

## اثر مهارکنندگی نانوذرات اکسید آهن با پوشش کیتوسان بر جدایه‌های بالینی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و ارتباط آن با قدرت بیوفیلم باکتری

- **پرستو زمانی‌مزده:** گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
- **شهره زارع‌کاریزی\*:** گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
- **راحله صفایی‌جوان:** گروه بیوشیمی بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۷

### چکیده

بیوفیلم‌ها یکی از دلایل مهم مقاومت سویه‌های باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک به‌شمار می‌آیند. هدف از این مطالعه بررسی اثر مهارکنندگی نانوذرات اکسید آهن با پوشش کیتوسان بر جدایه‌های بالینی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و ارتباط آن با قدرت بیوفیلم باکتری می‌باشد. نانوذره  $Fe_3O_4$  از  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  \* و  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  سنتز شد و با کیتوسان اصلاح ساختار سطحی گردید. ویژگی‌های نانوذره با RD, FTIR, DLS, TGA و SEM تعیین شد. میزان تولید بیوفیلم در هر سویه بالینی سودوموناس آئروژینوزا براساس روش میکرو تیرپلیت اندازه‌گیری شد. بعد از تیمار سویه‌ها با نانوذره اکسید آهن، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) با روش میکروداپلوشن برآت تعیین گردید. نتایج نشان داد که نانوذره آهن با پوشش کیتوسان در غلظت‌های متفاوت (۰/۵۱۲ تا ۸۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا را مهار کرده و حداقل غلظت مهارکنندگی تشکیل بیوفیلم نانوذرات در سویه‌های مختلف متفاوت بود. نانوذره اکسید آهن پوشش داده شده با کیتوسان می‌تواند در درمان عفونت‌های بیوفیلم استفاده شود و به‌عنوان عوامل ضد میکروبی جدید با ارزش باشد.

**کلمات کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلم، نانوذرات اکسید آهن



## مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی فرصت‌طلب و بیماری‌زای انسان است (Fricks-Lima و همکاران، ۲۰۱۱). این باکتری سومین عامل عفونت‌های بیمارستانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلای است. میزان مرگ و میر در بیماران دچار نقص ایمنی توسط پنومونی‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزای بیمارستانی در حدود ۷۰٪ می‌باشد. عفونت‌های این باکتری غالباً در سوختگی‌ها، عفونت‌های ادراری و بیماری‌های ریوی مثل فیبروز کیستیک (CF) گزارش شده است. سودوموناس آئروژینوزا با تشکیل بیوفیلم توانایی محافظت در برابر سیستم ایمنی میزبان و عوامل ضد میکروبی مختلف را ایجاد می‌کند (Núñez و همکاران، ۲۰۰۴). بیوفیلم‌های باکتریایی، تجمعات پیچیده باکتری‌ها هستند که در یک پوشش گلیکوکالیکس محصور شده و به سطوح مخاطی می‌چسبند. سودوموناس آئروژینوزا در سیستم‌های آزمایشگاهی، بیوفیلم‌هایی به ضخامت چند صد میکرومتر با اشکال برجی و قارچی تشکیل می‌دهد. میکروارگانیسم‌های موجود در بیوفیلم به سطوح چسبیده و در بین آن‌ها تقسیم کار صورت می‌گیرد، کلونیزاسیون راحت‌تر صورت گرفته و در برابر جریان خون و ادرار پابرجا می‌ماند. باکتری‌های مولد بیوفیلم از دسترس سیستم ایمنی میزبان مانند فاگوسیتوز در امان مانده، هم‌چنین انتقال ژن راحت‌تر صورت می‌پذیرد و به دنبال آن غلظت بالایی از سموم خارجی (آگزوتوکسین) ایجاد می‌شود. حداقل غلظت مهاری مواد ضد میکروبی در حضور بیوفیلم افزایش قابل توجهی دارد (Núñez و همکاران، ۲۰۰۴). محققان به دلیل اهمیت بیوفیلم در ایجاد بیماری‌ها و مقاومت دارویی، در جستجوی راه‌کارهای مناسبی برای مهار و پیشگیری از تشکیل بیوفیلم هستند. هدف از این مطالعه اثر مهارکنندگی نانوذرات اکسید آهن با پوشش کیتوسان بر جدایه‌های بالینی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و ارتباط آن با قدرت تشکیل بیوفیلم باکتری است. نانوذرات اکسید آهن به‌عنوان یک درمان جدید برای برخی باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شود که برنامه‌های کاربردی تری را در تشخیص، نشانگرهای زیستی، علامت‌گذاری سلول، عوامل کنتراست برای تصویربرداری زیستی، عوامل ضد میکروبی، مهار تشکیل بیوفیلم، سیستم‌های داروسازی و درمان بیماری‌های مختلف می‌تواند، داشته باشد (Pier، ۲۰۰۰). یون‌های آهن بسیار واکنش‌پذیر هستند و به پروتئین‌های دیواره متصل و باعث تغییرات دیواره سلولی باکتری و غشاء هسته شده که در نهایت منجر به تخریب و مرگ سلول می‌شود و توانایی مهار همانندسازی باکتری با اتصال و دناتوره کردن DNA باکتری را دارند (Bjarnholt و همکاران، ۲۰۰۹).

## مواد و روش‌ها

**الف- ساخت نانوذرات اکسید آهن با پوشش کیتوسان:** مقدار ۲/۳۰۷ گرم پودر  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  و ۳/۹۷ گرم  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  در یک بالن ۱۰۰ میلی‌لیتر به حجم رسانده و سپس به یک بالن ۵۰۰ میلی‌لیتری سه دهانه منتقل شد. در این مرحله ۳۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور (Sonicator) قرار داده شد. مقدار ۷/۴۷ میلی‌لیتر آمونیاک غلیظ در یک بالن به حجم ۱۰۰ رسانده و درون قیف جداکننده (دکانتور) ریخته و قیف به یکی از دهانه‌های بالن وصل شد. یک مبرد (کندانسور) همراه با جریان آب به دهانه اصلی بالن سه دهانه متصل کرده و بالن را در حمام پارافین ۸۵ درجه قرار داده و رفلاکس تشکیل داده شد. در این مرحله آمونیاک با سرعت ۲ قطره بر ثانیه به محلول اضافه شد. پس از اتمام آمونیاک، این رفلاکس به مدت ۲ ساعت در دمای ۸۵ درجه انجام شد. سپس محلول داخل کریستالیزور ریخته شد. به دلیل خاصیت مغناطیسی نانوذرات اکسید آهن، با قرار دادن آهن‌ربا زیر کریستالیزور محلول به دو فاز تبدیل شده، مایع رویی را دور ریخته و ۲ بار با آب مقطر و ۲ بار با اتانول شست و شو شد. به منظور خشک شدن، نمونه به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Morovati و همکاران، ۲۰۱۶). محلول خشک شده همان نانو ذره اکسید آهن می‌باشد. سپس جهت اصلاح ساختار سطحی نانوذرات اکسید آهن با کیتوسان، ۰/۵ گرم کیتوسان ( $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9$ ) با وزن مولکولی کم، در ۵۰ میلی‌لیتر اسیداستیک ۱٪ حل شد. این محلول با سود ۱ مولار از ۳/۹ به ۴/۸ رسانده شد. نانوذرات را با محلول کیتوسان ژله‌ای مخلوط کرده و در دمای اتاق به مدت ۱۸ ساعت با بالاترین دور ممکن هم خورد. سپس توسط آهن‌ربا، نانوذرات اصلاح شده را جدا کرده و در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته تا خشک شد (Unsoy و همکاران، ۲۰۱۲).

**ب- روش‌های توصیف تحلیل نانوذرات:** در این تحقیق برای بررسی ساختار کلی نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی نگاره از (SEM=Scanning Electron Microscope)، به منظور تعیین توزیع نانوذرات از روش پراکندگی نور پویا (DLS=Dynamic Light Scattering)، جهت تعیین عموم کمیات ساختار کریستالی نانوذرات از تکنیک تابش اشعه ایکس (XRD=X-Ray Diffraction)، برای تعیین ساختار و شناسایی ترکیبات آلی از طیف سنجی مادون قرمز (FTIR=Fourier Transform Infrared Spectroscopy) و جهت کسب اطلاعات کمی و کیفی در مورد ترکیبات نانوذرات از روش آنالیز شتاب حرارتی (TGA=Fourier Transform Infrared Spectroscopy) استفاده شد (Baniasadi و همکاران، ۲۰۱۴).

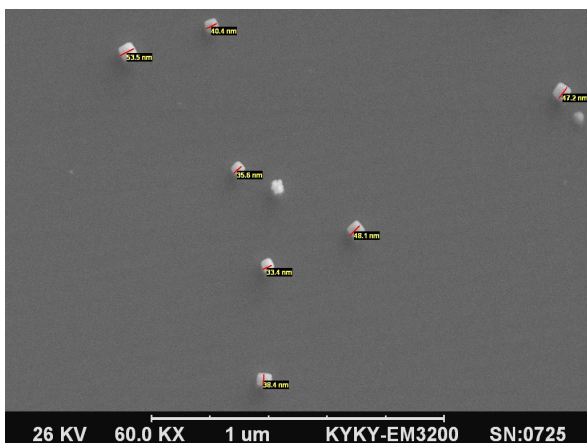


از گرم خانه خارج و از نظر ایجاد رنگ قرمز بررسی شدند. یک غلظت بالاتر از آخرین غلظتی که رنگ قرمز تترازولیم را به خود گرفته بود به عنوان MIC نانوذرات برای باکتری مورد بررسی در نظر گرفته شد. در این آزمون به منظور کنترل محیط کشت به عنوان بلانک از محیط کشت خالی (بدون نانوذره و باکتری) استفاده گردید (Mathur و همکاران، ۲۰۰۶).

**و- تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات اکسید آهن با پوشش کیتوسان:** ۱۰ میکرولیتر از چاهک‌هایی که در آن‌ها رنگ قرمز ایجاد نشده بود روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت متراکم داده شد. ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت، پلیت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی و آخرین غلظتی که در پلیت مربوط به آن، کلنی رشد نکرده بود به عنوان MBC نانوذرات برای باکتری در نظر گرفته شد (Mathur و همکاران، ۲۰۰۶).

## نتایج

**نتایج توصیف تحلیلی نانوذرات اکسید آهن با پوشش کیتوسان**  
**الف-۱- نتایج حاصل از تصاویر SEM:** تصاویر SEM ساختار مکعبی نانوذرات با سطحی صاف و هموار را نشان می‌دهد (شکل ۱). سایز نانوذرات مغناطیسی در تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی در حدود ۴۰ نانومتر گزارش شد.



شکل ۱: ساختار مکعبی ذرات آهن

**الف-۲- نتایج حاصل از آزمون DLS:** نتایج حاصل از آزمون زتا سایزر توسط دستگاه پراکندگی نور پویا نشان داد که ۷۶ درصد از ذرات سنتز شده قطری در حدود ۱۴/۵ نانومتر داشتند. Z average این آزمون ۵۴/۲ و PDI برابر با ۰/۳۸۶ (شکل ۲). پس از اصلاح سطح با کیتوسان، ۸۲ درصد از ذرات قطری در حدود ۱۸۳ نانومتر داشتند. Z average این آزمون ۴۱۱ و PDI برابر با ۰/۲۶۲ بود (شکل ۳).

## ج- نمونه‌گیری، کشت و تشخیص جدایه‌های سودوموناس

**آژروژینوزا:** این مطالعه توصیفی روی ۶۰ ایزوله سودوموناس آژروژینوزا می‌باشد. نمونه‌های جدا شده شامل خون، ادرار، زخم، ترشحات و خلط است که از بیماران بستری در بیمارستان سینا جمع‌آوری شد. با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی مانند رنگ‌آمیزی گرم، رشد در محیط مک کانکی آگار، تست‌های اکسیداز و کاتالاز، واکنش در محیط TSI، تست OF، بررسی تحرک، تولید اندول و گاز، رشد در در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و تولید پیگمان پیوسیانین در محیط مولر هینتون آگار، سویه‌های سودوموناس آژروژینوزا شناسایی شدند (Pier، ۲۰۰۰).

## د- بررسی تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها به روش میکروتیتیر

**پلیت (MTP=Microtiter Plate):** بالوپ تک کلنی باکتری‌ها از محیط کشت بلاد آگار برداشته شد و روی محیط TSA کشت متراکم داده و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس یک لوپ پراز باکتری‌های رشد کرده روی محیط TSA برداشته و درون لوله‌های آزمایش درپوش‌دار بدون تماس با جداره لوله‌ها تلقیح داده شد تا زمانی که مایع درون لوله کدورتی معادل نیم مک‌فارلند ایجاد کند. ۲۰۰ میکرولیتر از محیط حاوی باکتری به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه با ۳ بار تکرار منتقل شد و به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور شیکردار قرار داده شد. سپس رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله ۱۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. جهت بررسی شدت تشکیل بیوفیلم، پلیت‌ها در دستگاه خوانش سایتیشن ۳ (Cytation3) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرار داده و قدرت تشکیل بیوفیلم بر اساس جدول ۱ تعیین گردید (Mathur و همکاران، ۲۰۰۶).

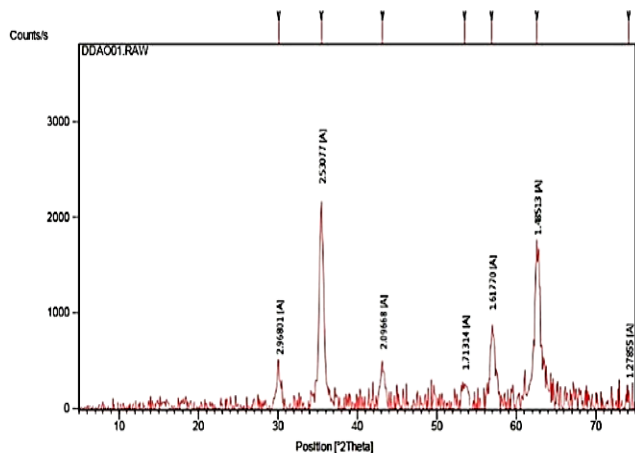
جدول ۱: جذب نوری در انواع بیوفیلم

نوع بیوفیلم	OD <sub>۵۷۰</sub> بر حسب نانومتر
بیوفیلم قوی	$OD_{570} \geq 1$
بیوفیلم متوسط	$0/1 \leq OD_{570} < 1$
بیوفیلم منفی	$OD_{570} < 0/1$

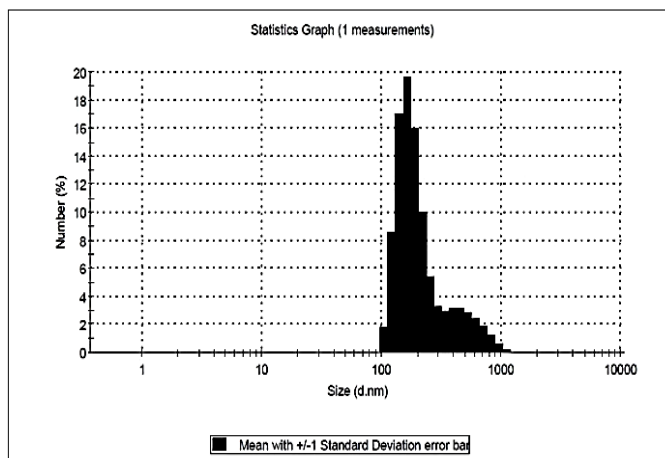
## ه- تعیین حداقل غلظت مهار (MIC=Minimum Inhibitory Concentration) نانوذرات اکسید آهن با پوشش کیتوسان: آزمایش

به صورت دو بار تکرار با استفاده از روش میکروداپلوشن برات در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. ۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون نانو ذرات با رقت‌های ۰/۲۵۶، ۰/۱۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به داخل چاهک‌ها ریخته شد. ۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری برابر با نیم مک‌فارلند از جدایه مربوطه افزوده گردید. در انتها پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. ۵۰ میکرولیتر محلول تری فنیل تترازولیم کلراید (TTC) با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از گذشت این مدت، پلیت‌ها

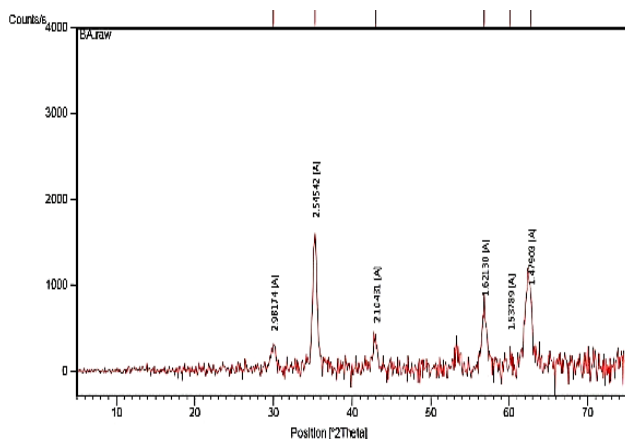




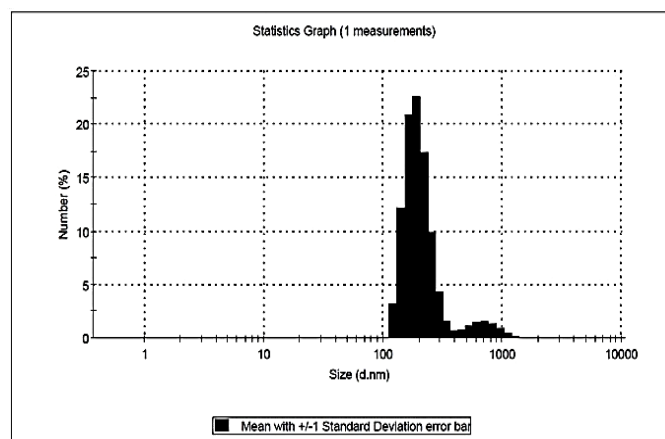
شکل ۴: نمودار نتیجه آزمون XRD از نانوذرات اکسید آهن اصلاح نشده



شکل ۲: نمودار نتیجه آزمایش DLS پس از اصلاح سطح نانوذرات



شکل ۵: نمودار نتیجه آزمون XRD از نانوذرات اکسید آهن اصلاح شده با کیتوسان



شکل ۳: نمودار نتیجه آزمایش DLS نانوذرات قبل از اصلاح

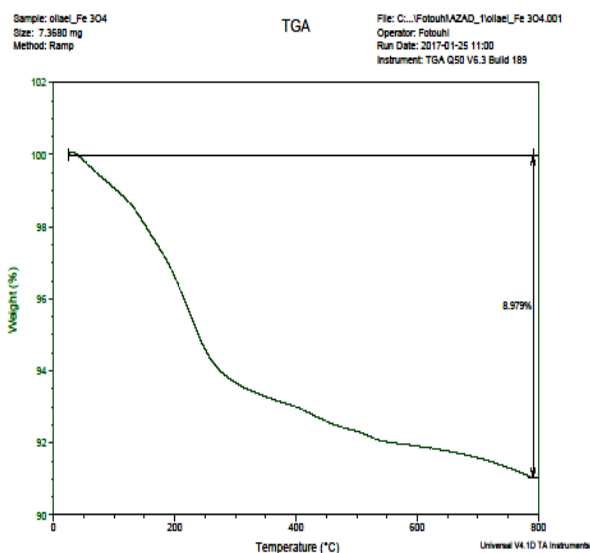
**الف-۴- نتایج FT-IR:** سنتز نانوذرات مغناطیسی به‌عنوان نتیجه اتصال Fe-O در Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> و هم‌چنین حضور لایه کیتوسان روی سطوح مغناطیسی توسط طیف FTIR مشخص شد (شکل ۶). حضور هسته Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> توسط جذب کششی قوی در ۵۷۹ cm<sup>-1</sup> که مربوط به پیوند Fe-O است، مشخص می‌کند که حضور پیک در ناحیه ۵۶۸ cm<sup>-1</sup> در طیف حاصل، حضور نانوذرات مگنتیت را تأیید می‌کند. پیک در محدوده ۳۴۱۴ مربوط به ارتعاش کششی OH و NH<sub>2</sub> مربوط به کیتوسان، پیک در محدوده ۱۶۱۷ مربوط به آمید نوع یک، پیک در محدوده ۱۳۹۸ مربوط به گروه کربوکسیل و پیک در ۱۰۷۴ مربوط به گروه‌های هیدروکسیل مربوط به کیتوسان می‌باشند. بنابراین طیف حاصل از این تکنیک حضور گروه‌های عاملی مربوط به پلیمر کیتوسان را در این ساختار تأیید می‌کند (شکل ۶).

**الف-۳- نتایج آزمون XRD:** الگوهای پراش پرتو ایکس نانوذرات تهیه شده به‌روش رسوب‌دهی در شکل ۴ و جدول ۲ ارائه شده است. پیک‌های قابل رویت به‌ترتیب مربوط به صفحات بلوری ۲۲۰، ۳۱۱، ۴۰۰، ۴۲۲، ۵۱۱ و ۴۴۰ می‌باشد که با تطابق پیک‌های این صفحات و زوایای پراش مربوط به آن‌ها با کارت شماره ۱۹-۰۶۲۹ کمیته مشترک پراش نگاری استاندارد پودرها مگنتیت بودن ذرات (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) تأیید شد. شکل ۵ الگوی پراش پرتوی ایکس در نانوذرات اصلاح شده با پلیمر کیتوسان را نشان می‌دهد. همان‌طور که قابل مشاهده است با ایجاد این لایه سطحی پلیمری، الگوی پراش پرتو ایکس هم تفاوت پیدا کرده است و از شدت پیک‌ها کاسته شده است که این نشان‌دهنده وجود ترکیب جدیدی در این ساختار می‌باشد.

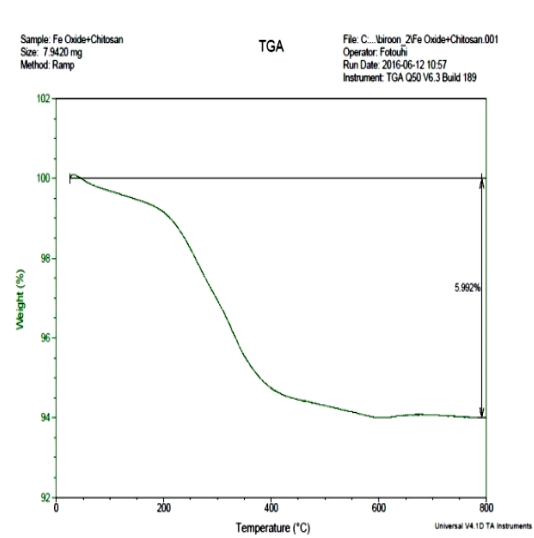
جدول ۲: مقایسه مقادارهای نظری d-value محاسبه شده برای Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> و Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> و مقایسه آن با مقدار d-value به دست آمده از پراش پرتو ایکس

صفحات بلوری	d-value محاسبه شده نظری برای Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> *	d-value محاسبه شده نظری برای Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> *	d-value محاسبه شده با نتیجه پراش پرتو ایکس	زاویه پراش (2θ)
۲۲۰	۲/۹۵۰	۲/۹۶۰	۲/۹۶۸۰۱	۳۰/۱۱
۳۱۱	۲/۵۱۰	۲/۵۳۲	۲/۵۳۰۷۷	۳۵/۴۷۰۹
۴۰۰	۲/۰۸۹	۲/۰۹۹	۲/۰۹۶۶۸	۴۳/۱۴۶۶
۴۲۲	۱/۷۰۰	۱/۷۱۰	۱/۷۱۳۱۴	۵۳/۴۸۸۷
۵۱۱	۱/۶۱۰	۱/۶۱۵	۱/۶۱۷۷	۵۶/۹۲۲
۴۴۰	۱/۴۷۰	۱/۴۸۰	۱/۴۸۵۱۳	۶۲/۵۴۳۸

\* در محاسبه فضای بین صفحات بلوری مگنتیت و مگهمیت از داده‌های نظری مربوط به کارت شماره ۱۹-۰۶۲۹ کمیته مشترک پراش نگاری استاندارد پودرها استفاده شده است.



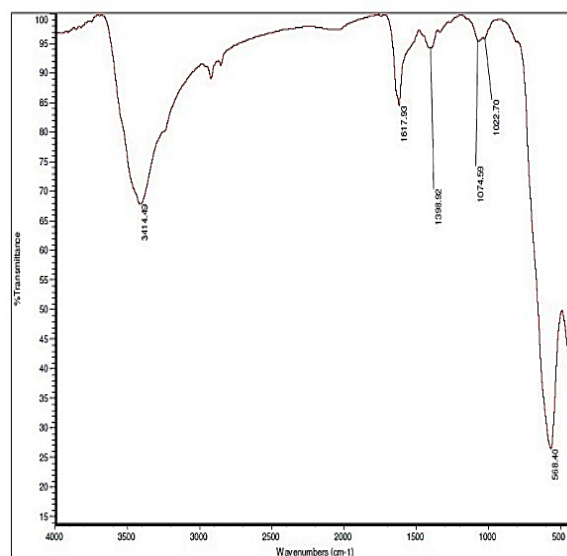
شکل ۷: نمودار طیف آنالیز حرارتی نانوذرات مگنتیت



شکل ۸: نمودار طیف آنالیز حرارتی نانوذرات مگنتیت اصلاح شده توسط پلیمر کیتوسان

### الف-۵- نتایج حاصل از آزمون TGA: نتیجه آنالیز حرارتی نانو

ذرات مگنتیت نشان داد تا دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد ۸/۹۷ درصد از وزن ذرات افت داشته است. از آن‌جا که افت وزنی تا دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد مربوط به آب جذب شده بر سطح ذرات می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت تقریباً ۵ درصد از این افت وزنی مربوط به رطوبت ذرات بوده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود پایداری حرارتی ذرات تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد بسیار بالا رفته است و تا این محدوده دمایی، افت وزنی چشمگیری مشاهده نمی‌شود. درحالی‌که پس از آن تا ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد کاهش وزن نشان داده شده است. داده‌ها نشان می‌دهد ذرات پوشش داده شده پایداری حرارتی بالاتری در مقایسه با ذرات بدون پوشش پیدا کرده‌اند. علاوه بر این که الگوی رفتار حرارتی متفاوت این دو نمونه خود تاییدی بر انجام موفقیت‌آمیز این اصلاح می‌باشد (شکل‌های ۷ و ۸).



شکل ۶: نمودار نتیجه آزمایش FTIR از نانوذره اکسید آهن اصلاح شده با کیتوسان



**ب- بررسی نتایج تست‌های تشخیصی سودوموناس**

**آئروژینوزا:** در این مطالعه از بین ۱۰۰ نمونه مشکوک، پس از انجام تست‌های تشخیصی ۶۰ نمونه مورد تایید قرار گرفت. نمونه‌ها از منابع مختلف چون ادرار، زخم، مایعات، ترشحات، تراشه و سایر نمونه‌های بالینی (خون، خلط، آبرسه) جداسازی شدند.

**ج- میزان بیوفیلیم تشکیل شده در نمونه‌های تیمار نشده:**

از ۶۰ نمونه سودوموناس آئروژینوزا ۳۳ مورد (۵۵٪) تشکیل دهنده قوی بیوفیلیم، ۲۷ مورد (۴۵٪) تشکیل دهنده ضعیف بیوفیلیم بودند. در این روش هیچ نمونه‌ای با بیوفیلیم منفی مشاهده نشد.

**د- میزان بیوفیلیم تشکیل شده و تعیین حداقل غلظت مهاری**

(MIC) در نمونه‌های تیمار شده با نانوذرات اکسید آهن با پوشش کیتوسان بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا: در مرحله بعد نانو

ذره آهن با پوشش کیتوسان بر سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا تاثیر داده شد. این نانوذره باعث تبدیل بیوفیلیم قوی به بیوفیلیم ضعیف در رقت‌های متفاوت گردید. لذا برای هر سویه حداقل غلظت مهاری بیوفیلیم توسط نانوذره تعیین گردید. در ۶۰ سویه سودوموناس آئروژینوزای مورد مطالعه حداقل غلظت مهار تشکیل بیوفیلیم باکتری ۳ مورد (۵٪) در غلظت ۲ میلی گرم/میلی لیتر، ۴ مورد (۶۶٪) در غلظت ۴ میلی گرم/میلی لیتر، ۶ (۱۰٪) مورد در غلظت ۶۰ میلی گرم/میلی لیتر، ۷ مورد (۱۱/۶۶٪) در غلظت ۰/۵۱۲ میلی گرم/میلی لیتر، ۹ مورد (۱۱/۶۶٪) در غلظت ۸۰ میلی گرم/میلی لیتر و ۳۱ مورد (۵۱/۶۶٪) در غلظت ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر مشاهده شد. نتایج بررسی بیوفیلیم و MIC به روش میکروتیتر پلیت و فراوانی منشا جداسازی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا، در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳: خلاصه نتایج تیمار نمونه‌های بالینی با نانوذره آهن با پوشش کیتوسان

MIC	تعداد سویه	بیوفیلیم	تعداد نمونه‌های ادرار	تعداد نمونه‌های زخم	تعداد نمونه‌های ترشحات	تعداد نمونه‌های تراشه	تعداد نمونه‌های سایر
۰/۵۱۲	۷	ضعیف	۳	۱	۰	۲	۱
۲	۳	ضعیف	۲	۱	۰	۰	۰
۴	۴	ضعیف	۰	۰	۱	۲	۱
۲۰	۱۳	ضعیف	۵	۴	۱	۱	۲
۲۰	۱۸	قوی	۳	۱	۴	۶	۴
۶۰	۶	قوی	۳	۲	۰	۱	۰
۸۰	۹	قوی	۴	۱	۰	۲	۲

**بحث**

مقبول گشته است. این فناوری از طریق کنترل عوامل بیماری‌زا در خدمت بشر می‌باشد. از این رو به لحاظ بازدهی بالا، عملی بودن و افزایش ظرفیت‌ها و مقرون به صرفه بودن از لحاظ اقتصادی و سازگاری با محیط زیست و ماندگاری بسیار زیاد در مقایسه با دیگر روش‌های بهبود فناوری و تولید ارجحیت دارد (Donlan و Costerton، ۲۰۰۲). Unsoy و همکاران (۲۰۱۲) نانوذرات اکسید آهن با پوشش کیتوسان را به روش کراس لینکینگ (Cross linking) با استفاده از تری پلی فسفات به منظور ایجاد اتصالات عرضی مولکول‌های کیتوسان با هم تولید کردند. نتایج XRD نانوذرات نشان داد که نانوذرات مگنتیت (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) بودند. وجود لایه کیتوسان بر سطح مغناطیسی از طریق نتایج FTIR تایید شد. نتایج TEM حاکی از آن بود که نانوذرات ساختار کروی دارند و قطر میانگین در ۱۸۳، DLs، نانومتر گزارش شد. برخلاف تحقیق Unsoy و همکاران (۲۰۱۲)، در پژوهش حاضر از روش هم‌رسوبی برای سنتز نانوذرات استفاده شده که نیاز به ماده حد واسطی جهت برقراری اتصالات عرضی ندارد. Lopez-Cruz و همکاران (۲۰۰۹) نانوذرات اکسید آهن با اتصالات کوالانسی کیتوسان را از روش تجزیه حرارتی و

سودوموناس آئروژینوزا شایع‌ترین عامل بیماری‌زا در جنس سودوموناس است. توانایی کلونیزه شدن این باکتری در مکان‌های مختلف به خصوص در محیط بیمارستان بر اهمیت آن در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی افزوده است (Amiri و Shah Zeidi، ۲۰۱۳). سودوموناس آئروژینوزا عامل ۱۰٪ عفونت‌های بیمارستانی شایع است (Rasamiravaka و همکاران، ۲۰۱۵). این پاتوژن تعداد زیادی از عوامل بیماری‌زا از جمله آنزیم‌ها، توکسین‌ها، پیگمان‌ها و بیوفیلیم تولید می‌کند. بیوفیلیم منجر به دورنگه‌داشتن عوامل ضدباکتریایی هومورال و سنتتیک از سلول‌های باکتریایی می‌گردد (Kalishwaralal و همکاران، ۲۰۱۰). افزایش کلونیزاسیون و بیوفیلیم‌های سودوموناس آئروژینوزا نشان دهنده این واقعیت است که عفونت‌های مرتبط با وسایل و تجهیزات بیمارستانی رو به افزایش است. محققین در تلاش هستند تا با گرفتن تصمیم‌های جدی در زمینه پیشگیری، از انتقال جلوگیری و در نتیجه آن کمک به ایمنی و سلامت بیماران نمایند. امروزه نانوذرات هم توجه خاصی را در این زمینه به خود اختصاص داده و استفاده آن در صنعت و پزشکی



تغییر لیگاند سطحی به یک سیلان کربوکسیلیک اسید تولید کردند. اتصال امیدی بین کیتوسان و نانوذرات مغناطیسی از طریق فعال سازی کربودیامید (Carbodiimide) تحت شرایط افزایش حلالیت کیتوسان و پایداری ذرات مشاهده شد. نتایج تست های تشخیصی نشان دهنده نانوذرات سوپرپارامغناطیس با پوشش کیتوسان بود که می تواند در محدوده وسیعی از pH در آب پایدار بماند. در پژوهش حاضر بر خلاف تحقیق Lopez-Cruz و همکاران (۲۰۱۲)، برای سنتز نانوذرات از روش هم رسوبی بدون نیاز به اتصالات جانبی و مولکول های واسطه استفاده شد روش هم رسوبی به دلیل سادگی، توجه بسیاری را به خود جلب کرده است و نسبت به روش های دیگر هم چون روش های هیدروترمال و تجزیه حرارتی، دما و زمان کمتری دارد. به علاوه حلال مورد استفاده در این روش (آب) مشکل زیست محیطی ندارد، راندمان واکنش بالا می باشد و امکان تولید نانوذرات در مقیاس بالا نیز وجود دارد. هم چنین در صورت ثابت بودن شرایط سنتز، کیفیت نانوذرات تشکیل شده کاملاً تکرار پذیر خواهد بود و این خود نقطه قوتی برای این پژوهش محسوب می گردد. جهت بررسی میزان تشکیل بیوفیلم توسط باکتری سودوموناس آئروژینوزا از روش میکروتیتر پلیت که به عنوان استاندارد طلایی مطرح می شود استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که از ۶۰ سوبه مورد مطالعه ۵۵٪ بیوفیلم قوی و ۴۵٪ بیوفیلم ضعیف تشکیل دادند و بیوفیلم منفی در هیچ کدام از سوبه ها مشاهده نشد. (O'Toole ۲۰۱۱) با بررسی تشکیل بیوفیلم گونه های وحشی و جهش یافته سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که این روش می تواند برای طیف گسترده ای از گونه های میکروبی مورد استفاده قرار گیرد. میکروب های متحرک به طور معمول به دیواره های پلیت و یا ته آن می چسبند در حالی که میکروب هایی که تحرک ندارند به طور معمول فقط به ته چاهک می چسبند. وی هم چنین بیان کرد که شرایط مطلوب برای تشکیل بیوفیلم به عنوان مثال: متوسط رشد، دما و مدت زمان انکوباسیون باید به طور تجربی برای هر میکروب تعیین شود. نتایج ishida و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از مطالعات میکروسکوپ الکترونی روی بیوفیلم نشان داد، در بیوفیلم های ۷ روزه ضخامت و ساختار بیوفیلم، بیش از بیوفیلم های ۱ روزه می باشد. هم چنین میزان بیوفیلم تولید شده به جنس بستر نیز وابسته است. تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا به عوامل متعددی از قبیل فاکتورهای محیطی هم چون قند (گلوکز و یا لاکتوز) یا میزان پروتئازهایی که در محیط کشت وجود دارند هم چنین زمینه ژنتیکی سوبه های سودوموناس آئروژینوزا وابسته است. آهن حرکت کششی را القا می کند در حالی که غلظت های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومتر تجمع سلولی و توسعه بیوفیلم را تحریک می کند. خارج از این محدوده، سودوموناس آئروژینوزا فقط می تواند به صورت پلانکتونیک زندگی کند و بیوفیلم نمی سازد. تحت شرایطی که میزان آهن بالاست،

سلول ها تکثیر می شوند اما به سطح اتصال پیدا نمی کنند، بنابراین بیوفیلم تشکیل نمی شود. طبق آزمایشات انجام شده مشاهده شد که حداقل غلظت مهارتی نانوذرات در جدایه های مختلف سودوموناس آئروژینوزا، متفاوت می باشد. این مساله احتمالاً می تواند به دلیل بالینی بودن جدایه ها، تفاوت و افزایش میزان مقاومت آن ها باشد. کمترین MIC اندازه گیری شده ۵۱۲/۰ میلی گرم/میلی لیتر در ۷ جدایه و بیشترین MIC اندازه گیری شده ۸۰ میلی گرم/میلی لیتر در ۷ سوبه از ۶۰ جدایه مورد بررسی است و بیش تر نمونه ها (۳۱ نمونه = ۵۱/۶۶٪) در غلظت ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر مهار تشکیل بیوفیلم شدند. Zafari و همکاران (۲۰۱۲) اثرات ضد باکتریایی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> و Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> در حضور نشاسته به عنوان عامل دیسپرس کننده بر سه باکتری سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلای و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی کردند. طبق نتایج تست های تعیین مشخصات ساختاری نانوذرات سایز بین ۳۰ تا ۴۰ نانومتر داشتند. نتایج آنالیزهای میکروبی حاکی از آن بود که نانوذرات  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> حتی در بالاترین غلظت و بعد از دیسپرس شدن، توانایی از بین بردن باکتری های مورد مطالعه را ندارد اما نانو ذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> توانایی غلبه بر باکتری های استفاده شده را به خصوص در بیشترین بازه غلظت مورد بررسی یعنی ۵۰ میلی گرم/میلی لیتر و در حضور نشاسته دارا می باشد. نتایج تحقیق حاضر از لحاظ نوع نانو ذره Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> و سایز نانوذرات با تحقیق Zafari و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد اما در تحقیق حاضر از پوشش کیتوسان به منظور افزایش نفوذ نانوذرات به باکتری استفاده شد در حالی که در تحقیق Zafari و همکاران (۲۰۱۲) از نشاسته به عنوان عامل دیسپرس کننده نانوذرات و افزایش نفوذ آن ها به باکتری استفاده شد. مزیت نتایج این مطالعه نسبت به مطالعه Zafari و همکاران (۲۰۱۲) غلظت های مهارکنندگی بسیار پایین تر است به طوری که بیشترین میزان مهارکنندگی (۵۱/۶۶٪) نمونه ها مربوط به غلظت ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر از نانوذرات می باشد که این مساله می تواند به دلیل استفاده از پوشش پلی ساکارییدی کیتوسان روی نانوذرات باشد که این خود نقطه قوتی برای این تحقیق است. Amiri و Shah Zeidi (۲۰۱۳) اثر دوزهای مختلف نانوذرات اکسید آهن (همراه با نشاسته و همراه با مرکاپتواتانول) بر مهار رشد سه باکتری سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلای و استافیلوکوکوس اورئوس را بررسی کردند. سایز نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (s) برابر با ۲۳ نانومتر و سایز نانوذرات Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (ME) برابر ۲۲ نانومتر گزارش شد. در مورد باکتری سودوموناس آئروژینوزا نتایج حاکی از آن بود که در هر دو نمونه از نانوذرات کسید آهن همراه با نشاسته و همراه با مرکاپتواتانول قطر هاله عدم رشد در غلظت ۲۵ میلی گرم/میلی لیتر از نانوذرات نسبت به دیگر غلظت ها بیشتر بود و گزارش شد که سودوموناس آئروژینوزا از دو باکتری مورد بررسی دیگر نسبت به این نانوذرات حساس تر است و رابطه مستقیمی



۳. Donlan, R.M. and Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. ClinMicrobiol Rev. Vol. 15, pp: 16-93.
۴. Fricks-Lima, J.; Hendrickson, C.M.; Allgaier, M.; Zhuo, H.; Wiener-Kronish, J.P. Lynch, S.V., 2011. Difference in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas Aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients. Intern J Antimicrob agents. Vol. 37, pp: 309-315.
۵. Ishida, H.; Ishida, Y.; Kurosaka, Y.; Otani, T.; Sato, K. and Kobayashi, H., 1998. In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 42, No. 7, pp: 1641-1645.
۶. Kalishwaralal, K.; Barath, M.K.S.; Pandian, S.; Deepak, V. and Gurunathan, S., 2010. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol. 79, pp: 340-344.
۷. López-Cruz, A.; Barrera, C.; Calero-DelC, V.L. and Rinaldi, C., 2009. Water dispersible iron oxide nanoparticles coated with covalently linked chitosan. Journal of Materials Chemistry. Vol. 19, No. 37, pp: 6870-6876.
۸. Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D.; Fatma, T. and Rattan, A., 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian journal of medical microbiology. Vol. 24, No. 1, pp: 25-36.
۹. Morovati, A.; Ahmad Panahi, H. and Yazdani, F., 2016. Grafting of allylimidazole and n-vinylcaprolactam as a thermosensitive polymer onto magnetic nano-particles for the extraction and determination of celecoxib in biological samples. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 513, pp: 62-67.
۱۰. Núñez, N.O.; Tartaj, P.; Morales, M.P.; Bonville, P. and Serna, C.J., 2004. Ytria-coated FeCo magnetic nanoneedles. Chemistry of materials. Vol. 16, No. 16, pp: 3119-3124.
۱۱. O'Toole, G.A., 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. J of Visualized Experiments. Vol. 47, pp: 2437-2446.
۱۲. Pier, G.B., 2000. Peptide, *Pseudomonas aeruginosa*, Polysaccharides and lipopolysaccharides players in predicament of cystic fibrosis patients. Trend Microbiol. Vol. 8, pp: 247-250.
۱۳. Rasamiravaka, Q.L.; Pierre, D. and El Jaziri, M., 2015. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms BioMed Research International. Volume 2015, Article ID 759348, 17 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/759348>.
۱۴. SepehriSeresht, S.; NajjarPeerayeh, S.; Sattari, M. and Rezaee, M.A., 2007. Production of plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn. Hakim Research Journal. Vol. 10, No. 1, pp: 61-65.
۱۵. Shah Zeidi, Z. and Amiri, G.H., 2013. Synthesis and Study of iron oxide nanoparticles on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. Second national conference on nanotechnology from theory to application.
۱۶. Tre-Hardy, M.; Vanderbist, F.; Traore, H. and Devleeschouwer, M.J., 2008. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. Int J antimicrob agent. Vol. 31, pp: 329-336.
۱۷. Unsoy, G.; Yalcin, S.; Khodadust, R.; Gunduz, G. and Gunduz, U., 2012. Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications. Journal of Nanoparticle Research. Vol. 14, No. 11, pp: 964.
۱۸. Winn, W.C.; Allen, S.D.; Janda, W.; Koneman, E.W.; Procop, G.W. and Schreckenberger, P.C., 2006. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
۱۹. Zafari, M.; Jafarpour, M. and Biazar, E., 2012. Antibacterial effects of Iron Oxide nanoparticles in the presence of dispersing agent, Young research club, Tonekabon branch, Islamic Azad university.

بین غلظت نانوذرات و میزان مهار باکتری مشاهده شد. از برتری مطالعه حاضر نسبت به مطالعه Amiri و Shah Zeidi (۲۰۱۳) می‌توان مشخص بودن جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا از هم و میزان قدرت آن‌ها در تشکیل بیوفیلم را ذکر کرد که برخلاف مطالعه Shah Zeidi و Amiri (۲۰۱۳) در مطالعه حاضر میزان مهار به غلظت نانو بستگی نداشت بلکه وابسته به نوع جدایه باکتری مورد مطالعه می‌باشد. تمامی باکتری‌های گرم منفی از جمله سودوموناس آئروژینوزا به دلیل ساختارشان مجبور به انتقال آهن موجود در محیط خارجی از طریق غشای خارجی، فضای پری‌پلاسمی و غشای سلولی به منظور وارد کردن آهن به سیتوپلاسم‌اند که آهن در آن می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد و ذخیره شود. سودوموناس آئروژینوزا مکانیسم‌های چندگانه‌ای را برای جذب آهن نشان می‌دهد. آهن نقش مهمی در مراحل مختلف تشکیل بیوفیلم از جمله در مکانیسم‌های انتقال پیام و ثبات ماتریس دارد. غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومتر تجمع سلولی و توسعه بیوفیلم را تحریک می‌کند. خارج از این محدوده، سودوموناس آئروژینوزا فقط می‌تواند به صورت پلانکتونیک زندگی کند و بیوفیلم نمی‌سازد. تحت شرایطی که میزان آهن بالاست، سلول‌ها تکثیر می‌شوند اما به سطح اتصال پیدا نمی‌کنند، بنابراین بیوفیلم تشکیل نمی‌شود. در نتیجه در پژوهش حاضر با توجه به اطمینان از جذب آهن توسط باکتری و خواص ضدبیوفیلمی آن در غلظت‌های بالاتر از محدوده محرک توسعه بیوفیلم از نانوذرات اکسید آهن استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات اکسید آهن با پوشش کیتوسان سنتزی می‌توانند به عنوان یک ماده مهارکننده بیوفیلم در جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا عمل کنند. بنابراین پیشنهاد می‌شود که میزان بیوفیلم در نمونه‌های بالینی بیش‌تر و اختصاصی‌تر و هم‌چنین عوارض جانبی نانوذرات اکسید آهن با پوشش کیتوسان بر انسان جهت تولید دارو بررسی شود.

## تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از کلیه کسانی که در انجام این تحقیق حمایت کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

۱. Baniasadi, M.; Tajabadi, M.; Nourbakhsh, M. and Kamali, M., 2014. Synthesis and characterization of Core Shell nanostructure containing super Paramagnetic Magnetite and PAMAM Dendrimers. Vol. 8, No. 3, pp: 51-63.
۲. Bjamsholt, T.; Jensen, P.O.; Fiandca, M.J.; Pedersen, J.; Hansen, C.R. and Anderson, C.B., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. PediatrPulmonol. Vol. 44, pp: 547-558.

