

با مقایسه هر سویه مقاوم با سویه استاندارد نشان داده شد که تاثیر نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین بر روی باکتری های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک ها کمتر از باکتری های استاندارد می باشد به طوری که نانوذرات قابلیت مهار باکتری های بیماریزای استاندارد را در رقت های پایین تر نسبت به ایزوله های مقاوم دارا می باشند. در شکل شماره ۱ نتایج حداقل غلظت کشندگی نانوذرات نشان داده شده است.

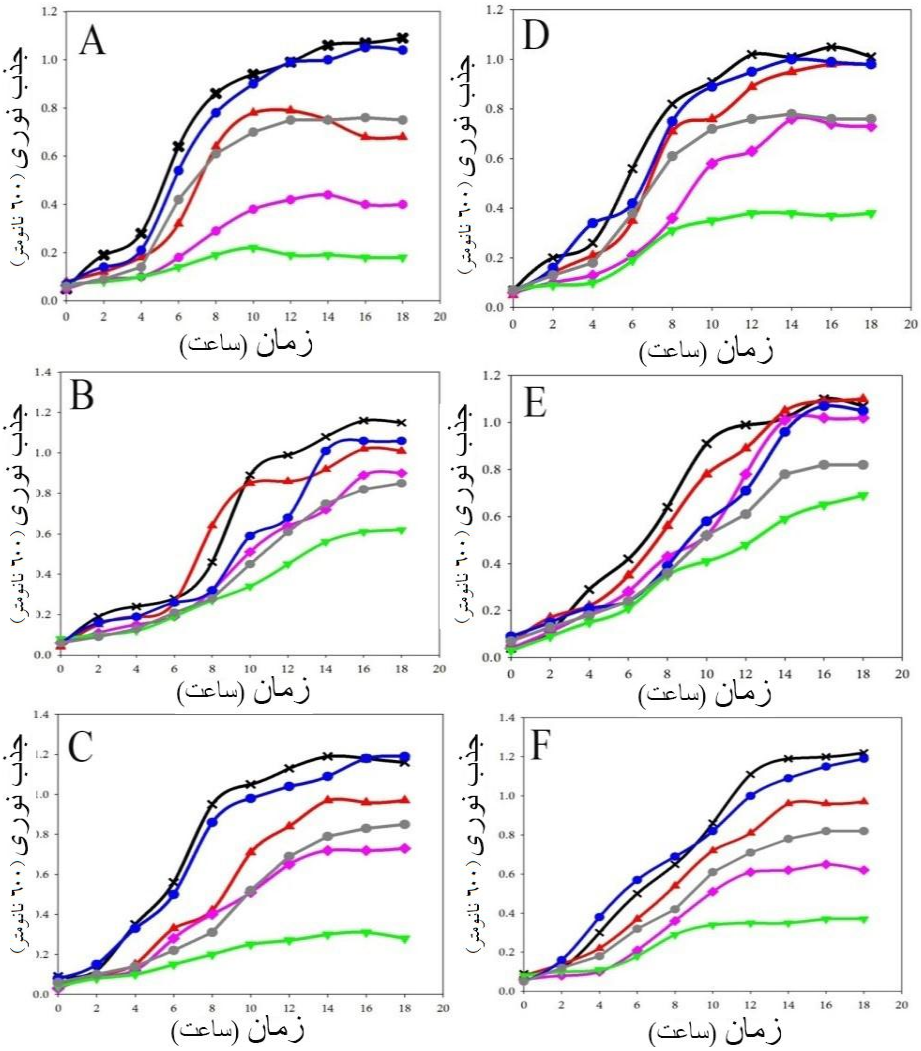


شکل شماره ۱. اشرشیاکلی استاندارد(A)، استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد(B)، سودوموناس آئروژینوزا استاندارد(C)، اشرشیاکلی مقاوم به دارو(D)، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به دارو(E)، سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو F)

[DOI: 10.29252/sjimu.27.3.138]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 2:48 IRST on Wednesday October 21st 2020

مقایسه بین ۶ سویه باکتریایی نشان داد که اشرشیاکلی استاندارد حساس‌ترین سویه و سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو مقاوم ترین سویه نسبت به نانوذرات سنتز شده می باشند.

شکل شماره ۲، اثر غلظت های مختلف نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین، زینک اکساید و فیکوسیانین را در سویه های مورد آزمون در مقایسه با نمونه کنترل در بازه زمانی ۱۸ ساعته نشان می دهد. همان طور که مشاهده می گردد نمونه کنترل تیمار نشده بیشترین جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر و در نتیجه بیشترین میزان رشد باکتریایی در طول زمان را داشته است و با افزایش غلظت نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین الگوهای متفاوتی از رشد در سویه های مختلف نشان داده شد. به طوری که در حضور فیکوسیانین به تنهایی الگوی رشدی مشابه به نمونه کنترل مشاهده می‌گردد و فیکوسیانین به تنهایی تاثیر کمی در ممانعت از رشد سویه های مورد آزمون دارد در حالی که همراه شدن این رنگدانه با نانوذره زینک اکساید سبب افزایش قدرت مهار رشد باکتریایی توسط فیکوسیانین می گردد. هم چنین اثر ممانعت کنندگی از رشد زینک اکساید به تنهایی بالاتر از فیکوسیانین گزارش گردید. در تمامی موارد فیکوسیانین، نانوذرات زینک اکساید و زینک اکساید-فیکوسیانین اثر مهاری بالاتری بر سویه های استاندارد مورد آزمون نسبت به سویه های مقاوم داشته اند.



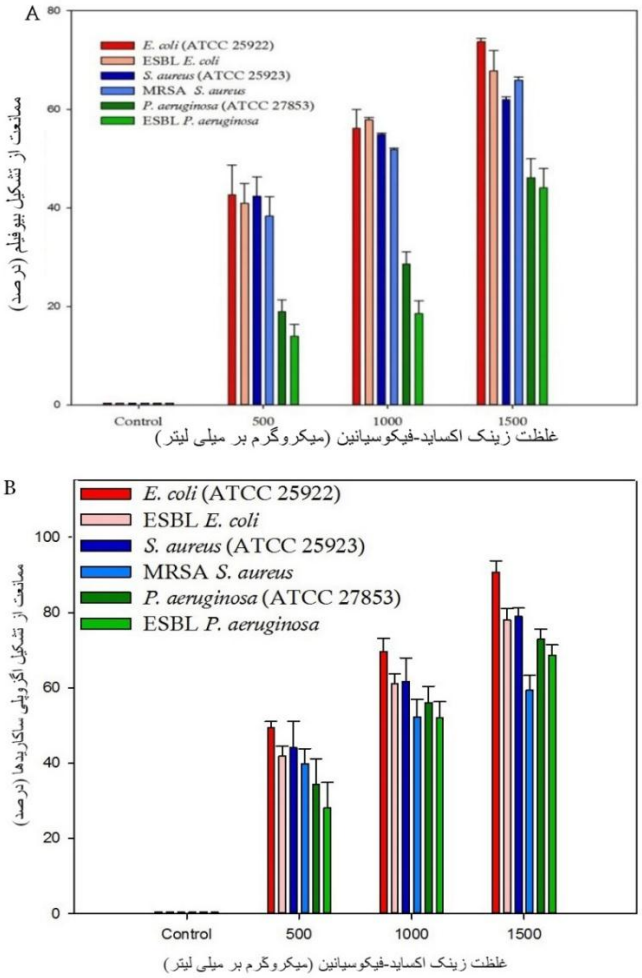
شکل شماره ۲. تاثیر غلظت های مختلف نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین، زینک اکساید و فیکوسیانین

[DOI: 10.29252/sjimu.27.3.138]

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 2:48 IRST on Wednesday October 21st 2020

بیشترین درصد ممانعت از تشکیل بیوفیلم در رقت ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در برای باکتری اشرشیاکلی استاندارد و به میزان بالاتر از ۷۰ درصد گزارش گردید در حالی که در همین رقت اثر مهاری نانوذرات بر باکتری اشرشیاکلی مقاوم میزان پائین تری (پایین تر از ۶۵ درصد) گزارش گردید(شکل شماره ۳a).

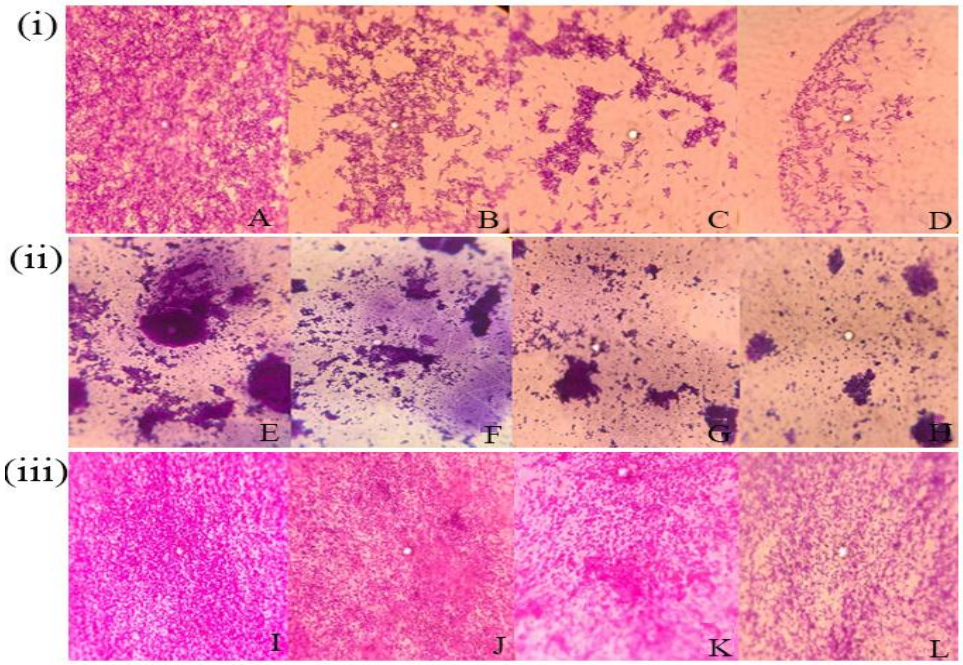
نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین به طور موثرتری از تشکیل بیوفیلم سویه های استاندارد نسبت به سویه های مقاوم ممانعت می کنند و در این مورد تنها استثناء در مورد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به دارو در رقت ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. برخلاف سایر باکتری های مورد آزمون، در مورد این باکتری مشاهده گردید که بیوفیلم حاصل از ایزوله مقاوم نسبت به سویه استاندارد به میزان بیشتری توسط نانوذرات مهار گردید. که به نظر می رسد علت آن تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی باشد.



شکل شماره ۳. درصد ممانعت از تشکیل بیوفیلم و اگزوپلی ساکارید در سویه های مورد آزمون

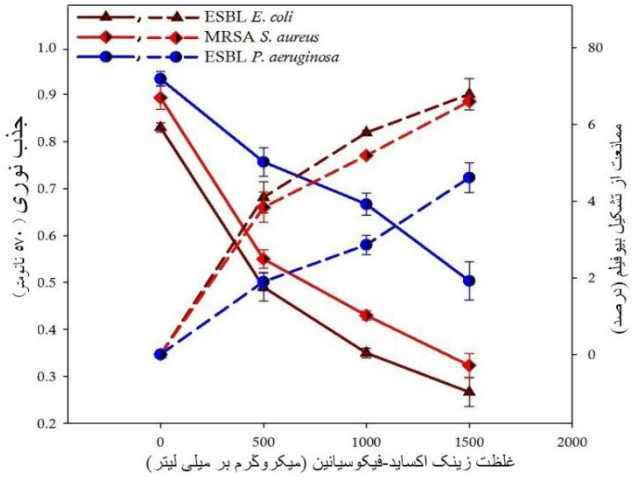
تصاویر حاصل از آنالیزهای میکروسکوپی بیوفیلم نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین میزان تشکیل بیوفیلم کاهش یافته و به واسطه آن تراکم باکتری در سطح کاهش یافته است (شکل شماره ۴) نتایج نشان داد تاثیر ممانعت کنندگی از تشکیل بیوفیلم توسط نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین در باکتری گرم منفی اشرشیاکلی از سایر باکتری های استفاده شده در این مطالعه بیشتر می‌باشد و نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین به طور موثرتری بیوفیلم حاصل از این باکتری را کنترل می‌کنند.

[DOI: 10.29252/sjimu.27.3.138]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 2:48 IRST on Wednesday October 21st 2020



شکل شماره ۴. ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط(i) سویه باکتری اشرشیاکلی استاندارد در رقت های مختلف نانو نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین(B) رقت ۵۰۰ µg/ml، (C) ۱۰۰۰ µg/ml، (D) ۱۵۰۰ µg/ml و (A) نمونه کنترل فاقد نانو نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین، (ii) سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد در رقت های مختلف نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین(F) رقت ۵۰۰ µg/ml، (G) ۱۰۰۰ µg/ml، (H) ۱۵۰۰ µg/ml و (E) نمونه کنترل فاقد نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین، سویه باکتری سودوموناس آئروژینوزا استاندارد در رقت های مختلف نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین(J) رقت ۵۰۰ µg/ml، (K) ۱۰۰۰ µg/ml، (L) ۱۵۰۰ µg/ml و (I) نمونه کنترل فاقد نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین

هم چنین با افزایش غلظت نانوذرات، جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر و متعاقباً میزان تشکیل بیوفیلم در ایزوله های بالینی مورد آزمون کاهش یافته است(شکل شماره ۵).



شکل شماره ۵. اثر تقابلی ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین و جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر در ایزوله های بالینی مورد آزمون

بیشترین درصد ممانعت از تشکیل اگزو پلی‌ساکاریدها در رقت ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در برای باکتری اشرشیاکلی استاندارد و به میزان بالاتر از ۹۰ درصد گزارش گردید(شکل شماره

[DOI: 10.29252/sjimu.27.3.138]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 2:48 IRST on Wednesday October 21st 2020

۳b). سویه های استاندارد نسبت به سویه های مقاوم حساسیت بیشتری در برابر نانوذرات داشته و EPS تولید شده توسط آن ها به‌طور موثرتری مهار می‌شود.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به افزایش روز افزون مقاومت های دارویی و سمیت ناشی از مصرف دوزهای بالای آنتی بیوتیک، استفاده از ترکیبات طبیعی که توانایی غلبه بر باکتری های بیماریزای را داشته باشند در بخش های دارو و درمان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از سوی دیگر با پیدایش بیوفیلم های باکتریایی مقاوم به درمان، استفاده از داروهای نوین از قبیل نانوداروها گزینه مناسبی جهت مقابله با آن ها می باشد. در پژوهش حاضر اثر ضدمیکروبی نانوذرات زینک اکساید بارگذاری شده با ترکیب فعال زیستی(فیکوسیانین) در مقابل ۳ سویه باکتریایی استاندارد مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت و نتایج حاصله با اثرات ضدمیکروبی همین نانوذرات بر سویه های مقاوم به دارو که پیشتر گزارش شده است مقایسه شد(۷). مقادیر MIC و MBC نشان داد که نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین در رقت های کمتر در مقایسه با فیکوسیانین و زینک اکساید، قادر به مهار سویه های استاندارد و مقاوم به دارو می باشند. مقایسه مقادیر حاصله نشان دهنده حساسیت بیشتر سویه های استاندارد نسبت به ایزوله های مقاوم در برابر نانوذرات می باشد. نتایج حاصل از پژوهش گوتیرز و همکاران نشان داد که نانوذرات زینک اکساید قادر به مهار سویه های استاندارد و مقاوم باکتری های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا بوده که نتایج مطالعه حاضر را تایید می نماید اما مقادیر MIC باکتری های استاندارد و مقاوم مشابه می باشد(۱۲). بارگذاری فیکوسیانین بر نانوذرات زینک اکساید سبب ارتقا و تجمیع اثر ضدمیکروبی فیکوسانین و زینک اکساید به تنهایی گردیده است. به نظر می رسد از یک سو، نسبت سطح به حجم بالای نانوذرات سبب تسهیل نفوذ نانوذره به درون غشاء باکتریایی شده و از سوی دیگر حضور پروتئین-پیگمان فیکوسیانین با اثرات ضدباکتریایی(بارگذاری شده بر نانوذره) سبب ارتقاء اثر ضدمیکروبی نانوذرات خواهد شد. هم چنین در مطالعات دیگر اثرات بالای ضدمیکروبی در نانوذراتی که نسبت سطح به حجم بالایی دارند نشان داده شده است(۱۴،۱۳).

ارزیابی اثر نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین بر کنتیک رشدی سویه های مورد آزمون نشان می دهد که به طور کلی با افزایش غلظت نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین تکثیر و رشد در تمامی سویه ها نسبت به نمونه کنترل کاهش یافته است. بنا بر این رشد و تکثیر سویه های مورد آزمون با یک الگوی وابسته به غلظت کاهش یافته است که روند کاهش رشد و تکثیر در سویه های باکتریایی استاندارد بیشتر از ایزوله های بالینی می باشد. پژوهش چنتیر و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داد که فیلم های پوشش داده شده با فیکوسیانین اثر ضدباکتریایی پایینی بر برخی باکتری های گرم منفی نظیر لیستریا منوسایتوژنز و سالمونلا تایفیموریوم نسبت به نمونه های کنترل دارند(۱۵)، در پژوهش حاضر نیز فیکوسیانین(در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به تنهایی تاثیر اندکی در مهار رشد سویه های مورد آزمون دارد در صورتی که زینک اکساید(در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تا حدودی قادر به مهار رشد سویه های مورد آزمون می باشد و از سوی دیگر نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین در همین غلظت قادر به کاهش بسیار زیادی در رشد وابسته به زمان در تمامی سویه های باکتریایی مورد آزمون می باشند. بنا بر این حضور نانورادهای زینک اکساید سبب ارتقای اثر آنتی باکتریال فیکوسیانین شده است که در مطالعات مشابه دیگری، Chauhan و همکاران نشان دادند که اثر تجمیعی نانوذرات زینک اکساید به همراه برخی آنتی بیوتیک های استاندارد به طور کلی سبب ارتقا اثر ضدمیکروبی آن ها خواهد شد(۱۶). تاثیر نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین بر کنتیک رشد سویه ها در طول زمان وابسته به غلظت بوده که مطالعات پیشین که توسط خورشید و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام گردید را تایید می کند(۲).

فعالیت ضدباکتریایی رنگدانه فیکوسیانین از طریق اثرگذاری آن بر روی غشاء سلولی باکتری ها و تخریب آن می باشد. زمانی که رنگدانه فیکوسیانین در محیط با

[DOI: 10.29252/sjimu.27.3.138]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 2:48 IRST on Wednesday October 21st 2020

pH بالاتر از pI خود قرار گیرد دارای بار الکتریکی منفی خواهد شد. بنا بر این این رنگدانه در مایعات بدن و یا در محیط کشت دارای بار منفی می باشد. به نظر می رسد وجود بار منفی در سطح رنگدانه فیکوسیانین و هم چنین در سطح غشاء سلولی باکتری ها، اتصال این دو به هم را با مشکل مواجه کرده و در نتیجه به طور معمول اثرگذاری رنگدانه فیکوسیانین به تنهایی بر روی غشاء سلولی باکتری ها بسیار پایین می باشد. با توجه به این که نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین دارای بار الکتریکی مثبت می باشند، بنا بر این قدرت اتصال و نفوذ مناسبی به سلول باکتریایی را دارند. به طور کلی می توان گفت، بار الکتریکی سطح نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین، سایز کوچک و قدرت نفوذ بالای آن ها و علاوه بر آن ها خصوصیات آنتی باکتریال فیکوسیانین در سطح این نانوذرات سبب اثرگذاری مناسب بر روی غشاء سلولی باکتریایی و در نهایت از دست رفتن تمامیت غشاء و تخریب سلول باکتری می گردد(۱۷).

در برخی مطالعات اخیر، اثر ضدباکتریایی هم زمان نانوذرات مختلف به همراه آنتی بیوتیک ها بررسی شده است و ارتقاء اثر این نانوذرات در همراهی با آنتی بیوتیک ها گزارش شده است. ژنگ و همکاران در سال ۲۰۱۸ اثر سینرژیک آنتی بیوتیک های مختلف با نانوذرات اکسید مس را در مقابل سویه باکتری استاندارد E.coli بررسی کرده و یافتند که حضور نانوساختارهای اکسید روی می تواند سبب ارتقاء اثر باکتریسیدال آنتی بیوتیک های مورد آزمون بر علیه E.coli شود(۱۸). هم چنین دیلن و همکاران نشان دادند، P.aeruginosa و S.aureus دارای حساسیت بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین بارگذاری شده شده بر روی نانوساختارها در مقایسه با سیپروفلوکساسین و نانوذرات به تنهایی می باشند(۱۹). ویندیاستی و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که اثر هم زمان نانوذرات زینک اکساید به همراه کارواکرول سبب سینرژیسم و ارتقا اثر ضدمیکروبی هر یک از آن ها به تنهایی می گردد(۲۰).

هر دو باکتری ESBL-producing P. aeruginosa و ESBL-producing E. coli نه تنها از عوامل بیماریزای مهم بوده بلکه از سویه هایی می باشند که پتانسیل تولید بیوفیلم بالایی داشته و با توجه به شیوع بالا، کنترل آن ها در علم پزشکی بسیار حائز اهمیت می باشد. از سوی دیگر کنترل این سویه ها در بیماری های مزمن بسیار مشکل می باشد(۲۱).

بیوفیلم های ایجاد شده توسط باکتری های مذکور به خصوص باکتری سودوموناس آئروژینوزا مقاومت بسیار زیادی نسبت به سیستم ایمنی و دفاعی بدن و فرآیندهایی از قبیل فاگوسیتوز دارند. از سوی دیگر باکتری های ساکن در بیوفیلم با ایجاد تغییر در بیان ژن هایشان می توانند نسبت به آنتی بیوتیک های زیادی مقاومت ایجاد کنند. به این صورت که نه تنها نفوذپذیری غشاء سلولی و متابولیسم سلولی خود را کاهش داده بلکه با افزایش بیان برخی از ژن ها مانند ژن تولید بتالاکتامازها نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام مقاوم می‌شوند که این پدیده به خصوص در بیوفیلم باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی مشاهده می شود. علاوه بر این موارد، باکتری های موجود در بیوفیلم قادر به تولید یک ماتریکس پلیمری در اطراف خود بوده که از طریق آن حفاظت شده و میزان آنتی بیوتیک کمتری را وارد خود می کنند. در پژوهش حاضر نیز به طور مشابهی حساسیت بیوفیلم حاصل از باکتری سودوموناس آئروژینوزا استاندارد و مقاوم در برابر نانوذرات نسبت به سایر باکتری های مورد آزمون کمتر بوده، اما برخلاف مطالعه چوا و همکاران بیشترین اثر نانوذرات بر بیوفیلم حاصل از باکتری اشرشیاکلی گزارش شد(۲۲،۲۳).

همان طور که در مطالعات جسلین و همکاران نشان داده شده است با افزایش غلظت نانوذرات زینک اکساید هاله عدم رشد باکتریایی بزرگ تر می شود(۲۴)، در این پژوهش نیز رنگ آمیزی با کریستال ویوله نشان داد که توانایی تشکیل بیوفیلم با افزایش غلظت نانوذرات در هر سه سویه مورد آزمون کاهش می یابد و بیشترین اثر ممانعت کنندگی در تشکیل بیوفیلم در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده می گردد. دراین غلظت از نانوذره تراکم سلولی در سطح لام کمتر از سایر غلظت ها می باشد. هم چنین نانوذرات

[DOI: 10.29252/sjimu.27.3.138]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 2:48 IRST on Wednesday October 21st 2020

می تواند به طور وسیعی تشکیل بیوفیلم توسط E.coli را تحت تاثیر قرار دهند و در همین غلظت تشکیل بیوفیلم توسط P. aeruginosa مقدار کمتری کاهش یافته است که می توان نتایج حاصله را به قدرت بالاتر P. aeruginosa در تشکیل بیوفیلم نسبت به E.coli مرتبط دانست(۲۵). هم چنین حساسیت بالاتر بیوفیلم های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم نسبت به استافیلوکوکوس استاندارد در نتایج تحقیقات پیشین توسط علی و همکاران گزارش گردید(۲). افزایش غلظت نانوذرات با افزایش مهارکنندگی از تشکیل بیوفیلم نسبت مستقیم داشته و در واقع مهار بیوفیلم در یک الگوی وابسته به غلظت نانوذره صورت می گیرد که در مطالعات پیشین نیز گزارش گردیده است(۹). به هر حال، تاثیر نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانین در بازدارندگی از تشکیل بیوفیلم توسط باکتری های ذکر شده(که دارای پتانسیل بالا برای تشکیل بیوفیلم می باشند) می تواند به حضور فیکوسیانین به عنوان یک ترکیب فعال زیستی و یک عامل چلاته کننده اشاره کرد که سبب تخریب بیوفیلم می گردد(۲۶).

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که زمانی که نفوذ نانوذره به درون سلول باکتری با شدت بیشتر و به صورت ساده تری صورت گیرد، اثر تخریبی آن نیز به مراتب بیشتر خواهد بود. این نوع نانوذرات می توانند اثر مهاری بالاتری بر روی سویه های استاندارد مورد آزمون نسبت به ایزوله های مقاوم داشته باشند، هم چنین می توانند کاربردهای زیادی در علوم پزشکی داشته و کاندیدای مناسبی برای مقابله با عفونت های ناشی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی باشند و پس از انجام مطالعات بیشتر می تواند در درمان های ترکیبی استفاده گردند. این نانوذرات می توانند یک دید جدید و مفید نسبت به داروهای مدرن و جایگزین آنتی بیوتیک ها ایجاد کنند. به این ترتیب با ارائه شیوه های نوین مبارزه علیه باکتری های بیماریزا می توان استفاده از آنتی بیوتیک ها در کنترل باکتری ها را محدود نموده و در نهایت اثرات جانبی مضر استفاده از آنتی بیوتیک ها کمتر خواهد شد.

کد اخلاق: IR.MUI.REC.1396.3.345

References

1.Madhumitha G, Elango G, Roopan SM. Biotechnological aspects of ZnO nanoparticles overview on synthesis and its applications. Appl Microbiol Biotechnol 2016; 100: 571-81. doi: 10.1007/s00253-015-7108-x.

2.Ali K, Azam A, Saquib Q, Alsaid MS, Alkhedhairy A, Musarrat J. Aloe vera extracts functionalized zinc oxide nanoparticles as nanoantibiotics against multi drug resistant clinical bacterial isolates. J Coll Int Sci 2016; 472: 145-56. doi: 10.1016/j.jcis.2016.03.021. doi: 10.1016/j.jcis.2016.03.021.

3.Vaseem M, Umar A, Hahn YB. ZnO nanoparticles growth properties and applications. JCR 2010; 5: 1-36. doi: 10.5772/63437. doi: 10.5772/63437.

4.Gunalan S, Sivaraj R, Rajendran V. Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. PNSMI 2012; 22: 693-700. doi: 10.1016/j.pnsc.2012.11.015.

5.Huh AJ, Kwon YJ. Nanoantibiotics a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. J Cont Rel 2011; 156:128-45. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.07.002.

6.Jong WH, Borm P. Drug delivery and nanoparticles applications and hazards. Int J Nanomed 2008; 3:133-49. doi: 10.2147/IJN.S596.

7.Davaeifar S, Modarresi MH, Mohammadi M, Hashemi H, Shafiei M, Maleki H, et al. Synthesizing characterizing and toxicity evaluating of Phycocyanin ZnO nanorod composites a back to nature approaches. Coll Surf Bio 2019; 175: 221-30. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.12.002.

8.Sabarinathan KG, Ganesan G. Antibacterial and toxicity evaluation of C-phycocyanin and cell extract of filamentous freshwater Cyanobacterium Westiellopsis sps. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2008; 12:79-82.

9.Dwivedi S, Wahab R, Khan F, Mishra YK, Musarrat J, Khedhairy AA. Reactive oxygen species mediated bacterial biofilm inhibition via zinc oxide nanoparticles and their statistical determination. Plos One

[DOI: 10.29252/sjimu.27.3.138]
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 2:48 IRST on Wednesday October 21st 2020

2014; 9: 111289. doi: 10.1371/journal.pone.0111289.
10.Khan ST, Ahmed M, Alhadlaq HA, Musarrat J, Khadhairy AA. Comparative effectiveness of NiCl2 Ni and NiO NPs in controlling oral bacterial growth and biofilm formation on oral surfaces. Arch Oral Biol 2013; 58: 1804-11. doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.09.011.
11.Khan ST, Ahamed M, Khedhairy A, Musarrat J. Biocidal effect of copper and zinc oxide nanoparticles on human oral microbiome and biofilm formation. Mater Let 2013; 97: 67-70. doi: 10.1016/j.matlet.2013.01.085.
12.Gutierrez FM, Thi EP, Silverman JM, Oliveira CC, Sevensoon SL, Hoek AV. Antibacterial activity inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. Nanomedicine 2012; 8, 328-36. doi: 10.1016/j.nano.2011.06.014.
13.Orou SF, Hang KJ, Thien MT, Lee YY, Foh LC, Diem ND, et al. Antibacterial activity by ZnO nanorods and ZnO nanodisks a model used to illustrate nanotoxicity threshold. J Ind Eng Chem 2018; 62, 333-40. doi: 10.1016/j.jiec.2018.01.013.
14.Zhou W, Lu L, Chen D, Wang Z, Zhai J, Wang R, et al. Construction of high surface potential polypyrrole nanorods with enhanced antibacterial properties. J Mate Chem2018; 19, 3128-35. doi: 10.1039/C7TB03085A.
15.Chentir I, Kchaou H, Hamdi M, Jidi M, Li S, Doumandji A, et al. Biofunctional gelatin based films incorporated with food grade phycocyanin extractedfrom the Saharian Cyanobacterium arthrospira sp. Food Hydrocoll 2018; 89, 715-25. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.11.034.
16.Chauhan R, Reddy A, Abraham J. Biosynthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using Pichia fermentans JA2 and their antimicrobial property. Appl Nanosci 2015; 5: 63-71. doi: 10.1007/s13204-014-0292-7.
17.Sala L, Figueira FS, Cerveira GP, Moraes CC, Kalil SJ. Kinetics and adsorption isotherm of C-phycocyanin from Spirulina platensis onion exchange resins. Braz J Chem Eng 2014; 31. doi: 10.1590/0104-6632.20140314s00002443.
18.Zhang Y, Wang L, Xu X, Li F, Wu Q. Combined systems of different antibiotics with nano CuO against Escherichia coli and the mechanisms involved. Nanomed Fut Med 2018; 13: 1-14. doi: 10.2217/nnm-2017-0290.
19.Dillen K, Vandervoort G, Mooter VD, Ludwig A. Evaluation of ciprofloxacin loaded Eudragit RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. Int J Pharm 2006; 314: 72-82. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.01.041.
20.Windiasti G, Feng J, Ma L, Hu Y, Hakeem MJ, Amoako K, et al. Investigating the synergistic antimicrobial effect of carvacrol and zinc oxide nanoparticles against Campylobacter jejuni. Food Control 2019; 96: 39-46. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.08.028.
21.Cepas V, Lopez Y, Munoz E, Rolo D, Ardanuy C, Marti S, Xercavins M, et al. relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in gram negative bacteria. Microb Drug Res2018. doi: 10.1089/mdr.2018.0027.
22.Chua SL, Yam JK, Hao P, Adav SS, Salido MM. Selective labelling and eradication of antibiotic tolerant bacterial populations in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Nat Com 2016; 7: 10750. doi: 10.1038/ncomms10750.
23.Dosler S, Karaaslan E. Inhibition and destruction of Pseudomonas aeruginosa biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. Peptides 2014;62: 32-7. doi: 10.1016/j.peptides.2014.09.021.
24.Jesline A, John NP, Narayanan PM, Vani C, Murugan S. Antimicrobial activity of zinc and titanium dioxide nanoparticles against biofilm producing methicillin resistant Staphylococcus aureus. Appl Nanosci 2015; 5: 157-62. doi: 10.1007/s13204-014-0301-x.
25.Domenico EGD, Farulla I, Prignano G, Gallo MT, Vespaziani M, Cavallo I, et al. Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. Int J Mol Sci 2008; 18: 1077. doi: 10.3390/ijms18051077.
26.Bermejo P, Pinero E, Villar AM. Iron chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of Spirulinaplatensis. Food Chem 2008; 110: 436-45. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.021.

[DOI: 10.29252/sjimu.27.3.138]

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 2:48 IRST on Wednesday October 21st 2020

Evaluation of the Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on the Inhibition of Biofilm formation of standard Pathogenic Bacteria and Comparison with Drug Resistant Isolates

*Davaeifar S[1], Shahabanizahiri H[2], Modarresi MH[1], Mohammadi M[2], Akbarinoghabi K[*2]*

(Received: January 28, 2019 Accepted: March 28, 2019)

Abstract

Introduction: Traditional medicines cannot adequately reach the target tissues, due to their large size; therefore, the attention of researchers has been drawn to the use of nanomedicines. In fact, the use of biological active compounds loaded on the surface of nanoparticles can be effective the in the promotion of their antimicrobial activity. In the earlier studies, it was demonstrated that biologically synthesized Phycocyanin Zinc Oxide nanoparticles were able to prevent the biofilm formation and growth deriving from some native clinical medicine-resistant isolates.

Materials & Methods: In the current research the effect of these nanoparticles on the growth and biofilm formation of three standard strains of pathogenic bacteria has been carefully studied. The bacterial growth kinetic, exopolysaccharides and biofilm formation in the presence of nanoparticles were examined under the microscope.

Findings: Treatment of tested strains at 2750 µg/ml concentration of nanoparticles prevented the growth of all strains and bacterial growth decreased over time by the increase in the concentration of nanoparticles. Furthermore, microscopic analyses showed that the formation of biofilms in the presence of nanoparticles significantly reduced, compared to the control samples. *Ethics code:* IR.MUI.REC.1396.3.345

Discussion & Conclusions: The results showed that the biosynthesized ZnO nanoparticles not only have the ability to inhibit the development of biofilms of tested strains but also they can reduce the pathogenicity of these strains by influencing their growth.

Keywords: Zinc oxide nanoparticles, Antibacterial, Ant-biofilm, Exopolysaccharides

1. Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Dept of Energy and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
**Corresponding author Email: Akbari@nigeb.ac.ir*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences