

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 نوقایی^{۲*}

(۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد (سلامی)، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
(۲) گروه زیست فناوری (انرژی و محیطی)، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۸

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 ضد میکروبی آن ها موثر واقع شود. در پژوهش های پیشین نشان داده شد که نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیاینین سنتز شده به روش بیولوژیک قابلیت مهار رشد و تشکیل بیوفیلم حاصل از برخی جدایه های بومی بالینی مقاوم به دارو را دارا می باشند.

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 آگزوپلی 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، آگزوپلی 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.

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 بیوفیلیم 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 نانوذرات در مبارزه با بیماری ها به خصوص در مبارزه با آن دسته از میکروارگانیسم هایی که تولید بیوفیلیم 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 ضدبیوفیلیم 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 (۲-۴).

استفاده از نانوذرات به عنوان عوامل انتقال مواد و داروها به بخش های هدف و به ویژه در درمان عفونت های ناشی از بیوفیلیم 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 آلفو-فیکوسیانین 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* و *Pseudomonas aeruginosa* (Methicillin-resistant *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 *S. aureus* (ATCC 25922)، *E. coli* (ATCC 25923) و *P. aeruginosa* (ATCC 27853) مورد ارزیابی قرار گرفته و در ادامه پتانسیل ضدبیوفیلیمی 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

زینک اکساید به تنهایی نیز به منظور مقایسه بیشتر گزارش گردید.

تعیین رشد وابسته به زمان در حضور فیکوسیائین، نانوذرات زینک اکساید و نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیائین: 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 سانتی 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 دیندی و همکاران انجام شد و اثر تقابلی ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیائین و جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر در ایزوله های 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-فیکوسیائین می باشند (۱۰).

بررسی اثر ممانعت کنندگی نانوذرات بر تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی: تولید EPS توسط سویه های باکتریایی مورد آزمون در حضور و عدم

شده که در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت، ۱۰۰ میلی گرم از رنگدانه لئووفیلز شده آبی رنگ فیکوسیائین در ۵ میلی لیتر آب دیونایز حل شده و به صورت قطره قطره به محلول استات روی ۰/۰۲ مولار (که به طور مداوم توسط مگنت و استیرر 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 آن 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 فیکوسیائین، نانوذرات زینک اکساید و نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیائین (در غلظت های ۲۵۰ تا ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در ۲ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون برات 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 ساعت 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 ضد میکروبی فیکوسیائین و نانوذرات

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 پژوهشی

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.

حضور نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیاینین بررسی شد. به این منظور از روش خان و همکاران استفاده شد. در این روش سلول های تیمار شده توسط نانوذره با استفاده از سانتیفریوژ با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد. بافر PBS به رسوب سلولی حاصله افزوده شده و مخلوط گردید، سپس سانتیفریوژ 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

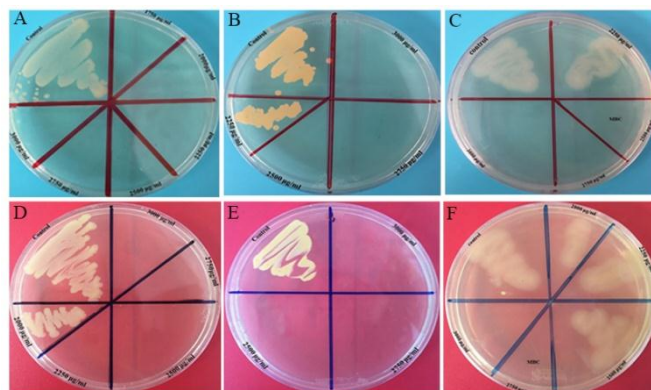
جدول شماره ۱. مقادیر MIC و MBC نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیاینین بر روی سویه های مورد آزمون، واحدها برحسب میکروگرم بر میلی لیتر می باشد.

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

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

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.

با مقایسه هر سویه مقاوم با سویه استاندارد نشان داده شد که تاثیر نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیاینین بر روی باکتری های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک ها کمتر از باکتری های استاندارد می باشد به طوری که

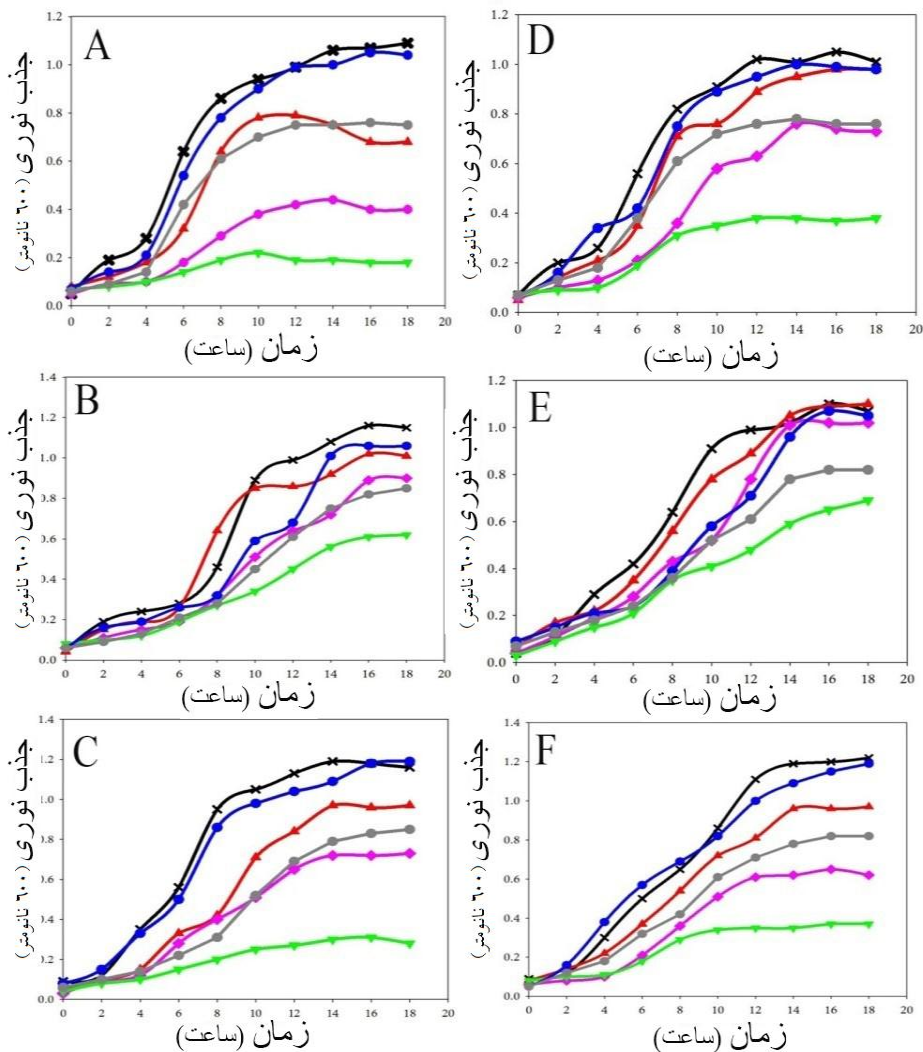


شکل شماره ۱. اشرشیاکلی استاندارد (A)، استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد (B)، سودوموناس آئروژینوزا استاندارد (C)، اشرشیاکلی مقاوم به دارو (D)، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به دارو (E)، سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو (F)

به طوری که در حضور فیکوسیاینین به تنهایی الگوی رشدی مشابه به نمونه کنترل مشاهده می‌گردد و فیکوسیاینین 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 فیکوسیاینین می‌گردد. هم چنین اثر ممانعت‌کنندگی از رشد زینک اکساید به تنهایی بالاتر از فیکوسیاینین گزارش گردید. در تمامی موارد فیکوسیاینین، نانوذرات زینک اکساید و زینک اکساید-فیکوسیاینین اثر مهاری بالاتری بر سویه های استاندارد مورد آزمون نسبت به سویه های مقاوم داشته‌اند.

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

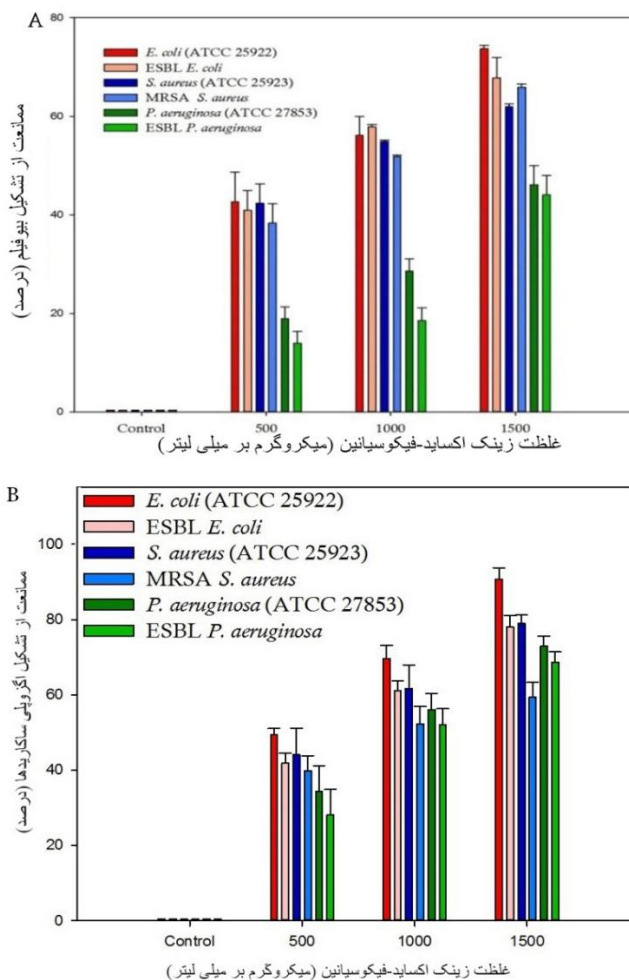
شکل شماره ۲، اثر غلظت های مختلف نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیاینین، زینک اکساید و فیکوسیاینین را در سویه های مورد آزمون در مقایسه با نمونه کنترل در بازه زمانی ۱۸ ساعته نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌گردد نمونه کنترل تیمار نشده بیشترین جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر و در نتیجه بیشترین میزان رشد باکتریایی در طول زمان را داشته است و با افزایش غلظت نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیاینین الگوهای متفاوتی از رشد در سویه های مختلف نشان داده شد.



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

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.

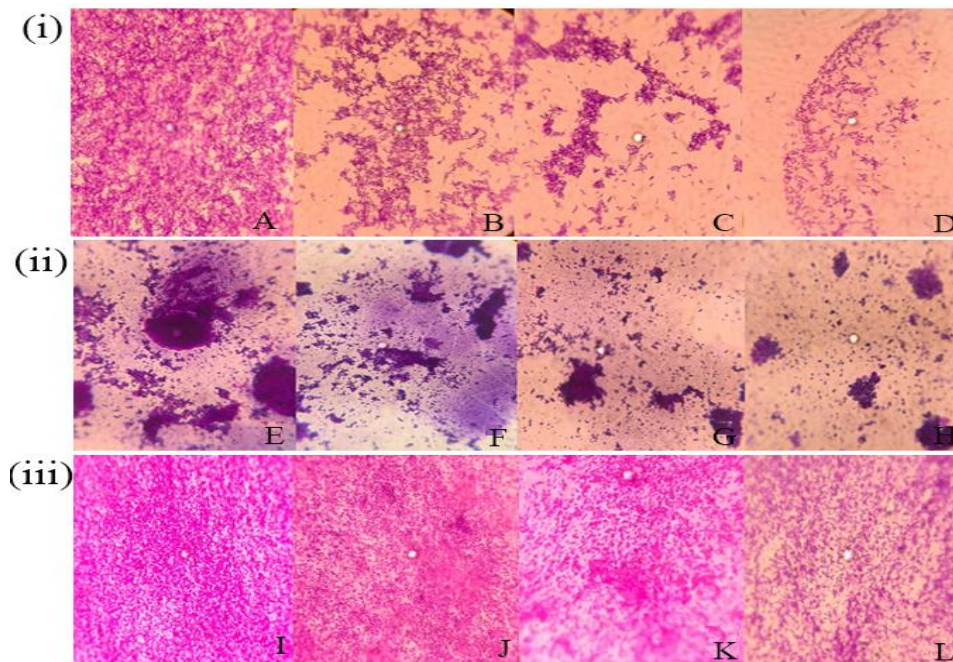
بیشترین درصد ممانعت از تشکیل بیوفیلم در رقت ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در برای باکتری اشرشیاکلی استاندارد و به میزان بالاتر از ۷۰ درصد گزارش گردید در حالی که در همین رقت اثر مهاری نانوذرات بر باکتری اشرشیاکلی مقاوم میزان پائین تری (پایین تر از ۶۵ درصد) گزارش گردید (شکل شماره ۳a). نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیاینین به طور موثرتری از تشکیل بیوفیلم سویه های استاندارد نسبت به سویه های مقاوم ممانعت می کنند و در این مورد



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

از تشکیل بیوفیلم توسط نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیاینین در باکتری گرم منفی اشرشیاکلی از سایر باکتری های استفاده شده در این مطالعه بیشتر می باشد و نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیاینین به طور موثرتری بیوفیلم حاصل از این باکتری را کنترل می کنند.

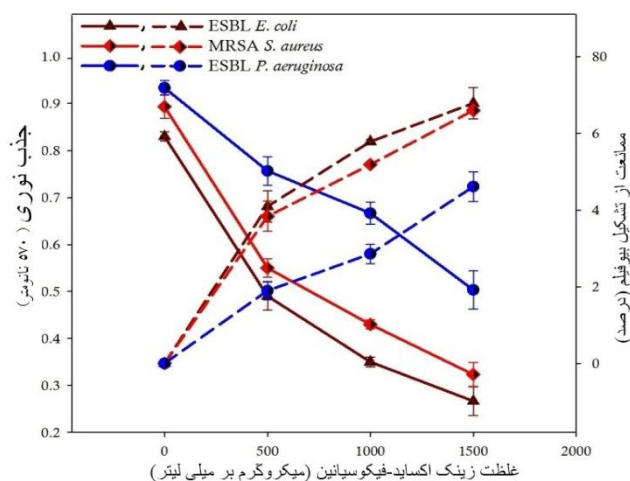
تصاویر حاصل از آنالیزهای میکروسکوپی بیوفیلم نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیاینین میزان تشکیل بیوفیلم کاهش یافته و به واسطه آن تراکم باکتری در سطح کاهش یافته است (شکل شماره ۴) نتایج نشان داد تاثیر ممانعت کنندگی



شکل شماره ۴. ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط (i) سویه باکتری اشرشیاکلی استاندارد در رقت های مختلف نانو نانوذرات زینک اکساید- فیکوسیائین (B) رقت $500 \mu\text{g/ml}$ (C) $1000 \mu\text{g/ml}$ (D) و $1500 \mu\text{g/ml}$ (A) نمونه کنترل فاقد نانو نانوذرات زینک اکساید- فیکوسیائین، (ii) سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد در رقت های مختلف نانوذرات زینک اکساید- فیکوسیائین (F) رقت $500 \mu\text{g/ml}$ (G) $1000 \mu\text{g/ml}$ (H) و $1500 \mu\text{g/ml}$ (E) نمونه کنترل فاقد نانوذرات زینک اکساید- فیکوسیائین، سویه باکتری سودوموناس آئروژینوزا استاندارد در رقت های مختلف نانوذرات زینک اکساید- فیکوسیائین (J) رقت $500 \mu\text{g/ml}$ (K) $1000 \mu\text{g/ml}$ (L) و $1500 \mu\text{g/ml}$ (I) نمونه کنترل فاقد نانوذرات زینک اکساید- فیکوسیائین

ایزوله های بالینی مورد آزمون کاهش یافته است (شکل شماره ۵).

هم چنین با افزایش غلظت نانوذرات، جذب نوری در 570 nm و متعاقباً میزان تشکیل بیوفیلم در



شکل شماره ۵. اثر تقابلی ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط نانوذرات زینک اکساید- فیکوسیائین و جذب نوری در 570 nm در ایزوله های بالینی مورد آزمون

میلی لیتر در برای باکتری اشرشیاکلی استاندارد و به میزان بالاتر از ۹۰ درصد گزارش گردید (شکل شماره

بیشترین درصد ممانعت از تشکیل آگزو پلی ساکاریدها در رقت $1500 \mu\text{g/ml}$ میکروگرم بر

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

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 بیوفیلیم 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 ضد میکروبی نانوذرات زینک اکساید بارگذاری شده با ترکیب فعال زیستی (فیکوسیانیین) در مقابل ۳ سویه باکتریایی استاندارد مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت و نتایج حاصله با اثرات ضد میکروبی 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-فیکوسیانیین در رقت های کمتر در مقایسه با فیکوسیانیین 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، استفیلوکوکوس 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 فیکوسیانیین بر نانوذرات زینک اکساید سبب ارتقا و تجمع اثر ضد میکروبی 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 فیکوسیانیین با اثرات ضدباکتریایی (بارگذاری شده بر نانوذره) سبب ارتقاء اثر ضد میکروبی نانوذرات خواهد

شد. هم چنین در مطالعات دیگر اثرات بالای ضد میکروبی در نانوذراتی که نسبت سطح به حجم بالایی دارند نشان داده شده است (۱۳، ۱۴).

ارزیابی اثر نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانیین بر کنتیک رشدی سویه های مورد آزمون نشان می دهد که به طور کلی با افزایش غلظت نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانیین 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 فیکوسیانیین 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 فیکوسیانیین (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-فیکوسیانیین 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 فیکوسیانیین 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 ضد میکروبی آن ها خواهد شد (۱۶). تاثیر نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیانیین 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 فیکوسیانیین از طریق اثرگذاری آن بر روی غشاء سلولی باکتری ها و تخریب آن می باشد. زمانی که رنگدانه فیکوسیانیین در محیط با

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 فیکوسیاین 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 فیکوسیاین به تنهایی بر روی غشاء سلولی باکتری ها بسیار پایین می باشد. با توجه به این که نانوذرات زینک اکساید-فیکوسیاین 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-فیکوسیاین، سایز کوچک و قدرت نفوذ بالای آن ها و علاوه بر آن ها خصوصیات آنتی باکتریال فیکوسیاین 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 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 سینرژسم و ارتقا اثر ضد میکروبی 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 می شوند 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. در این غلظت از نانوذره تراکم سلولی در سطح لام کمتر از سایر غلظت ها می باشد. هم چنین نانوذرات

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 مهارى بالاترى بر روى سويه هاى 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/خلاق: 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, Alsaied MS, Alkhedhairi 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

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 E.coli در تشکیل بیوفیلم نسبت به P. aeruginosa 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- فیکوسیاین در بازدارندگی از تشکیل بیوفیلم توسط باکتری های ذکر شده(که دارای پتانسیل بالا برای تشکیل بیوفیلم می باشند) می تواند به حضور فیکوسیاین به عنوان یک ترکیب فعال زیستی و یک عامل چلاته کننده اشاره کرد که سبب تخریب بیوفیلم

- 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.colsurf.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, Khedhairi AA. Reactive oxygen species mediated bacterial biofilm inhibition via zinc oxide nanoparticles and their statistical determination. *Plos One*

- 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 Mater Chem* 2018; 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 extracted from 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* on ion 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 Res* 2018. 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 *Spirulina platensis*. *Food Chem* 2008; 110: 436-45. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.021.

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 S¹, Shahabanizahiri H², Modarresi MH¹, Mohammadi M², 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 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