

بررسی خواص ضد باکتریایی نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G5 بر روی باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی، شیگلا دیسانتری و اشرشیاکلی در محیط آبی

شهرام نظری: کارشناس ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران. shahramnazari73@yahoo.com
ایوب رستگار: کارشناس ارشد مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران. rastegar.89@gmail.com
سمانه دهقان: دانشجوی دکتری مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. sdehghan2010@gmail.com
ابراهیم کوهساری: دانشجوی دکتری باکتری شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. ekouhsari1987@gmail.com
پیمان آذغانی: کارشناس ارشد، گروه باکتری شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران. paymanazghani@yahoo.com
* سودابه عزیزاده متبوع: کارشناس بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران (*نویسنده مسئول). soudabehalizadeh@ymail.com
زهره نظری: کارشناس پرستاری، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران. zohreh124@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: دندریمرها زیر مجموعه‌ای از ساختارهای شاخه دار هستند که نظم ساختاری مشخصی دارند. هدف از انجام این تحقیق بررسی کارایی نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G5 در حذف باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی، اشرشیاکلی و شیگلا دیسانتری از محلول آبی می باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ابتدا از غلظت نیم مک فارلند هر سویه باکتری، رقت 10^3 واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی لیتر تهیه شد. سپس غلظت‌های مختلفی (۰/۲۵، ۰/۲۵، ۲/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) از نانو دندریمر در دمای آزمایشگاه (۲۵-۲۳ درجه سانتی گراد) به نمونه آب اضافه شد. به منظور تعیین کارایی نانو دندریمر در حذف باکتری‌ها، در زمان‌های مختلف (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه) نمونه برداری انجام گردید و بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند و پس از آن تعداد کلنی‌ها شمارش شدند.

یافته‌ها: خاصیت ضد باکتریایی نانو دندریمر در محیط آبی با افزایش غلظت نانو دندریمر و زمان تماس، رابطه مستقیم دارد. در غلظت ۲۵ میکرو گرم بر میلی لیتر نانو دندریمر و در زمان تماس ۶۰ دقیقه تمامی انواع باکتری‌های موجود در محلول آبی به جزء شیگلا دیسانتری (۹۸٪ راندمان حذف) به صورت ۱۰۰٪ حذف شدند. در غلظت ۲/۵ میکرو گرم بر میلی لیتر نانو دندریمر و در زمان تماس ۶۰ دقیقه باکتری‌های اشرشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس به صورت ۱۰۰٪ حذف شدند. تمامی غلظت‌های نانو دندریمر در زمان‌های مختلف باعث کاهش تمامی باکتری‌ها شدند.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G5 قادر به حذف باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی، اشرشیاکلی و شیگلا دیسانتری از محلول آبی می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: خاصیت ضدباکتریایی، نانو دندریمر پلی آمیدو آمین-G5، محیط آبی، باکتری‌ها، گندزدایی

مقدمه

کرده است که هرگونه آب به کار گرفته شده برای آشامیدن باید عاری از کلیفرم گرمپای و کلیفرم کل در هر ۱۰۰ میلی لیتر نمونه باشد. فرآیندهای معمول تصفیه آب، که شامل انعقاد، لخته‌سازی، ته نشینی و صاف‌سازی است، بیشتر میکروارگانیسم‌ها را از میان می‌برد اما آب بایستی گندزدایی شود زیرا پس از تصفیه برخی میکروارگانیسم‌ها باقی می‌مانند و یا به آن وارد می‌شوند (۳). در اکثر تصفیه‌خانه‌های برای گندزدایی آب معمولاً از کلر یا مشتقات آن استفاده می‌شود. کلرزی روشی جا افتاده، قابل اطمینان و پیشرفته

امروزه بیشتر کشورهای جهان در تأمین آب آشامیدنی با دشواری‌هایی مواجه هستند که در کشورهای درحال توسعه شدیدتر است (۱). بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization-WHO) در سال ۲۰۰۴، حداقل یک‌ششم جمعیت جهان، که برابر با ۱/۱ میلیارد نفر است، به آب آشامیدنی سالم دسترسی ندارند. اسهال هر ساله ۲/۲ میلیون نفر که اغلب آن‌ها بچه‌های زیر پنج سال هستند را به کام مرگ می‌کشد (۲). سازمان جهانی بهداشت پیشنهاد

نموده است (۱۰). نانو دندریمرها نوعی پلیمر هستند که از یک هسته مرکزی، واحدهای سه بعدی به صورت شاخه درخت و گروه‌های سطحی یا عاملی تشکیل شده‌اند. از ویژگی‌های منحصر به فرد ساختارهای نانو دندریمری می‌توان به گروه‌های فعال انتهایی چند کاره، ساختار منظم و پرشاخه و فضاهای خالی مابین شاخه‌ها اشاره نمود (۱۱). دندریمرها در نسل سوم، ابعادی در حد هورمون انسولین دارند و در پنجمین نسل، می‌توان آن‌ها را با پروتئین انتقال دهنده اکسیژن (هموگلوبین) مقایسه کرد. گروه‌های سطحی یا عاملی که به مولکول‌های نانو دندریمر متصل می‌شوند بسیار متنوع می‌باشند. این گروه‌ها شامل آمین، کربوکسیلات، هیدروکسیل و متیل استر می‌باشد (۱۲، ۱۳). نانوپلیمرهای دندریتیکی می‌توانند گستره‌ی وسیعی از حل‌شونده‌ها در آب را کپسوله نمایند. این حل‌شونده‌ها شامل کاتیون‌ها (از قبیل مس، نقره، طلا و اورانیوم)، آنیون‌ها (از قبیل پرکلرات، نیترات و فسفات) و ترکیبات آلی (از قبیل داروها و آفت‌کش‌ها) می‌باشند. لایه‌های داخلی نانو دندریمر به دلیل خاصیت هیدروفوبیک می‌توانند ترکیبات آلی را جذب نمایند. شاخه‌های خارجی نانو دندریمرهایی که دارای گروه انتهایی هیدروکسیل یا آمین باشند قادرند فلزات سنگین را حذف نمایند. همچنین نانو ذرات نانو دندریمر می‌توانند به باکتری‌ها و ویروس‌ها متصل شوند و آن‌ها را غیرفعال نمایند (۱۴). دو دسته از پرکاربردترین نانو دندریمرها، نانو دندریمرهای پلی آمیدوآمین و پلی پروپیلن ایمن می‌باشد که به صورت تجاری هم وجود دارد (۱۵). نانو دندریمرهای پلی آمیدوآمین دارای گروه انتهایی آمینی می‌باشند که بر روی سطوح سلول باکتریایی جذب شده و از طریق دیوارسلولی نفوذ می‌نمایند. سپس به غشاء سیتوپلاسمی متصل شده و غشاء سیتوپلاسمی را متلاشی می‌کنند (۱۱). نانو دندریمرها به دلیل شباهت داشتن به برخی از پروتئین‌های بدن، سمیت خیلی کمتری را برای سلول‌های یوکاریوتیک دارند (۱۶)؛ بنابراین امکان استفاده از نانو دندریمرها به عنوان گندزدا، می‌تواند مورد پژوهش قرار گیرد.

است. ولی تشکیل تری‌هالومتان‌ها و سلامتی مردم مهم‌ترین نگرانی مهندسان و مردم از این ماده است. همچنین در طی فرآیند گندزدایی واکنش بین کلر و ترکیبات آلی طبیعی منجر به تولید انواع مختلفی از محصولات جانبی گندزدایی از قبیل هالواستیک اسیدها، هالواستونیتریل‌ها، هالوکتون‌ها و نیتروزو دی متیل آمین‌ها می‌شود. وجود محصولات جانبی گندزدایی در آب آشامیدنی، احتمال ابتلا به سرطان را در انسان افزایش می‌دهد. تماس پوستی با محصولات جانبی گندزدایی نیز ممکن است موجب سرطانزایی شود (۴، ۵). دیگر روش‌های گندزدایی جایگزین شامل کلرآمین، ازن و دی اکسید کلر می‌باشند. کلرآمین نسبت به کلر یک گندزدای ضعیف‌تر می‌باشد و منجر به تشکیل محصولات جانبی گندزدایی سمی تر مانند N نیتروزو دی متیل آمین‌ها (N-nitrosodimethylamine-NDMA) می‌شود (۶).

ازن در حضور یون‌های بروماید موجب تشکیل برومات می‌شود. دی اکسید کلر می‌تواند منجر به تشکیل کلریت شود. استفاده از کلرآمین، ازن و دی اکسید کلر پرهزینه‌تر از کلر می‌باشند. ممکن است ازن و دی اکسید کلر نتوانند شبکه توزیع آب را به اندازه کافی در برابر میکروب‌های بیماری‌زا محافظت نمایند (۷). یافتن روش‌های جایگزین ضروریست که بتوانند بدون تولید محصولات جانبی گندزدایی، کارایی بالایی در حذف میکروب‌های بیماری‌زا داشته باشند.

نانوذرات می‌توانند نقش مهمی در تصفیه آب داشته باشند. گزینش یک ماده به سرنوشت و سمیت آن در محیط زیست وابسته است. هنوز، دانش امروزی درباره سرنوشت نانو مواد در محیط زیست و سمیت آن‌ها در مراحل ابتدایی خوداست. پیشرفت در علم نانو شاید بتواند برخی از مشکلات مربوط به کیفیت آب را کاهش دهد (۸). چهار دسته از نانو مواد که در تصفیه آب به کار گرفته شده‌اند شامل نانو دندریمرها، نانو ذرات فلزی (۹)، زئولیت‌ها و نانو مواد کربن‌دار می‌باشند. دندریمرها دامنه گسترده‌ای از ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی دارند که آن‌ها را برای تصفیه آب، در خور ارزش

جدول ۱- ویژگی‌های شیمیایی نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G5

تعداد گروه های آمین داخلی	تعداد گروه های انتهایی آمینی	اندازه (نانو متر)	وزن مولکولی (گرم بر مول)	نسل نانو دندریمر	فرمول مولکولی
۱۲۶	۱۲۸	۵/۷	۲۸۸۲۶	۵	C ₁₂₆₂ H ₂₅₂₈ N ₅₀₆ O ₂₅₂

باکتریایی خریداری شده، در محیط کشت نوترینت برات در شرایط هوازی و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. سپس با لوپ استریل از محیط کشت نوترینت برات مقداری برداشته و بروی محیط‌های کشت اختصاصی هر باکتری، به حالت خطی کشت داده شد. سپس محیط‌ها به حالت وارونه در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شدند (۱۷). تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده ساخت شرکت مرک آلمان بود.

تهیه رقت باکتریایی مطابق با استاندارد نیم مک فارلند و رقت باکتریایی ۱۰^۳ واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی لیتر (CFU/ml): در این پژوهش، استاندارد مک فارلند به عنوان مرجعی برای مطابقت دادن کدورت ناشی از سوسپانسیون باکتری استفاده شد (۱۸). مواد مورد استفاده برای تهیه استاندارد نیم مک فارلند شامل: باریم کلرید (BaCl₂·2H₂O) دهیدراته و اسید سولفوریک (H₂SO₄) بوده که از شرکت مرک تهیه شدند. با مخلوط نمودن ۰/۰۵ میلی لیتر باریم کلرید دهیدراته (BaCl₂·2H₂O) ۱/۱۷۵٪ با ۹/۹۵ میلی لیتر اسید سولفوریک (H₂SO₄) ۱٪، استاندارد نیم مک فارلند تهیه گردید. با مخلوط این دو ترکیب رسوب سولفات باریم که سبب ایجاد کدورت در محلول می‌شود، به وجود آمد. از آنجایی که تعداد باکتری تلقیح شده یکی از مهم‌ترین متغیرهایی است که بر نتیجه این پژوهش اثر می‌گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد. بدین منظور برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، از کشت تازه و جوان باکتری با استفاده از سوپ استریل چند کلنی به لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل منتقل شده و پس از هم زدن

این مطالعه با هدف تعیین کارایی نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین- G5 (NPAMAM- G5) و همچنین شناسایی و ارائه ترکیب شیمیایی نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین- G5 به عنوان عامل ضد باکتریایی در حذف باکتری های اشرشیا کلی، باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی و شیگلا دیسانتری از محیط آبی انجام شد.

روش کار

مشخصات ماده ضد باکتریایی- NPAMAM-G5

G5: مطالعه به صورت تجربی و در مقیاس آزمایشگاهی انجام شد. پژوهش کنونی در شهریور ماه و مهرماه ۱۳۹۴ در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام گردید. ماده ضدباکتریایی مورد استفاده، نانو دندریمر PAMAM-G5 می‌باشد که از دانشگاه صنعتی امیر کبیر ایران خریداری گردید. ویژگی‌های شیمیایی و ساختار شیمیایی نانو دندریمر PAMAM-G5 به ترتیب در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است. شکل ۲ نیز مشخصات نانو دندریمر PAMAM-G5 که از طریق دستگاه طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (Fourier Transform Infrared Spectroscopy-FTIR) اندازه گرفته شده است را نشان می‌دهد (مدل Tensor، شرکت بروکر آلمان). غلظت محلول مادر نانو دندریمر PAMAM-G5، یک درصد بود که از آب دو بار تقطیر به عنوان حلال این ماده استفاده شده بود.

آماده سازی سویه‌های باکتریایی: سویه‌های باکتری استفاده شده در این مطالعه شامل باکتری های گرم منفی سالمونلا تیفی، شیگلا دیسانتری، اشرشیا کلی و گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس می‌باشد که از مرکز پژوهش‌های صنعتی ایران خریداری گردید. تمامی سوش‌های

¹ Colony Forming Unit

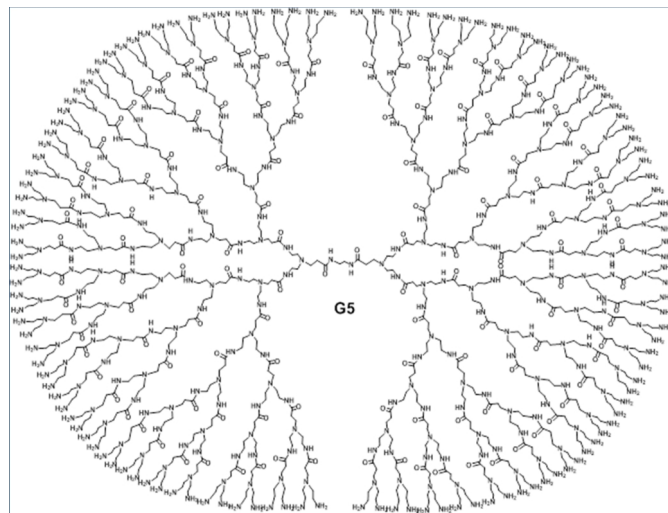
۴۰ میلی لیتر (چهار غلظت نانو دندریمر که هر غلظت به ۱۰ میلی لیتر آب با غلظت باکتریایی 10^3 CFU/ml انتقال یافت). حجمی برابر با ۰/۲۷ میکرولیتر از غلظت معادل استاندارد نیم مک فارلند برداشته و توسط آب مقطر استریل شده به حجم ۴۰ میلی لیتر می‌رسانیم و رقت باکتریایی برابر 10^3 CFU/ml به دست می‌آید. این عملیات برای هر ۵ باکتری مورد مطالعه به طور جداگانه انجام گردید.

آزمایش های حذف باکتری‌ها: غلظت مورد نظر از نانو دندریمر (۰/۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر) به وسیله آب مقطر استریل شده به روش رقیق سازی سریالی تهیه

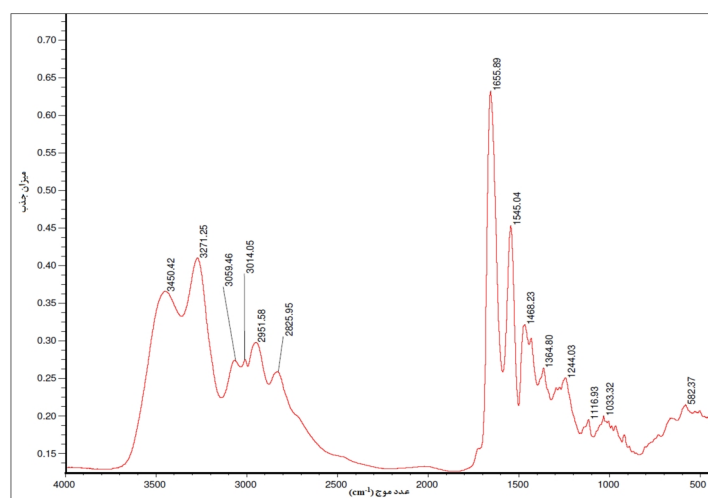
محلول، کدورت حاصله در مقابل چراغ مطالعه با کدورت محلول نیم مک فارلند که توسط ورتکس هم زده می‌شود، مقایسه گردید. این عملیات برای همه باکتری‌های مورد مطالعه به طور جداگانه انجام گردید. با توجه به اینکه غلظت باکتریایی نیم مک فارلند برابر $10^8 \times 1/5$ می‌باشد، از رابطه ۱ برای به دست آوردن رقت باکتریایی 10^3 CFU/ml استفاده گردید.

$$C_1V_1 = C_2V_2(1)$$

C_1 : غلظت باکتریایی معادل استاندارد نیم مک فارلند، V_1 : حجم مورد نیاز برای تهیه غلظت باکتریایی برابر 10^3 CFU/ml، C_2 : غلظت باکتریایی برابر 10^3 CFU/ml، V_2 : حجمی برابر



شکل ۱- ساختار شیمیایی نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G5



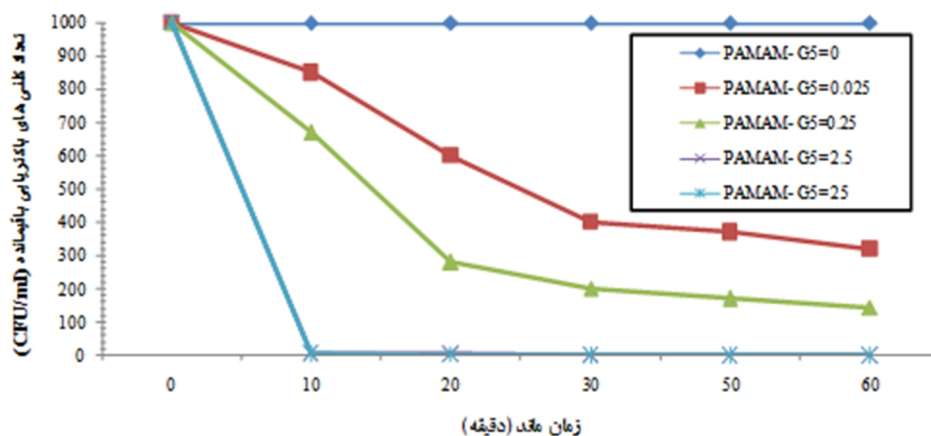
شکل ۲- طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G5

حذف باکتری‌های گرم منفی *اشرشیا کلی*، *سالمونلا تیفی*، *شیگلا دیسانتری* و گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* در اشکال ۳ تا ۶ نشان داده شده است. نانو دندریمر PAMAM-G5 در برابر هر دو گروه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت موثر بود. نتایج نشان می‌دهد که خاصیت ضد باکتریایی نانو دندریمر در محیط آبی با افزایش غلظت نانو دندریمر و زمان تماس، رابطه مستقیم دارد. در زمان صفر دقیقه، نانو دندریمر PAMAM-G5 تاثیری بر باکتری‌های گرم منفی *اشرشیا کلی*، *سالمونلا تیفی*، *شیگلا دیسانتری* و گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* نداشت ولی در زمان ۱۰ دقیقه، نانو دندریمر PAMAM-G5 باعث کاهش چشمگیری از باکتری‌ها گردید. در زمان تماس ۶۰ دقیقه و غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانو دندریمر به جزء *شیگلا دیسانتری* (میزان حذف آن در این غلظت ۹۸٪ بود) تمامی باکتری‌های مورد مطالعه به صورت ۱۰۰ درصد حذف شدند. همچنین در غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و زمان تماس ۶۰ دقیقه باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *سالمونلا تیفی* ۱۰۰ درصد و باکتری *شیگلا دیسانتری* به صورت ۹۷ درصد حذف گردید. در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و در زمان تماس ۳۰ دقیقه باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *سالمونلا تیفی* ۱۰۰ درصد و باکتری *شیگلا دیسانتری* ۹۷ درصد حذف گردید. تمامی

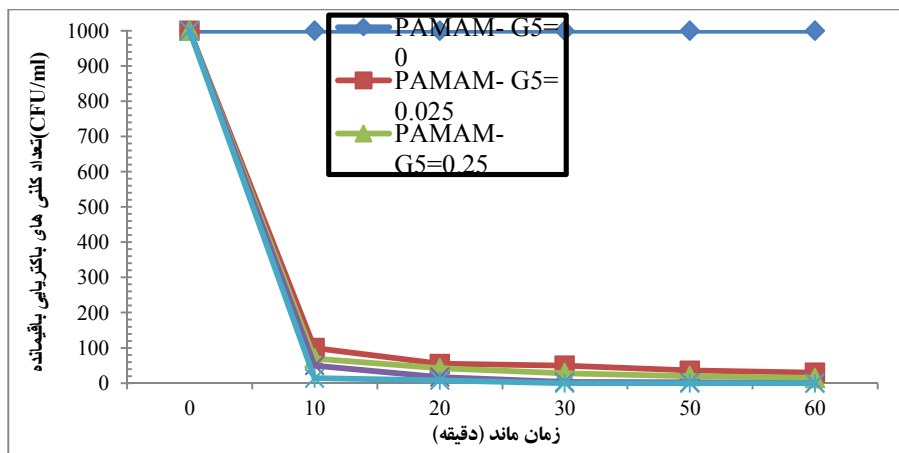
شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از نانو دندریمر PAMAM-G5 در غلظت‌های مختلف و در شرایط کاملاً استریل و در دمای آزمایشگاه (۲۵-۲۳ درجه سانتی گراد) به نمونه آب (حاوی باکتری) اضافه گردید. به منظور تعیین کارایی نانو دندریمر در حذف باکتری‌ها، در زمان‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه با استفاده از میکرو پپت صد لاند نمونه برداشت گردید و بر روی محیط‌های کشت اختصاصی هر باکتری کشت داده شد. تمامی محیط‌های مورد استفاده ساخت شرکت مرک آلمان بود. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند و پس از آن تعداد کلنی‌های باقیمانده از طریق کلنی‌کانتر شمارش شدند. تعداد کل نمونه‌ها با توجه به احتساب چهار غلظت نانو دندریمر، چهار نوع باکتری، شش دوره زمان ماند و دوبار تکرار برابر ۱۹۲ عدد به دست آمد. تمامی آزمایش‌ها بر اساس دستورالعمل‌های موجود در کتاب آزمایش‌های استاندارد آب و فاضلاب (۱۹) و دستورالعمل‌های موسسه استاندارد و آزمایشگاه پزشکی (Clinical Laboratory and Standard Institute-CLSI) انجام گردید (۱۷). از نرم افزار Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) برای رسم نمودارها استفاده گردید.

یافته‌ها

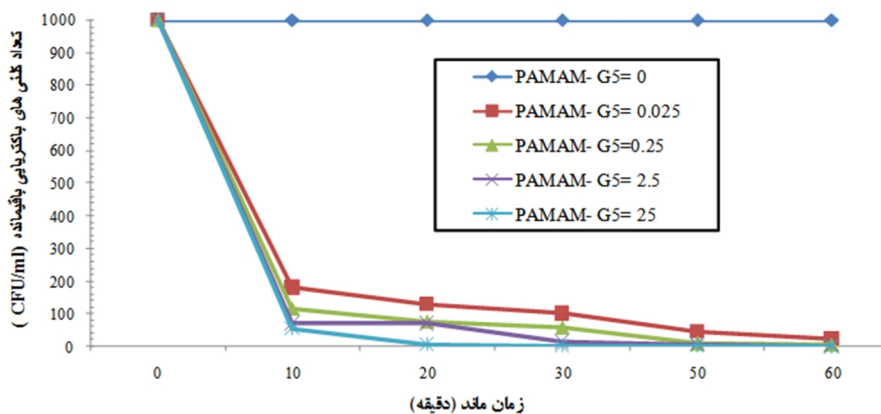
کارایی نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G5 در



شکل ۳- تاثیر نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G5 بر تغییرات جمعیت باکترهای *باسیلوس سوبتیلیس* در آب



شکل ۴- تاثیر نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G5- بر تغییرات جمعیت باکترهای اشرشیاکلی در آب



شکل ۵- تاثیر نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G5- بر تغییرات جمعیت باکترهای سالمونلا تیفی در آب

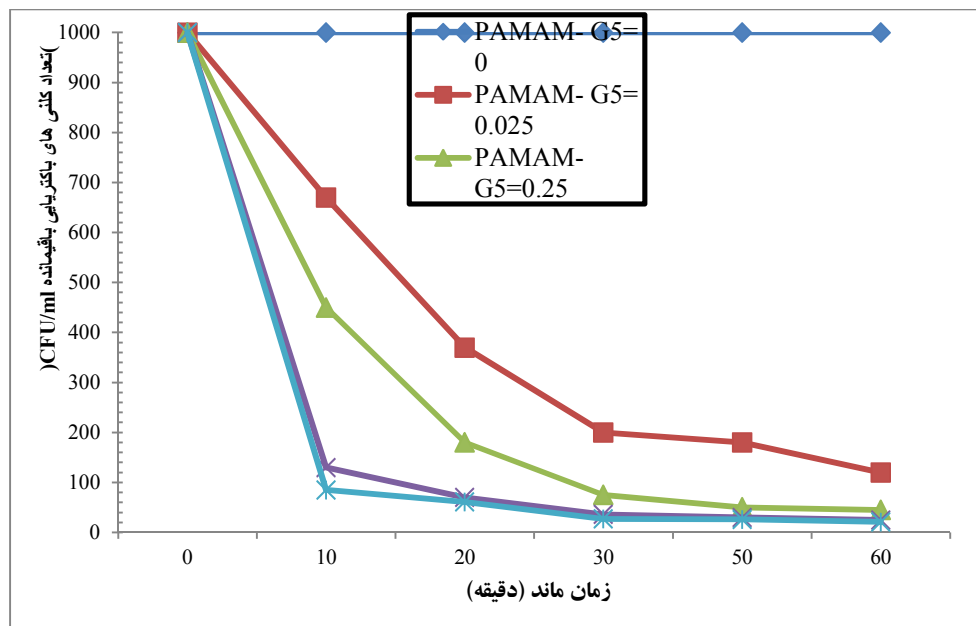
مقدار حذف ثابت باقی مانده است. اشکال ۴ تا ۶ نشان می‌دهد که باکترهای گرم منفی اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی و شیگلا دیسانتری تا زمان تماس ۱۰ دقیقه به صورت معنی داری کاهش پیدا کردند و از زمان ده تا ۶۰ دقیقه نرخ کاهش تقریباً ثابت می‌باشد.

آنالیز FTIR: طیف FTIR دندریمر NPAMAM-G5 در عدد موج‌های ۴۰۰ تا cm^{-1} در شکل ۲ نشان داده شده است. نوسانات پیک های $3450/42$ و $3271/25$ cm^{-1} به ترتیب مربوط به N-H گروه‌های آمین و آمید اولیه می‌باشد.

پیک‌های $2825/95$ و $2951/58$ cm^{-1} به کشش C-H نسبت داده می‌شود. پیک های $1364/80$ و $1033/32$ cm^{-1} به نوسانات کششی گروه های C-

غلظت‌های نانو دندریمر در زمان‌های مختلف باعث کاهش باکتری‌ها شدند.

همان طور که از اشکال ۳ تا ۶ مشخص است، تاثیر نانو دندریمر PAMAM-G5 در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی و سالمونلا تیفی بیشتر از باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و شیگلا دیسانتری بود. همان طور که شکل ۳ نشان می‌دهد افزایش حذف باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس تا زمان ۳۰ دقیقه بسیار بالا بوده (به جزء در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانو دندریمر) و از زمان ۳۰ دقیقه به بعد سرعت حذف این باکتری‌ها کمتر شده و تقریباً ثابت باقی مانده است و در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تا زمان تماس ده دقیقه بیشترین حذف مشاهده می‌شود و از زمان ۱۰ تا ۶۰ دقیقه تقریباً



شکل ۶- تاثیر نانو دندریمر پلی آمیدو آمین -G5 بر تغییرات جمعیت باکترهای شیگلا دیسانتری در آب

ضدباکتریایی از مقاومت کمتری برخوردار بوده و در غلظت‌های کمتری از بین می‌روند. در مطالعه‌ای که در مورد اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G4 به روش دیسک انتشاری انجام داده شده بود، به این نتیجه رسیدند که نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G4 بر روی باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر ضد باکتریایی دارد ولی بر روی باکتری *آنتروباکتر کلوآکه* هیچ گونه اثر ضد باکتریایی ندارد (۱۱). در مطالعه دیگر که بر روی اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G4 انجام گردید، مشخص شد این ماده هیچ گونه خاصیت ضد باکتریایی بر روی باکتری *پسودوموناس آئروژینزا* ندارد (۲۴).

همچنین در این مطالعات نشان داده شد، اثر ضدباکتریایی نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G4 بر روی بیشتر باکتری‌ها در غلظت‌های بالاتر اتفاق می‌افتد (۱۱، ۲۴). مطالعه حاضر نشان داد، نانو دندریمر PAMAM-G5 تاثیر ضد باکتریایی بسیار مناسبی داشته و همه باکتری‌های مورد مطالعه را با راندمان بالایی حذف می‌کند. تاثیر ضدباکتریایی بالاتر نانو دندریمر نسل پنجم نسبت به نسل‌های پایین تر را می‌توان به تعداد بیشتر گروه انتهایی آمینی آن‌ها نسبت داد. هر چه قدر تعداد گروه

C-O و N مربوط است. پیک‌های ۱۶۵۵/۸۹ و ۱۵۴۵/۰۴^۱ توصیف کننده کشش C=O و اتصال بین N-H گروه‌های آمیدی می‌باشد (۲۰، ۲۱).

بحث و نتیجه‌گیری

در دنیا حدود ۸۰ درصد بیماری‌های واگیر از طریق آب آلوده منتقل می‌شود. در منابع آب، آلودگی به باکتری‌های کلیفرم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و گونه‌های بیماری‌زای آن موجب مشکلات بهداشتی متعددی می‌شود (۲۲). بر اساس اعلام سازمان بهداشت جهانی تعداد کلیفرم‌ها و باکتری‌های گوارشی شمارش شده در هر ۱۰۰ میلی لیتر آب نوشیدنی باید صفر باشد (۲۳). در پژوهش حاضر اثر نانو دندریمر PAMAM-G5 بر روی باکتری‌های گرم منفی *سالمونلا تیفی*، *شیگلا دیسانتری*، *اشرشیا کلی* و گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* در محلول آبی مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه نشان داد نانو دندریمر PAMAM-G5 خاصیت ضد باکتریایی بسیار مناسبی در حذف باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارد. همچنین در مطالعه حاضر مشخص گردید که باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *باسیلوس سوبتیلیس* نسبت به باکتری‌های *سالمونلا تیفی* و *شیگلا دیسانتری* در مقابل عامل

میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد (۲۸). در یک بررسی که در مورد خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات کیتوزان بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام داده شده بود به این نتیجه رسیدند که حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی برای *اشرشیاکلی* برابر ۱۱۷ و ۱۸۷ میکروگرم بر میلی لیتر و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر ۲۳۴ و ۲۸۱ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد (۲۹). مطالعه انجام شده در مورد اثر ضدباکتریایی نانو دندریمر پلی پروپیلن ایمین نسل دوم نشان داد که غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر از این ماده تأثیری بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *پروتئوس میرابیلیس* نداشت و با افزایش غلظت تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، باکتری‌هایی از جمله *اشرشیاکلی*، *پروتئوس میرابیلیس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را به طور کامل حذف کرد (۱۲). نتایج مطالعه حاضر با این مطالعات مطابقت دارد. مطالعه حاضر نشان داد نانو دندریمر PAMAM-G5 در غلظت‌های پایین تر نیز خاصیت باکتری‌کشی مناسبی دارد. احتمالاً این می‌تواند به دلیل خاصیت درخت‌سانی، ساختار منظم و پرشاخه، فضاهای خالی ما بین شاخه‌ها، تعداد زیاد گروه‌های عاملی انتهایی و ماکرو مولکول بودن نانو دندریمر PAMAM-G5 باشد. این خصوصیات سبب افزایش سطح ویژه نانو دندریمرها می‌شود و با افزایش هر نسل سطح ویژه آن افزایش پیدا می‌کند. بالا بودن سطح ویژه به نانو دندریمرها اجازه فعالیت در سطح بیشتری را می‌دهد و در نتیجه باکتری‌های موجود در محلول را در شاخه‌های میانی و انتهایی خود به دام انداخته و مانع از فعالیت و تولید مثل باکتری‌ها می‌شود (۱۱). در مطالعه حاضر با افزایش زمان تماس کارایی نانو دندریمر در حذف باکتری‌ها به طور چشمگیر افزایش یافت (اشکال ۳ تا ۶). مطالعه انجام شده بر روی نانو دندریمر پلی پروپیلن ایمین نسل دوم در حذف برخی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نشان داد، با افزایش زمان تماس راندمان حذف باکتری‌ها افزایش می‌یابد (۱۲). در مطالعه ای که در مورد اثر نانوقره بر حذف

انتهایی آمینی بیشتر باشد، به همان نسبت خاصیت باکتری‌کشی نانو دندریمر افزایش خواهد یافت. تعداد گروه‌های انتهایی آمینی در نانو دندریمر پلی آمید و آمین نسل چهارم برابر ۶۴ عدد در حالی که این تعداد در نانو دندریمر پلی آمید و آمین نسل پنجم برابر ۱۲۸ عدد (جدول ۱) می‌باشد (۲۵). این گروه‌های عاملی بر روی سطوح سلول باکتریایی جذب شده و از طریق دیوارسلولی نفوذ می‌نمایند. سپس به غشاء سیتوپلاسمی متصل شده و غشاء سیتوپلاسمی را متلاشی می‌کنند. در این هنگام الکترولیت‌هایی از قبیل یون‌های پتاسیم و فسفات و مواد هسته‌ای از قبیل DNA و RNA از سلول آزاد می‌شوند که در نتیجه به مرگ سلول باکتریایی میانجامد. پس می‌توان گفت خاصیت ضد میکروبی نانو دندریمرها به واسطه اختلال در غشاء داخلی و خارجی باکتری‌ها که از طریق گروه‌های انتهایی آمینی صورت می‌گیرد، می‌باشد (۱۱). همان طور که در اشکال ۳ تا ۶ مشاهده می‌کنید، با افزایش غلظت نانو دندریمر و زمان تماس، تأثیر ضد باکتریایی نانو دندریمر افزایش یافته و باعث کاهش چشمگیری از باکتری‌ها گردیده است. در یک مطالعه‌ای که در مورد خاصیت ضد باکتریایی نانو دندریمرهای پلی‌آمید و آمین-G3 بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شده بود مشخص گردید، با افزایش غلظت نانو دندریمر قطر هاله عدم رشد این باکتری‌ها افزایش می‌یابد (۲۶). در مطالعه‌ای دیگر که در مورد تأثیر نانوذرات ZnO، CuO و TiO₂ در حذف باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت از فاضلاب شهری انجام شده بود به این نتیجه رسیدند که که با افزایش غلظت نانوذرات درصد حذف باکتری‌ها افزایش می‌یابد (۲۷). خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم پوشیده‌شده با نقره (TiO₂:Ag) بر علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* مورد بررسی قرار داده شد. حداقل غلظت کشندگی و بازدارندگی برای *اشرشیاکلی* برابر ۶/۴ و ۳/۲ میکروگرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی و بازدارندگی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر ۲۵/۶ و ۱/۶

مطالعات بیشتر و وسیع تر است.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخش از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اردبیل در سال ۱۳۹۴ با شماره مصوب ۴۹۳۴ است که بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل در تأمین هزینه‌های آن تشکر و قدرانی می‌گردد. همچنین از آقای آرغانی کارشناس آزمایشگاه میکروب شناسی پزشکی به جهت همکاری کامل در انجام این پروژه کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Rezaee A, Kashi G, Jonidi Jafari A, Khataee AR. Investigation of E. coli Removal from Polluted Water Using Electrolysis Method. *IJHE* 2011;4(2):201-12.
2. Miranzadeh M, Rabbani D, Naseri S, Nabizadeh R, Mousavi S, Ghadami F. Coliform bacteria removal from contaminated water using nanosilver. *Feyz* 2012;16(1):31-5.
3. Samandi MT, Nasser S, Mesdaghinia A, Alizadefard MR. A comparative study on THMs removal efficiencies from drinking water through nanofiltration and air stripping packed-column. *Water & Wastewater* 2006 (57):14-21.
4. Karagas MR, Villanueva CM, Nieuwenhuijsen M, Weisel CP, Cantor KP, Kogevinas M. Disinfection byproducts in drinking water and skin cancer? A hypothesis. *Cancer Causes & Control* 2008;19(5):547-8.
5. Richardson SD, Plewa MJ, Wagner ED, Schoeny R, DeMarini DM. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutation Research* 2007;636(1):178-242.
6. Mitch WA, Sedlak DL. Formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) from dimethylamine during chlorination. *Environ. Sci. Technol* 2002;36(4):588-95.
7. Chowdhury S, Rodriguez MJ, Sadiq R. Disinfection byproducts in Canadian provinces: associated cancer risks and medical expenses. *Journal of hazardous materials* 2011;187(1):574-84.
8. Dhermendra T, Prasenjit S. Application of Nanoparticles in Waste Water Treatment. *World Appl. Sci J* 2008;3(3): 417-33.
9. Nazari Sh, Yari AR, Mahmodian MH, Tanhaye

باکتری‌های کلیفرم از آب آلوده انجام شده است، نتایج نشان داد افزایش زمان تماس با نانونقره، باعث حذف بیشتر کلیفرم‌ها می‌شود؛ اما رابطه معنی داری بین مقدار نانونقره و حذف کلیفرم‌ها دیده نشد ($p=0/6$) (۳۰). در مطالعه‌ای که از فرآیند نانو ذرات آهن صفر ظرفیتی برای حذف باکتری اشرشیاکلی استفاده شده بود، یافتند که با افزایش زمان تماس راندمان غیرفعال سازی اشرشیاکلی افزایش می‌یابد (۳۱). این مطالعه نشان داد با افزایش زمان تماس به ۶۰ دقیقه همه باکتری‌ها به جز باکتری شیگلا دیسانتری (میزان حذف آن در این زمان ۹۸٪ بود) به صورت ۱۰۰٪ حذف شدند. افزایش راندمان حذف باکتری‌ها با افزایش زمان تماس نشان دهنده مانده‌گاری بالای این ماده در محلول‌های آبی می‌باشد. بر خلاف ازن، UV و دی اکسید کلر که زمان ماند خیلی پایینی در محلول‌های آبی دارند و بعد از چند دقیقه باقیمانده خیلی کمتری از خود به جا می‌گذارند (۷) نانو دندریمر PAMAM-G5 می‌تواند زمان ماند خیلی بالایی در محلول‌های آبی داشته باشند. با توجه به اینکه آلودگی ثانویه در هر لحظه می‌تواند در شبکه‌های آب آشامیدنی اتفاق بیفتد، بنابراین استفاده از این ماده به عنوان گندزدا می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. دندریمرها به دلیل شباهتی که با برخی از پروتئین‌های بدن دارند، حداقل سمیت را برای سلول‌های یوکاریوتیک دارند (۳۲) و در برخی مطالعات نیز به سمیت پایین این ماده بر روی سلول‌های یوکاریوتیک اشاره شده است (۱۶، ۳۲، ۳۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G5 با زمان ماند و غلظت کم نیز راندمان خیلی بالایی در حذف باکتری‌های باکتری‌های گرم منفی *سالمونلا تیفی*، *شیگلا دیسانتری*، *اشرشیا کلی* و *گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس* از محلول‌های آبی دارد. با توجه به اینکه نانو دندریمرهای پلی‌آمید سمیت خیلی پایین تری بر روی سلول‌های انسانی و حیوانی دارد، از این ماده می‌توان به عنوان گندزدا در صنعت آب و موارد مشابه استفاده کرد. با این حال استفاده از نانو دندریمر برای گندزدایی آب آشامیدنی نیازمند

- Ecological Engineering 2009;35(8):1152-7.
23. Jamieson R, Gordon, R, Joy D, Lee H. Assessing microbial pollution of rural surface waters: A review of current watershed scale modeling approaches. *Agricultural Water Management* 2004;70(1):1-17.
24. Izanloo H TH, Khazae M, Nazari Sh, Mjidi Gh, Vaziri Rad V and et al. The antimicrobial effects of Polypropylenimine-G2 and Polyamidoamine-G4 Dendrimers on *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*, in vitro experiment. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 2014;21(5):925-33. (Persian).
25. Boas U, Christensen JB, Heegaard PM. Dendrimers: design, synthesis and chemical properties. *J. Mater. Chem* 2006;16(38):3785-98.
26. Charles S, Vasanthan N, Kwon D, Sekosan G, Ghosh S. Surface modification of poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimer as antimicrobial agents. *Tetrahedron letters* 2012;53(49):6670-5.
27. Malakootian M, Toolabi A. Determining and comparing the effect of nanoparticle CuO, TiO₂ and ZnO in removing gram positive and negative bacteria from wastewater. *Tolooe BehdashtJ* 2010;9(2):1-11. (Persian)
28. Kedziora A, Streck W, Kepinski L, Bugla-Ploskonska G, Doroszkiewicz W. Synthesis and antibacterial activity of novel titanium dioxide doped with silver. *J Sol-Gel Sci Technol* 2012;62(1):79-86.
29. Du W-L, Niu S-S, Xu Y-L, Xu Z-R, Fan C-L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydr Polym* 2009;75(3):385-9.
30. Miranzadeh MB, Rabbani D, Naseri S, Nabizadeh R, Mousavi SGA, Ghadami F. 29. Coliform bacteria removal from contaminated water using nanosilver. *Feyz* 2012; 16(1): 16-23. (Persian)
31. Zarei R, Mosafari M, Soroush Barhagi M, Khataee A, Asghari Jafarabadi M. E. coli Inactivation Efficiency of Zero-Valent Iron Nanoparticles Stabilized by Carboxymethyl Cellulose. *J Health* 2014;5(3):214-23.
32. Heiden TCK, Dengler E, Kao WJ, Heideman W, Peterson RE. Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish. *Toxicology and applied pharmacology* 2007;225(1):70-9 (Persian).
33. Gholami M, Nazari Sh, Farzadkia M, Mohseni SM, Alizadeh Matboo S, Akbari Dourbash F, et al. Nano polyamidoamine-G7 dendrimer synthesis and assessment the antibacterial effect in vitro. *TUMS* 2016;74(1):25-35. (Persian)
- Reshvanloo M, Alizad Matboo S, Majidi G and et al. Application of H₂O₂ and H₂O₂/Fe⁰ in removal of Acid Red 18 dye from aqueous solutions. *Arch Hyg Sci* 2013;2(3):114-20. (Persian).
10. Abkenar SS, Malek RMA. Preparation, characterization, and antimicrobial property of cotton cellulose fabric grafted with poly (propylene imine) dendrimer. *Cellulose* 2012;19(5):1701-14.
11. Izanloo H, Ahmadi Jebelli M, Nazari Sh, Safavi N, Tashauoei HR and et al. Studying the antibacterial effect of Polyamidoamine-G4 Dendrimer on some of the gram-negative and gram-positive bacteria. *A.M.U.J* 2014;17(90):1-10. (Persian).
12. Izanloo H, Nazari Sh, Ahmadi Jebelli M, Alizadeh Matboo S, Hamid Reza Tashauoei, Vakili B and et al. Studying the Polypropylenimine-G2 (PPI-G2) Dendrimer Performance in Removal of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* from Aqueous Solution. *A.M.U.J* 2015;18(99):8-16. (Persian).
13. Hermanson GT. *Bioconjugate techniques*: Third ed: Elsevier; 2013. p. 351-86.
14. Diallo MS. *Water treatment by dendrimer enhanced filtration*. Google Patents; 2008.
15. Abkenar SS, Malek RMA. Preparation, characterization, and antimicrobial property of cotton cellulose fabric grafted with poly (propylene imine) dendrimer. *Cellulose*. 2012; 19(5): 1701-14.
16. Felczak A, Wrońska N, Janaszewska A, Klajnert B, Bryszewska M, Appelhans D, et al. Antimicrobial activity of poly (propylene imine) dendrimers. *NewJ.Chem* 2012;36(11):2215-22.
17. Wayne P. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) performance standards for antimicrobial disk diffusion susceptibility tests* 19th ed. approved standard 19th ed. approved standard. CLSI document M100-S19; 2009.
18. Zapata A, Ramirez-Arcos S. A Comparative Study of McFarland Turbidity Standards and the Densimat Photometer to Determine Bacterial Cell Density. *Curr Microbiol* 2015;70(6):907-9.
19. Federation WE, Association APH. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA. 2005.
20. Divsar F, Ju H. Electrochemiluminescence detection of near single DNA molecules by using quantum dots-dendrimer nanocomposites for signal amplification. *Chemical Communications* 2011;47(35):9879-81.
21. Priyam A, Blumling DE, Knappenberger Jr KL. Synthesis, characterization, and self-organization of dendrimer-encapsulated HgTe quantum dots. *Langmuir* 2010;26(13):10636-44
22. Nemade PD, Kadam AM, Shankar HS. Removal of iron, arsenic and coliform bacteria from water by novel constructed soil filter system.

The survey of the nano polyamidoamine –G5 (NPAMAM-G5) dendrimer antibacterial properties on *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* and *Escherichia coli* from aqueous solution

Shahram Nazari, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Ayoob Rastegar, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran.

Samaneh Dehghan, PhD Student of Environmental Health Engineering, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Ebrahim Kouhsari, PhD Student of Bacteriology, Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Peyman Azghani, MSc, Department of Bacteriology, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

***Soudabeh Alizadeh Matboo**, School of Public Health, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran (* Corresponding author). Soudabehalizadeh@ymail.com

Zohreh Nazari, BSc in Nursing, Islamic Azad University, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

Abstract

Background: Dendrimers are a subset of branched structures that have certain structural order. The aim of this study was to investigate the performance of Nano Polyamidoamine–G5 (NPAMAM-G5) dendrimers in removal of *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* and *Bacillus subtilis* from aqueous solution.

Methods: In this experimental study, initially dilution of 10^3 CFU/ml were prepared from each strain of bacteria. Then different concentrations of dendrimers (0.025, 0.25, 2.5 and 25 $\mu\text{g/ml}$) in the ambient temperature ($23\text{--}25^\circ\text{C}$) was added to water. In order to determine the efficiency of dendrimers in removal of bacteria, samples were taken at different times (0, 10, 20, 30, 50 and 60 min) and were cultured on nutrient agar medium. Samples were incubated for 24 hours at 37°C and then number of colonies were counted.

Results: Antibacterial properties of dendrimers increased in aqueous solution by increasing the dendrimer concentration and contact time. At a concentration of 25 $\mu\text{g/ml}$ and 60 minutes all kinds of bacteria except *Shigella dysenteriae* (98% removal efficiency) showed 100% removal. |At concentration of 2.5 $\mu\text{g/ml}$ at 60 minutes of bacteria, 100% of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, were removed. All concentrations of dendrimer at different times showed reduced bacteria.

Conclusion: Results of this study indicated that NPAMAM–G5 dendrimer is able to remove *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* and *Bacillus subtilis* in aqueous solution.

Keywords: Antibacterial properties, Polypropylenimine-G5 dendrimer, Aqueous solution, Bacteria, Disinfection