مقایسه فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات ژلاتین و ژلاتین ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*) و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

- **هما صادقی:** گروه زیست شناسی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات، تهران، ایران، صندوق پستی: ٧٧٥-١٤٥١٥
- **شهلا جمیلی*:** موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، صندوق پستی: ٦١١٦- ١٤١٥٥
- **سیدمهدی رضایت:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران
- **حسین عطار:** گروه زیست شناسی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات، تهران، ایران، صندوق پستی: ٧٧٥-١٤٥١٥
- **فرهاد کیمرام:** موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، صندوق پستی: ٦١١٦- ١٤١٥٥

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٥ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٥

چکیده

با توجه به بیماری‌های حاضر و افزایش آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌طور چشمگیری مقاومت پاتوژن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها بالا رفته است. نانوتکنولوژی یکی از روش‌های قابل استفاده می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر فعالیت ضدباکتری نانو ذره‌های ژلاتین و ژلاتین در مقابل باکتری‌های پاتوژنی هم‌چون \شرشیا\ کلی، \استافیلوکوکوس آرئوس و سودوموناس آئروژینوزا\ و مقایسه آن‌ها با هم و هم‌چنین تعیین MIC (حداقل غلظت بازدارندگی) و MBC (حداقل غلظت باکتری‌کشی) می‌باشد. ژلاتین و نانوژلاتین از ماهی تون زردباله استخراج شدند و با روش‌های دیسک دیفوژن، رقت‌های متوالی (برای ژلاتین) و توربیدیمتریک (نانوذرات ژلاتین) هم‌چنین MIC وMBC آن تعیین گردید. مقایسه سنجش فعالیت ضدباکتری ژلاتین و نانو ژلاتین نشان دادند که نانو ژلاتین (بر علیه باکتری \استافیلوکوکوس آرئوس و سودوموناس آئروژینوزا\ ) دارای فعالیت ضدباکتری بالاتری نسبت به ژلاتین (برعلیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا) وP برابر ٠/٠٢٤ می‌باشد. نانوژلاتین دارای MIC و MBC پایین‌تری نسبت به ژلاتین بوده و P برابر با ٠/٠٢٤ می‌باشد. نانو ذره‌های ژلاتین و ژلاتین می‌توانند اثر ضدمیکروبی خود را به‌صورت خاصیت منحصر به فرد نشان دهند. هم‌چنین نانوژلاتین خاصیت ضدباکتری بالاتری نسبت به ژلاتین دارد و این از خواص ویژه نانو ذرات می‌باشد. هم‌چنین با کوچک‌تر شدن اندازه ذرات نانوژلاتین خاصیت ضدباکتری افزایش می‌یابد (P>٠/٠٥ این واقعیت را تایید می‌کند) و این واقعیت برای نانو ذرات ژلاتین علاوه بر کاربرد احتمالی دارو به آن خاصیت ضدباکتری هم می افزاید.

کلمات کلیدی: نانو ذرات ژلاتین، کم‌ترین غلظت بازدارندگی، کم‌ترین غلظت کشندگی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: shahlajamili@yahoo.com

مقدمه

باپیشرفت تکنولوژی پزشکی و افزایش آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور چشمگیری مقاومت پاتوژن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها بالا رفته است. برای حل این مشکل نیاز به پیدا کردن نانو ذره‌های ضدباکتری وجود دارد (Mei، ۲۰۰۹). بررسی‌ها نشان داده است که هرچه اندازه نانو ذرات کوچک‌تر باشد، خصوصیات و فعالیت‌های جدید و متفاوت‌تری از خود نشان می‌دهند. این ویژگی‌ها باعث شده است که امروزه سرعت استفاده از نانو مواد بسیار سریع گسترش پیدا کند به‌طوری‌که در تمام ابعاد زندگی هم‌چون مبارزه با میکروب‌ها و تشخیص و درمان بیماری‌ها کاربرد آن شناخته شود (سعادتمندی و همکاران، ۱۳۹۱). از گذشته نانوذرات در دو بخش فلزی و غیرفلزی مورد بحث قرار می‌گرفته‌اند. نانوذرات‌فلزی درحشره‌کش‌هاوباکتری‌کش‌هاسال‌هاست‌مورد استفاده قرار می‌گیرند. نانو مواد در چرخه حیات و اکوسیستم، پایین‌ترین سطح سمیت را نشان داده‌اند لذا استفاده از این مواد برای مبارزه با میکروب‌های بیماری‌زا می‌تواند انتخاب مناسبی باشد. در مطالعات صورت گرفته نشان داده است که نانوذراتی چون Zn، Ti، Ag، Cr و اکسید آن‌ها خاصیت باکتری‌کشی بالایی دارند (ایمانی و همکاران، ۱۳۹۱). این نانو ذرات می‌توانند غیرفلزی با منشا طبیعی مانند کلاژن (lee و همکاران، ۲۰۰۱) و آلبومین (Kreutor، ۱۹۸۷) باشد.

اثرات ضدباکتری نانوذرات کیتوزان و کیتوزان که مس بر روی آن بارگذاری شده بود، بررسی شده است. باکتری‌های مورد بررسی *اشرشیا کلی*، *سالمونلا کلرواسوئیس* و *سالمونلا انتریتیدیس* بودند (Lifengوهمکاران، ۲۰۰۴). فعالیت ضدباکتری کیتوزان و نانوکیتوزان بر روی باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس آرئوس* انجام شده است و هم‌چنین کم‌ترین غلظت بازدارندگی برای نانوژلاتین تعیین شد (سلامی و همکاران، ۱۳۹۳). هم‌چنین آماده‌سازی و بررسی اثر ضدباکتری نانو ذرات نقره به‌همراه ژلاتین گاوی بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس*(ازگروه باکتری‌های گرم مثبت)و *سودوموناس آئروژینوزا* (ازگروه باکتری‌های گرم‌منفی)بررسی‌شده است (Darroudi و همکاران، ۲۰۱۳). تحقیقات متعدد، مبتنی بر واکنش‌های احتمالی بین نانو ذرات با ماکرو مولکول‌های موجودات زنده انجام گرفته است اختلاف بین بار منفی میکروارگانیسم و بار مثبت نانو ذره، به‌صورت یک الکترو مغناطیس جاذب بین میکروب و نانو ذره عمل کرده و باعث اتصال نانوذره به سطح سلول شده و در نتیجه می‌تواند باعث مرگ باکتری شود. در نهایت تعداد زیادی از این تماس منجر به اکسید شدن مولکول‌های سطحی میکروب‌ها و مرگ سریع آن‌ها می‌شوند. احتمال داده می‌شود یون‌های آزاد شده از نانو مواد با گروه‌های تیول پروتئین‌های سطحی سلول‌های باکتری‌هایی واکنش دهند. تعدادی از این پروتئین باعث غیرفعال شدن و نفوذ ناپذیری غشا می‌شوند. غیرفعال شدن تراوائی غشاء در نهایت باعث مرگ سلول می‌شود. هم‌چنین نانو مواد، چسبیدن سلول باکتری و تشکیل بیوفیلم را به تاخیر می‌اندازد که این عمل باعث می‌شود گروهی از باکتری‌ها نتوانند تثبیت شوند و تکثیر یابند (ایمانی و همکاران، ۱۳۹۱).

ژلاتین از هیدرولیز کلاژن به‌دست می‌آید که دارای کاربردهای غذایی، دارویی، آرایشی، بهداشتی و عکاسی است. ژلاتین از دو منبع پستانداران (خوک و گاو) و آبزیان استخراج می‌شود. ژلاتین آبزیان به‌دلیل حلال و ارزان بودن (Kim، ۲۰۰۶) پایین بودن اسیدهای آمینه هیستیدین خطر اسفنجی شدن را نداشته (Cho و همکاران، ۲۰۰۶) و هم‌چنین پایین بودن اسیدآمینه گلایسین (فاقد جنون گاوی بوده) (Cho و همکاران، ۲۰۰۶) و ژلاتین استخراج شده از ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*) ازنظرخصوصیات فیزیکی‌و شیمیایی‌به ژلاتین پستانداران شباهت داشته و می‌تواند جایگزین ژلاتین پستانداران شود (Choو همکارانش، ۲۰۰۶).ژلاتین استخراج شده از ماهی تون زردباله دارای‌هیدروکسی پرولین(واحد ضدباکتری)بالایی‌نسبت‌به پستانداران می‌باشد. نانوژلاتین به‌دست آمده از ژلاتین این گونه می‌تواند خواص بهتری را نسبت به ژلاتین نشان دهد. به‌واسطه اندازه آن و درگیر شدن با باکتری‌های گرم مثبت و منفی اثرات آنتی باکتریال بیش‌تری را انتظار داشت. نانوژلاتین تولید شده بر کاربردهای دارویی می‌تواند ضدباکتری هم باشد. دلیل انتخاب خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات ژلاتین وژلاتین بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* و *اشریشیاکلی* این است که *استافیلوکوکوس آرئوس* علت بسیاری از بیماری‌های عفونی است. این باکتری درطبیعت انتشاروسیع‌داشته و غالباً به‌صورت میکروفلور طبیعی پوست، بینی و بخش فوقانی دستگاه تنفس دیده می‌شود (سعادتمند و همکاران، ۱۳۹۱) *اشرشیا کلی* در روده بزرگ انسان و حیوان وجود دارد و تنها گونه در این جنس است که در بیماری‌زائی انسان اهمیت دارد، این باکتری از شایع‌ترین علت‌های عفونت ادراری است و به‌عنوان یک ارگانیسم‌فرصت‌طلب در عفونت‌های زخم و مننژیت شرکت می‌کند. علاوه بر این برخی از این گونه‌های آن عامل عفونت‌های اسهالی هستند (سعادتمند و همکاران، ۱۳۹۱). در این تحقیق اثرات آنتی‌باکتریال ژلاتین و نانوژلاتین بر علیه نماینده باکتری گرم‌مثبت،باکتری(*Staphylococcusaureus*)*استافیلوکوکوس آرئوس* و نماینده باکتری‌های گرم منفی (*سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) و *اشرشیاکلی* (*Esherichia coli*) سنجیده‌شدند.هم‌چنین MIC(Minimum inhibitory concentration) و(MBC)(Minimum bactericidal concentration)به‌ترتیب کم‌ترین غلظت بازدارندگی و کم‌ترین غلظت کشندگی برای نانوذرات ژلاتین و ژلاتین تعیین گردیدند.

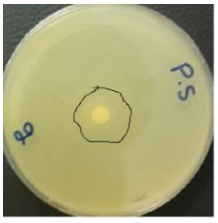
مواد و روش‌ها

ماهی گیدر در مرداد ماه سال ۱۳۹۳از دریای عمان صید و تهیه شد. سپس به‌همراه یخ فراوان در یخدان‌هایی به آزمایشگاه زکریای رازی واقع در دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات منتقل شد. استخراج ژلاتین به‌روش قلیایی به‌شرح زیر انجام شد. در آغاز پوست جدا شده و فلس‌ها کاملاً از پوست جدا شدند. سپس پوست را کاملاً تمیز کرده و جهت استخراج آماده شدند. در این مرحله با آب مقطر شستشو داده و پس از آن در محلول مقدار ۸ وزنی حجمی آن را در محلول قلیایی ۳/۱٪ هیدروکسید سدیم در دمای ۱۰ درجه در انکوباتور شیکردار با دور (RPM۲۰۰۰) قرار داده شد. درس از شستشوی کامل با آب مقطر جهت خنثی سازی، عمل قبل را با اسیدهیدروکلریدریک ۶ نرمال انجام شد. در مرحله بعد جهت استخراج، آب مقطر را به‌میزان ۶برابر اضافه شد و در دمای بین ۴۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹ ساعت روی هیتراستیرر قرار داده شد تا ژلاتین آن استخراج گردد. پس از گذشت این مدت، مایع را در دور (RPM ۲۰۰۰) در دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ کرده و بعد آن را در پلیت‌هایی‌ریخته و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در آون به‌مدت یک شبانه روز نگه داشته شد تا خشک شود (Cho و همکاران، ۲۰۰۶). نانو ذرات ژلاتین به این ترتیب تهیه شدند که ۶۲ گرم ژلاتین را در بشر کوچک بر روی استیرر با دور ۷۰۰ RPM در حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد در ۱۲/۵میلی‌لیتر آب و ۱۲/۵میلی‌لیتر استون مخلوط گردید و ۱۰/۵میلی‌لیتر آب اضافه شد pH آن را به ۱۲رسانده و ۰/۲۵ میلی‌لیتر بر دقیقه استون به‌وسیله پمپ اینفوژن به آن اضافه شد. ۱۰۰ ماکرولیتر گلوترآلدهید به آن اضافه شد و به‌مدت ۱۲ساعت بر روی استیرر با دور ۷۰۰ گذاشته شد در مرحله بعد نانو ذرات تهیه شده در دور RPM۱۰۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند (Vorgelegt و همکاران، ۲۰۰۶). سنجش ضدباکتری به‌این ترتیب انجام شد. باکتری‌ها با ATCCهای مشخص که عبارت بودند از *سودوموناس آ یروژنوزا*، ۲۷۸۵۳، *اشرشیاکلی* ۲۵۹۲۲ و *استافیلاکوکوس آ رئوس* ۲۵۹۲۳ از شرکت پادتن طب به‌صورت لیوفیلیزه خریداری شدند. از سویه‌های موردنظر (*اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس آ رئوس* و *اشرشیاکلی*) مطابق با رقت نیم مک فارلند تهیه شد و مطابق با می‌توان از کشت ۴ ساعته میکروب در محیط تریپتوکیس براث که در روی شیکر ۳۵ تا ۳۷درجه سانتی‌گراد کدورت رقت نیم مک فارلند مطابقت داده شد (Qi و همکاران، ۲۰۰۴). تنظیم‌رقت سوسپانسیون میکروبی با OD که در ۶۰۰ نانومتر عدد ۱ را نشان می‌دهد و در حدود 10^5 (cfu/mg) (شمارش کلونی بر میلی‌گرم) باکتری را شامل می‌شود انجام شد و بعد بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند (Raafat و همکاران، ۲۰۰۸). برای سنجش خاصیت ضدباکتری ژلاتین از روش دیسک دیفوژن (Disc diffusion) استفاده گردید. یک گرم از ژلاتین را در یک سی‌سی آب حل کرده و دیسک‌های خالی را به‌مدت ۱ ساعت در داخل آن قرار داده و دیسک‌ها در داخل پلیت‌هایی که باکتری‌ها در غلظت نیم مکفارلند تهیه شده‌اندو درکنار شعله به‌صورت ۴ مرحله‌ایی (بر روی پلیت‌های محیط کشت مولر هینتون آگارکشت داده شده‌اند قرار گرفتند. این پلیت‌ها به‌مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد در انکوباتور ماندند. از آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به عنوان شاهد منفی جهت ایجاد هاله برای هر سه نوع باکتری استفاده شد. برای کنترل هم یک محیط کشت خالی درنظر گرفته شد. جهت تعیین MIC و MBCاز روش رقت‌های متوالی (serial dilution) استفاده گردید و ۶ رقت برای ژلاتین تهیه شد و دیسک‌های خالی را به‌مدت یک ساعت در رقت‌های مختلف قرار داده و بعد از یک ساعت آن‌ها را در شرایط استریل (در زیر هود) درکنار شعله دیسک‌ها را در پلیت‌هایی از باکتری‌ها (که با غلظت نیم مکفارلند کشت چهار مرحله‌ای شده بودند) قرار داده شد. این پلیت‌ها به‌مدت یک شبانه روز (ماندن در انکوباتور) در صورت وجود هاله، قطر آن اندازه‌گیری شد (Nester و همکاران، ۲۰۰۳). کمترین غلظت بازدارنده و کشنده نانو ذرات ژلاتین به‌وسیله متد توربیدومتریک تعیین می‌شود (Nester و همکاران، ۲۰۰۳) تلقیح باید به‌میزان 10^7 (cfu/mg) (واحدشمارش کلونی بر میلی‌گرم) تست هر کدام شامل ۵ میلی‌لیتر مولر هینتون براث می‌باشد که به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه‌سانتی‌گراد استریل شده‌اند. به آن آب مقطر اضافه شدتا pH به۱۲ رسید. در اولین لوله، ۵ میلی‌لیتر محلول سوسپانسیون ژلاتین و نانوژلاتین (یک میلی‌لیتر در میلی‌لیتر) اضافه می‌شود و بعد از مخلوط کردن ۵ میلی‌لیتر از آن به لوله بعدی منتقل گردید و به همین ترتیب رقت‌های بعد ساخته می‌شوند. پس هر لوله شامل سوسپانسیون نمونه موردنظر با ۵میلی‌لیتر از سوسپانسیون قبلی است. سپس به لوله‌ها ۵۰ ماکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی که در بالا توضیح داده شد تلقیح شد. تست کنترل مثبت با اضافه کردن سیپروفلوکساسین انجام شد . تست کنترل شاهد شامل مولر هینتون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه می‌شوند (Nester و همکاران، ۲۰۰۳). باتوجه به کدورت آن‌ها MIC، MBC تعیین می‌شوند. یک لوپ پر از هر کدام از این لوله‌ها (لوله‌هائی از تست حداقل غلظت بازدارندگی) به محیط نوترینت آگار تلقیح شد و برای رشد باکتری‌ها مورد آزمایش قرار می‌گیرد. کدورت نشان‌دهنده عدم رشد باکتری‌ها و فعالیت ضدباکتری در لوله‌ها بوده و مورد بررسی قرار گرفت (Nester و همکاران، ۲۰۰۳).

پردازش‌های آماری: از روش رگراسیون (مدل‌سازی مدل پیش‌بینی) جهت بررسی خاصیت ضدباکتری و رابطه آن با اندازه نانوذرات ژلاتین کمک گرفته شد.

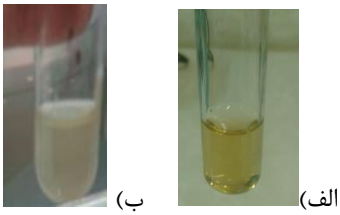
نتایج

خاصیت ضدباکتری: ژلاتین دارای فعالیت ضدباکتری خود را برعلیه باکتری‌های گرم منفی نشان داد که نمایندهٔ آن باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* بود (شکل ۱). ژلاتین توانسته است هاله‌ایی را به قطر ۳میلی‌متر بر علیه باکتری *سودوموناس* ایجاد کند. MIC(کم‌ترین غلظت بازدارندگی) و MBC (کم‌ترین غلظت کشندگی) ژلاتین در غلظت (در ۵ و ۴) به‌ترتیب ۶۲ و ۱۲۵ (ماکرولیتر بر میلی‌لیتر) در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد (شکل ۲). درحالی که فعالیت ضدباکتری نانوژلاتین برعلیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی، که نمایندگان آن باکتری‌های عبارت است از باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. کدورت لوله‌ها نشان‌دهنده اثر ضدباکتری می‌باشد (شکل ۳) و به‌ترتیب درغلظت‌های ۳۱ و ۶۲ ماکرولیتر بر میلی‌لیتر نانوذرات ژلاتین اثر ضدباکتری بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد و هم‌چنین کدورت در لوله‌ها نشان‌دهنده فعالیت ضدباکتری می‌باشد (شکل ۳). MIC و MBC شاهد منفی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در جدول ۱ نشان‌داده شده است. هم‌چنین شکل ۴ هاله ضدباکتری آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین را نشان می‌دهد.



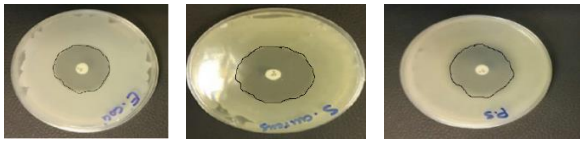
شکل۱: هاله ضدباکتری ماهی تون زردباله به قطر ۳ میلی‌متر بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*

شکل ۲: MBC, MIC ژلاتین بر روی باکتری *سودوموناس* به ترتیب در رقت‌های ۵ و ۴ و غلظت‌های ۶۲ و ۱۲۵ (ماکرولیتربرمیلی‌لیتر) و ایجاد هاله‌هایی به قطر ۱و۰/۵ میلی‌متر



ب) الف)

شکل ۳: (الف) نشان‌دهنده عدم کدورت (عدم فعالیت ضدباکتری در نانو ذرات ژلاتین) و شکل (ب) نشان‌دهنده کدورت (فعالیت ضدباکتری در نانوذرات ژلاتین) در *استافیلوکوکوس آرئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا*



ج) ب) الف)

شکل ۴: ایجاد هاله‌هایی به قطر ۳۱،۳۵،۳۴میلی‌متر در سیپروفلوکساسین (به‌عنوان شاهد منفی) به‌ترتیب بر روی باکتری‌های الف) *سودوموناس آئروژینوزا*، ب) *استافیلوکوکوس آرئوس* و ج) *اشرشیاکلی*

ارتباط بین اندازهٔ نانوذرات ژلاتین و فعالیت ضدباکتری: نشان می‌دهد که نانو ذرات ژلاتین فعالیت ضدباکتری بر علیه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* را دارد. زمانی‌که اندازه نانوذرات به زیر ۶۵۹ نانومتر می‌رسد به خاصیت ضدباکتری آن افروده شده و به باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* هم خاصیت ضدباکتری هم پیدا می‌کند. پس با کوچک‌تر شدن اندازه ذرات خاصیت ضدباکتری افزایش میابد (جدول۲).

جدول ۱: MIC و MBC (ماکرولیتر بر میلی‌لیتر) شاهد منفی (آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین)

(ماکرولیتر بر میلی‌لیتر)	MIC	MBC
شاهد منفی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین	۱۰۰۰	۱۰۰۰
سودوموناس آئروژینوزا	۱	۰/۲۵
استافیلوکوکوس آرئوس	۰/۵	۰/۱۲
اشرشیاکلی	۰/۰۱۵	۰/۰۰۴

جدول۲: ارتباط بین اندازه نانوذرات ژلاتین و وجود (+) یا عدم وجود (-)فعالیت ضدباکتری

اندازه نانوذرات ژلاتین (نانومتر)	۱۳۲	۱۴۳	۱۷۰	۲۷۹	۳۴۱	۶۵۹	۹۱۱	۱۰۱۹	۱۱۲۴
فعالیت ضدباکتری *سودوموناس آئروژینوزا*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
فعالیت ضدباکتری *استافیلوکوکوس آرئوس*	_	_	_	_	_	_	_	_	_

نتایج آماری: بااستفاده از رگراسیون (مدل‌سازی مدل پیش‌بینی) با کاهش اندازه نانوذرات ژلاتین اثر ضدباکتری آن افزایش می‌یابد. نتایج آماری نشان می‌دهد که فعالیت ضدباکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس آرئوس* (متغیرهای ثابت) و هم‌چنین اندازه نانوذرات ژلاتین (متغیر وابسته) دارای رابطه هستند. P<۰/۰۲۳ بوده و معنی‌دار می‌باشد R برابر ۰/۲۴، خطای استاندارد برابر با ۲۷/۹ و ۲۵۶/۵ انحراف معیار آن می‌باشد و نتایج آماری تاثیر اندازه را بر اثر ضدباکتری تایید می‌کند.

بحث

مقایسه سنجش فعالیت آنتی باکتریال ژلاتین و نانو ژلاتین نشان دادند که نانو ذرات ژلاتین دارای فعالیت آنتی باکتریال بالاتری نسبت به ژلاتین می‌باشد. نانو ذرات ژلاتین دارای MBC و MIC پایین‌تری نسبت به ژلاتین ماهی تون زردباله می‌باشد نانوذرات ژلاتین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارای مزیت‌هائی می‌باشند که مهم‌ترین آن‌ها این است که باکتری‌ها نسبت به نانوذرات مقاومت پیدا نمی‌کنند زیرا نانو ذرات بر روی قسمت‌های مختلف و آنزیم‌های متعددی موثر هستند، زیرا سلول‌های انسانی به‌صورت بافت هستند.

Alizadeh و همکاران (۲۰۱۳)، بر روی اثرات ضدباکتری نانو ذرات نقره بر روی *Brucella melitensis* در مدل جانوری در آزمایشگاه، کار کردند. *Burcellosis* یکی از باکتری‌ها معمول جانوری در دنیاست که عفونت ایجاد می‌کند. بروز عفونت بالا در بسیاری از جوامع به‌خصوص در مدیترانه و در آسیای غرب اتفاق می‌افتد. بعد از انکوباسیون نانوذرات نقره بر روی باکتری *Burcellosis melitensis* که ۴۰ دقیقه بوده است اثر باکتری کشی بسیار خوبی علیه این باکتری دارد.

Salem و همکاران (۲۰۱۵) اثر ضدباکتری دونوع ازنانوذرات نقره و روی را بر روی دو باکتری *اشرشیاکلی* و *ویبریوکلرا* که باعث اسهال و هم‌چنین در کشورهای جهان سوم سبب مرگ می‌شوند، مطالعه کردند. طراحی نانوذراتی که به طول ۹۰ تا ۱۰۰ نانومتر بوده و کم‌ترین غلظت بازدارندگی آن را هم بررسی کردند و دریافتند که نانوذرات روی اثرات کم‌تری بر روی باکتری‌های مذکور داشته و نانونقره اثرات ضدباکتری بهتری داشته است. Lifeng و همکاران (۲۰۰۴) برروی آماده‌سازی ذرات نانو کیتوزان و اثرات ضدباکتری آن کار کردند. هدف آن‌ها ارزیابی اثرات آنتی‌باکتریال برعلیه میکرواورگانیسم‌های متعدد ذرات نانو کیتوزان و نانو ذراتی که مس بر آن اضافه شده، بود. نانو ذرات کیتوزان بر پایهٔ ژلاتین یونی از کیتوزان با آنیون‌های تری پلی‌فسفات آماده‌سازی شده‌اند. یون‌های مس به نانو ذرات کیتوزان جذب می‌شوند. مشخصات فیزیکو شیمیایی نانو ذرات با اندازه‌گیری سایز آن، پتانسیل، نیروی اتمی میکروسکپی، FTIR آنالیز و زمینه‌های XRD را تعیین کردند. اثرات آنتی باکتریال نانو ذرات کیتوزان و نانو ذرات کیتوزان و بارگذاری با مس به باکتری‌های *E coli*، *S. choleraeuis*، *S. typhimurium* و *S. aureus* بررسی شد. MIC و MBC را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دادند که غلظت نانوذرات کیتوزان در MIC و MBC ۲/. ماکروگرم بر میلی‌لیترمی‌باشد و میزان اثرات ضدباکتری آن با اضافه شدن مس به نانوکیتوزان، افزایش می‌یابد.

Guillen و همکاران (۲۰۱۱) بر روی اثرات ضدباکتری و آنتی اکسیدان ژلاتین ماهی تون و اسکوبید کار کردند و نتایج آن‌ها نشان داد که از میان باکتری‌های مورد بررسی بر روی باکتری‌های گرم مثبت بوده و هم‌چنین باکتری *Lactobacillus acidophilus* که گرم مثبت بوده و *Bifidobacterium lactis* در روده بزرگ بسیاری ازپستانداران و انسان زندگی می‌کنند و متعلق به باکتری‌های گرم منفی به *Photobacterium phosphoreum* اثر آنتی باکتریال خود را نشان داده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده و مطالعات گذشته ژلاتین را به عنوان پایدارکننده استفاده کرده‌اند. در این تحقیق به‌صورت اختصاصی بر روی خاصیت ضدباکتری آن بررسی شده و از باکتری‌هایی استفاده شده که در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت داده‌اند هم‌چنین بررسی خاصیت‌ضدباکتری نانوذراتی از پروتئین (ژلاتین) تهیه شده‌اند، برخلاف نانو ذرات نقره و طلا، می‌تواند برای بدن موجودات عوارض جانبی کم‌تری داشته باشد. ژلاتین خاصیت ضدباکتری پایین‌تری نسبت به نانو ذرات ژلاتین دارد (P<۰/۰۵). با تایید مطالعات گذشته، افزایش خاصیت ضدباکتری به‌دلیل نانو بودن ژلاتین می‌باشد هم‌چنین MIC و MBC نانوذرات ژلاتین کم‌تر از ژلاتین می‌باشد. کم بودن MIC و MBC نانوذرات ژلاتین به خصوصیات منحصر به‌فرد آن می‌افزاید. هم‌چنین با کوچک‌تر شدن اندازه نانوذرات ژلاتین خاصیت ضدباکتری اضافه شده و خاصیت ضدباکتری و کاربرد احتمالی نانو ذرات ژلاتین به‌عنوان حامل دارو از مزیت‌های آن می‌باشد. هم‌چنین نانوذرات ژلاتین خاصیت ضدباکتری بالاتری نسبت به ژلاتین دارد و این از

خواص نانو بودن آن می‌باشد. هم‌چنین با کوچک‌تر شدن اندازه ذرات نانوژلاتین خاصیت ضدباکتری افزایش می‌یابد و این واقعیت برای نانو ژلاتین علاوه بر کاربرد احتمالی دارو به آن به خاصیت ضدباکتری آن می‌افزاید.

تشکر و قدردانی

از خانم سلیمی،آقای محسنیان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و دارویی کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. **ایمانی، ص.؛ زاغری، ز.؛ رضائی، س . و زند، ع.، ۱۳۹۰** . بررسی اثر نانو ضدباکتریایی نانو ذرات Cro_4 , $CoFe_2$ روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی فسا. شیراز. ۱۸۱ صفحه.

۲. **سلامی، ف.؛ رستمی، خ. و اصفهانی، ز.، ۱۳۹۲.** فعالیت ضدمیکروبی نانو ذره‌های کیتوزان و روش‌های تعیین حداقل غلظت بازدارندگی(MIC). فناوری نانو از تئوری تا کاربرد. تهران. ۴۲ صفحه.

۳. **سعادتمند، م.؛ یزدانشناس، م.؛ رضائی، ز. و یوسفی، ت.، ۱۳۹۰.** خاصیت ضدمیکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان TioR2R و به‌کارگیری آن روی گاز استریل بیمارستانی.انتشارات علوم آزمایشگاهی تهران. ۶۰ صفحه.

٤. **Alizadeh, H.; Salouti, M. and Shapouri, R., ۲۰۱۳.** Intramacrophage antimicrobial effect of silver nanoparticles agaist *Brucella melitensis*16M.Scientialranica Journal. Vol. 3, N. 20, pp: 1035-1038.

٥. **Cho, M.; Gub, Y. and Kima, S., 2006.** Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids. Vol. 4, No. 19, pp: 221-229.

٦. **Darroudi, M.; Mansor, B.; Hakimi, M.; Zamiri, R.; Khorasani zak, A. and Zargar, M., 2013.** Preparation, characterization, and antibacterial activity of silver nanoparticles in aqueous gelatin. International Journal of Minerals, Metallurgy, and Materials. Vol. 4, No. 1, pp: 403-409.

۷. **Guillen, R.; Espinosa, B.; Meza, R.; Espinoza, N.; Sanchcz, L. and Chacaltana, J., 2010.** Antin1icrobial Susceptibility of Brucella melitensis Isolates in Peru. Antimicrobim acienrs and ciemotiieaiy. Vol. 3, No. 12, pp: 1279-1281.

۸. **Lifeng, Qi.; Zirong, Xu.; Xia, J.; Caihong, H. and Xiangfei, Z., 2004.** Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. Carbohydrate Research. Vol. 1, No. 339, pp: 2693-2700.

۹. **Kim, S., 2006.** Bioactive compound from marine process by product a review. Food Research International. Vol. 4, No. 39, pp: 383-393.

۱۰. **Mei, N.; Xuguang, L.; Jinming, D.; Husheng, J.; Liqiao, W. and Bingshe X., 2009.** Antibacterial activity of Chitosan coated Ag loaded nano Sio*R2R* composites. Carbohydrate Polimers. Vol. 4, No. 78, pp: 54-59.

۱۱. **Muhammad, A. and Hee, J., 2014.** Antibacterial and Antiyeast Compounds from Marine-Derived Bacteria. Drug Journal. Vol. 5, No. 12, pp: 2913-2921.

۱۲. **Nester, E.; Anderson, D.; Robert, E.; Pearshall, N. and Nester, M.T., 2003.** Microbiology. A human prospect. Vol. 3, No.14, pp: 518-521.

۱۳. **Qi, L.; Xu, Z.; Jiang, X.; Hu, C. and Zou, X., 2004.** Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. Carbohydrate research. Vol. 1, No. 339, pp: 2693-2700.

۱۴. **Raafat, D.; Bargen, V.; Hass, A. and Sahi, H., 2008,** Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. Applied Environment Microbiology. Vol. 12, No. 74, pp: 3764-3773.

۱۵. **Salem, W.; Leitner, D.; Zingl, F.; Schratter, G.; Prassl, R.; Goessler, W.; Reidl, J. and Schild, S., 2015.** Antibacterial activity of silver and zinc nanoprticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxic *Escherichia coli*. International journal of medical microbiology. Vol. 1, No. 305, pp: 85-95.

۱۶. **Vorgelegt, V., 2006.** Gelatin nanoparticles as delivery system for nucleotide-based drugs. Hotverleg pub. USA. 963 p.