



Original Paper

## Antibacterial and Hemolytic Effect of Nanoparticles Zinc / Ferrite / Cellulose Bioconjugated with Vancomycin Antibiotics

Mino Akbari<sup>1</sup> , Ali Hossein Rezayan (Ph.D)<sup>\*2</sup> , Hossein Rastegar (Ph.D)<sup>3</sup>, Mahmoud Alebouyeh (Ph.D)<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Ph.D Candidate in Nanobiotechnology, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran. <sup>2</sup> Associate Professor, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran. <sup>3</sup> Professor, Cosmetic Products Research Center, Iran Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran. <sup>4</sup> Associate Professor, Iran Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.

### Abstract

**Background and Objective:** Binding of antibiotics to nanoparticles increases the antibacterial potential of nanoparticles and antibiotics. This study was performed to determine the antibacterial and hemolytic effect of zinc / ferrite / cellulose nanocomposite (ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> @ Cell) (single nanoparticle), zinc / ferrite / cellulose nanocomposite was aminated with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) with the name of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES (Coated nanocomposite) and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van nanocomposite (coated nanocomposite bound to vancomycin) against gram-negative bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) and gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

**Methods:** In this descriptive study, antibacterial-activity was evaluated by broth macro dilution method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MBC) were determined for *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The hemolytic activity of nanoparticles was investigated by colorimetric method.

**Results:** Nanoparticles did not have hemolytic activity. ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell and ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van did not have a significant antibacterial effect against gram-positive and gram-negative bacteria, and vancomycin binding resulted in antibacterial-activity. ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van inhibited the growth of Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The growth of *E. coli* was reduced to 85% at a concentration of 0.4 mg/ml and a concentration of 0.1 mg nanoparticles completely prevented the growth of *P. aeruginosa*. The growth of gram-positive *S. aureus* bacteria at a concentration of 0.3 mg/ml nanoparticles was completely stopped.

**Conclusion:** Vancomycin-modified nanocomposite has antibacterial-activity against both gram-positive and gram-negative bacteria and has the potential to overcome the antibiotic resistance of bacteria.

**Keywords:** Nanoparticles, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van

\*Corresponding Author: Ali Hossein Rezayan (Ph.D), E-mail: ahrezayan@ut.ac.ir

Received 20 Jan 2021

Revised 26 Jun 2021

Accepted 15 Aug 2021

Published online 12 Mar 2022

Cite this article as: Akbari M, Rezayan AH, Rastegar H, Alebouyeh M. [Antibacterial and Hemolytic Effect of Nanoparticles Zinc / Ferrite / Cellulose Bioconjugated with Vancomycin Antibiotics]. J Gorgan Univ Med Sci. 2022; 23(4): 81-88. [Article in Persian]



تحقیقی

## فعالیت ضدباکتریایی و همولیتیک نانوذرات سلولز / فریت / روی اصلاح شده با آنتی بیوتیک ونکومايسين

مینو اکبری<sup>۱</sup>، دکتر علی حسین رضایان\*<sup>۲</sup>، دکتر حسین رستگار<sup>۳</sup>، دکتر محمود آل بویه<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران. <sup>۲</sup> دانشیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران. <sup>۳</sup> استاد، مرکز تحقیقات محصولات آرایشی و بهداشتی، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران. <sup>۴</sup> دانشیار، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.

### چکیده

زمینه و هدف: اتصال آنتی بیوتیک‌ها به نانوذرات باعث افزایش پتانسیل ضد باکتریایی نانوذرات و آنتی بیوتیک‌ها می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین اثر ضدباکتریایی و همولیتیک نانوکامپوزیت روی/فریت/سلولز ( $ZnFe_2O_4@Cell$ ) (نانوذره تنها)، نانوکامپوزیت روی/فریت/سلولز آمین‌دار شده با (triethoxysilane (3-Aminopropyl) APTES) با نام  $ZnFe_2O_4@Cell@APTES$  (نانوذره پوشش‌دار شده) و نانوکامپوزیت  $ZnFe_2O_4@Cell@APTES@Van$  (نانوذره پوشش‌دار شده و اتصال یافته به ونکومايسين) علیه باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کلی (*E. coli*) و سودوموناس آئروژینوزا (*P. aeruginosa*) و باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (*S. aureus*) انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی فعالیت ضدباکتریایی با روش ماکرودیولش برآش بررسی شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (*MIC*) و حداقل غلظت کشندگی (*MBC*) برای باکتری‌های *E. coli*، *S. aureus* و *P. aeruginosa* تعیین شد. فعالیت همولیتیک نانوذرات با روش رنگ‌سنجی بررسی گردید.

یافته‌ها: نانوذرات فعالیت همولیتیک نداشتند.  $ZnFe_2O_4@Cell$  و  $ZnFe_2O_4@Cell@APTES@Van$  اثر ضدباکتریایی قابل توجهی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی نداشتند و اتصال ونکومايسين منجر به فعالیت ضدباکتریایی گردید.  $ZnFe_2O_4@Cell@APTES@Van$  از رشد باکتری‌های گرم منفی اشریشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری نمود. رشد اشریشیا کلی در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تا ۸۵ درصد کاهش یافت و غلظت ۰/۱ میلی‌گرم نانوذره از رشد سودوموناس آئروژینوزا به‌طور کامل جلوگیری نمود. رشد باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره به‌طور کامل متوقف شد.

نتیجه‌گیری: نانوکامپوزیت دستکاری شده با ونکومايسين علیه هر دو دسته باکتری گرم مثبت و گرم منفی فعالیت ضدباکتریایی داشته و پتانسیل غلبه بر مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها را داراست.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا،  $ZnFe_2O_4@Cell@APTES@Van$

\* نویسنده مسؤول: دکتر علی حسین رضایان، پست الکترونیکی [ahrezayan@ut.ac.ir](mailto:ahrezayan@ut.ac.ir)

نشانی: تهران، خیابان کارگر شمالی، بالاتر از چهار راه جلال آل احمد، دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فنون نوین، تلفن ۸۸۴۹۷۲۳۵-۰۲۱، شماره ۸۸۴۹۷۲۳۴

وصول ۱۳۹۹/۱۱/۱ اصلاح نهایی ۱۴۰۰/۴/۵ پذیرش ۱۴۰۰/۵/۲۴ انتشار ۱۴۰۰/۱۲/۲۱

### مقدمه

باعث افزایش فعالیت‌های شیمیایی و بیولوژیکی، انحلال‌پذیری، تحرک بسیار زیاد در بدن انسان، توانایی نفوذ به غشاء سلول و خاصیت ضدباکتریایی و ضد سرطانی آنها می‌شود.<sup>۱</sup> در قرن حاضر شناخت و گسترش آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات ضدباکتریایی، شیوع بیماری‌های عفونی و مرگ و میر ناشی از آنها را به میزان بسیار زیادی کاهش داده؛ اما مقاومت آنتی‌بیوتیکی از مشکلات اساسی است که امروزه جامعه بشری با آن مواجه است.<sup>۲</sup> عوامل متعددی از جمله تکامل باکتری‌ها منجر به ناکارآمدی بسیاری

در مقیاس نانو، خصوصیات ماده مانند خواص فیزیکی و فعالیت‌های شیمیایی تغییر نموده و در نتیجه موجب بروز اثرات غیرقابل پیش‌بینی و منحصر به فردی می‌شود که تمایل به تولید آنها را افزایش می‌دهد.<sup>۱</sup> امروزه امکان تولید طیف وسیعی از نانو ساختارها به وسیله فناوری نانو فراهم شده و امکان بکارگیری آنها در علوم مختلف وجود دارد.<sup>۲</sup> از مهم‌ترین خواص بحث برانگیز نانوذرات اندازه بسیار کوچک در مقابل فضای سطحی بزرگشان است که

ویژگی ضدباکتری دارند.<sup>۲۲،۲۱،۲۴</sup> بالا بودن نسبت سطح به حجم در نانوذرات سطح تماس آنها با محیط و باکتری را افزایش داده و منجر به افزایش فعالیت زیستی و شیمیایی آنها می‌شود.<sup>۱۳</sup>

تاکنون مکانیسم اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسید فلزی به طور کامل شناخته نشده؛ اما تحقیقات نشان داده اثرات این نانوذرات بر باکتری‌ها نتیجه چند فعالیت همزمان است که اصلی‌ترین آنها تولید اکسیژن فعال است. از دیگر مکانیسم‌های اثر ضدباکتریایی آنها می‌توان به آسیب‌رسانی به غشای سلولی، اختلال در هموستازی یون‌های فلزی، غیرفعال کردن پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، سمیت ژنی و تداخل در مسیرهای پیام‌رسانی اشاره کرد.<sup>۲۳</sup> این مطالعه به منظور تعیین اثر ضدباکتریایی و همولیتیک نانوکامپوزیت روی/فریت/سلولز (ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell) (نانوذره تنها)، نانوکامپوزیت روی/فریت/سلولز آمین‌دار شده با triethoxysilane ((3-Aminopropyl) APTES) ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES (نانوذره پوشش‌دار شده) و نانوکامپوزیت ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van (نانوذره پوشش‌دار شده و اتصال یافته به ونکومایسین) علیه باکتری‌های گرم منفی اش‌ریشیا کلی (*E. coli*) و سودوموناس آئروژینوزا (*P. aeruginosa*) و باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (*S. aureus*) انجام شد.

### روش بررسی

در این مطالعه توصیفی، نانوکامپوزیت‌های ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell، ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES و نانوکامپوزیت پوشش‌دار شده و اصلاح شده با ونکومایسین (ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van) در گروه مهندسی زیستی، دانشکده علوم و فنون و نوین دانشگاه تهران طی سال ۱۳۹۸ سنتز و تعیین ویژگی شدند.

عصاره مخمر و تریپتون از فلوکا، سدیم کلراید و آگار از سیگما و مولر هیتون برات از مرک تهیه شد. باکتری‌های *P. aeruginosa* (ATCC 27853)، *E. coli* (ATCC 25922) و *S. aureus* (ATCC 25923) از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند.

در این مطالعه توصیفی فعالیت ضدباکتریایی به روش رقیق‌سازی سریالی (broth microdilution method) بررسی شد.<sup>۲۴</sup>

با توجه به حلالیت محدود نانوذرات در دست بررسی، آزمایشات اولیه در محیط کشت جامد و با استفاده از دیسک انجام شد؛ اما نتایج قابل قبولی به دست نیامد. در نهایت با در نظر گرفتن تمامی نکات، آزمایشات در محیط برات انجام شد. برای تک تک غلظت‌هایی که در آن فعالیت ضدباکتری اندازه‌گیری شد؛ نمونه کنترل جداگانه‌ای تهیه و جذب آن از جذب نمونه کم شد. همچنین بعد از اتمام زمان انکوباسیون، میزان رشد باکتری‌ها در پلیت‌های حاوی آگار نیز بررسی گردید تا رشد آنها علاوه بر محیط مایع، در محیط کشت

از آنتی‌بیوتیک‌ها شده و سلامت عمومی جامعه را در معرض خطر قرار داده است. این مسأله محققان را برآن داشته که برای غلبه بر مقاومت باکتری‌های عفونت‌زا به دنبال راهکارهایی چون شناسایی ترکیبات طبیعی، اصلاح آنتی‌بیوتیک‌های موجود و سنتز پپتیدهای ضد میکروبی باشند؛ اما سرعت ورود آنتی‌بیوتیک‌های جدید کمتر از رشد سریع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌هاست. از دلایل این امر خطر بالای کاهش فروش آنتی‌بیوتیک‌های جدید به دلیل احتمال بالای مقاومت به آنهاست.<sup>۲۵</sup> در سال‌های اخیر استفاده از فناوری نانو برای غلبه بر چالش اشاره شده مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است.<sup>۹-۷</sup> در این بین نانوذرات فلزی به دلیل دارا بودن ویژگی‌های ضدباکتری بیش از سایر نانو ذرات اهمیت یافته‌اند.<sup>۱۰</sup> به طوری که در حال حاضر استفاده از اثر هم افزایی آنتی‌بیوتیک‌ها و نانوذرات اکسید فلزی به عنوان یکی از راهکارهای عملی، اقتصادی و امیدوارکننده برای غلبه بر مقاومت‌های باکتریایی است.<sup>۱۱،۱۲</sup>

نانوذرات اکسید روی از مهم‌ترین و پرکاربردترین نانوذرات اکسید فلزی شناخته می‌شوند. مکانیسم ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی اغلب به تولید یون‌های روی نسبت داده می‌شود. علاوه بر این، تولید اکسیژن فعال و اعمال استرس اکسیداتیو به عنوان مکانیسم‌های دیگری برای ویژگی ضدباکتریایی آنها گزارش شده است.<sup>۱۳</sup>

استفاده همزمان از نانوذرات اکسید فلزی و آنتی‌بیوتیک‌ها موجب هم‌افزایی اثرات ضد میکروبی این ترکیبات شده و قدرت آنتی‌بیوتیک‌ها را که سابقاً به دلیل بروز مقاومت میکروبی کارایی خود را از دست داده بودند؛ باز می‌گرداند. به علاوه آنتی‌بیوتیک‌های متصل شده به نانوذرات اکسید فلزی غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها را در محل اثرشان افزایش می‌دهند.<sup>۱۴،۱۵</sup>

ونکومایسین از نظر ساختاری جزئی از خانواده آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی است و از طریق مهار سنتز دیواره سلولی، از یک طرف به طور مستقیم منجر به اتولیز آنزیمی دیواره سلولی می‌شود و از طرف دیگر به طور غیرمستقیم باعث بالا رفتن فشار اسمزی داخل سلول می‌گردد که در نهایت مرگ باکتری را به همراه دارد. از این رو بیشتر بر روی باکتری‌های گرم مثبت تاثیر می‌گذارد.<sup>۱۶</sup> استفاده گسترده از ونکومایسین باعث ایجاد مقاومت در برابر این آنتی‌بیوتیک شده و گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد برخی از سویه‌های *S. aureus* در برابر این آنتی‌بیوتیک مقاوم شده‌اند.<sup>۱۷-۱۹،۲۰</sup> یکی از مکانیسم‌های مقاومت به ونکومایسین، تغییر آمینواسیدهای انتهایی زنجیره پپتیدی متصل به ساختار پپتیدوگلیکان در ساختار دیواره باکتری است که باعث کاهش تمایل ونکومایسین به زنجیره پپتیدی پپتیدوگلیکان می‌شود.<sup>۲۰</sup>

نانوذرات اکسید فلزی در حوزه‌های کاتالیزی، تشخیص، رسانش دارو، نیمه‌هادی‌ها و پیل‌های سوختی کاربرد داشته و همچنین

خوانده شد. سپس جذب نمونه کنترل منفی هر لوله از جذب آن کسر گردید.

برای تعیین MBC پس از اتمام انکوباسیون نمونه‌ها، یک لوپ کامل از محلول موجود در هر لوله روی پلیت جامد حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از این که رشد باکتری‌ها به حد مناسبی رسید و کلونی‌های باکتری در پلیت کنترل مثبت مشاهده شد؛ کلیه پلیت‌ها از انکوباتور خارج شدند. در بین پلیت‌ها، غلظت نمونه در اولین پلیت فاقد کلونی باکتری معیار تعیین MBC قرار گرفت.

**اندازه‌گیری فعالیت همولیتیک:** آزمایش همولیز به منظور بررسی فعالیت همولیتیک نمونه‌های سنتزی بر روی گلبول‌های قرمز انسانی با استفاده از روش جذب سنجی انجام شد.<sup>۲۵</sup> ابتدا نمونه‌های سنتزی با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات نمکی (PBS) حاوی سدیم فسفات مونوبازیک ۹ میلی‌مولار، سدیم کلراید ۱۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۴ حل شدند و سپس سوسپانسیون‌های حاصل به مدت یک ساعت در حمام آبی سونیکیت شدند. برای تعیین درصد همولیز، نمونه‌های خون انسانی در لوله‌های خلاء حاوی هپارین ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ g در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس نمونه‌های خونی سه بار توسط PBS شسته شدند. به این صورت که PBS به محلول خونی اضافه شد و پس از سانتریفیوژ کردن، محلول رویی دور ریخته شد. به رسوب گلبول قرمز حاصل به نسبت ۸۰ درصد حجمی PBS (RBC/PBS= 80 %) اضافه شد. سوسپانسیون حاصل با نسبت ۱:۲۰ توسط بافر رقیق شد و نمونه‌های سنتزی به میزان مدنظر به آنها اضافه شدند. در نمونه کنترل مثبت که در آن ۱۰۰ درصد همولیز رخ می‌دهد؛ از یک درصد تریتون X-100 استفاده شد. نمونه‌های حاصل به مدت یک ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس تمامی نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ g در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و جذب محلول رویی آنها در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. درصد همولیز هر نمونه توسط فرمول 
$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{A_s - A_n}{A_p - A_n} \times 100$$
 محاسبه شد.

As: جذب نمونه‌های حاوی نانوذرات سنتزی

An: جذب نمونه‌های کنترل منفی

Ap: جذب نمونه‌های کنترل مثبت

### یافته‌ها

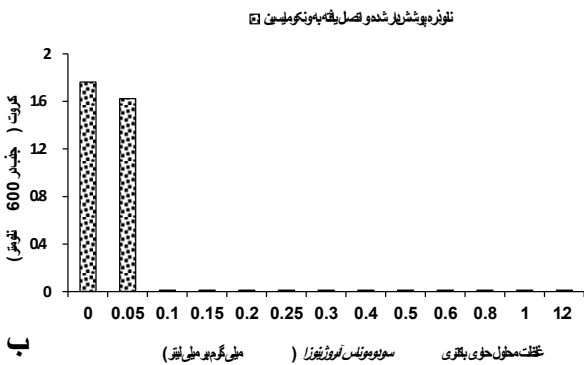
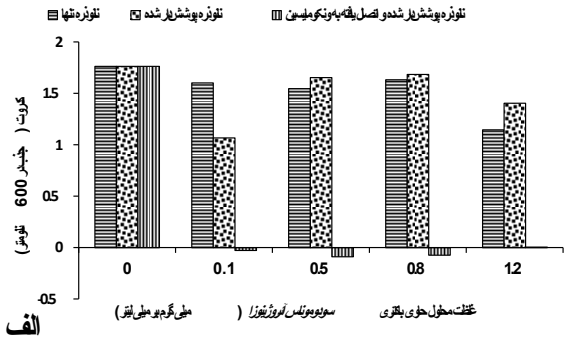
**اثر نانوذرات علیه باکتری گرم منفی *E. coli*:** فعالیت ضدباکتریایی سه نانوکامپوزیت شامل نانوکامپوزیت ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell (نانوذره تنها)، نانوکامپوزیت ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES (نانوذره پوشش‌دار شده) و نانوکامپوزیت ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van (نانوذره

جامد نیز بررسی گردد. علاوه بر موارد فوق، آزمایشات چندین بار تکرار شد و از تکرارپذیری نتایج اطمینان حاصل گردید.

برای اندازه‌گیری فعالیت ضدباکتریایی، حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) سه نمونه اشاره شده علیه باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli* و *P. aeruginosa* اندازه‌گیری شدند.

**اندازه‌گیری میزان فعالیت ضدباکتریایی:** در روش برات ماکرودیلوشن<sup>۲۴</sup> از محیط کشت مولر هینتون و محیط کشت لوریا-برتانی (LB) استفاده شد. تمام ظروف، محیط‌های کشت و محلول‌ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد تا استریل شوند. pH محیط‌های کشت روی ۷/۲ تنظیم شد. برای آماده‌سازی باکتری پس از کشت باکتری بر روی پلیت حاوی محیط کشت LB، چند کلونی به محیط کشت مایع مولر هینتون منتقل و در شیکر انکوباتور با ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از این که کدورت به کدورت محلول مک‌فارلند رسید؛ لوله آزمایش از انکوباتور بیرون آورده شد و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ و سوپ رویی دور ریخته شد. در مرحله بعد، بافر سدیم فسفات ۲۰ میلی‌مولار به رسوب اضافه شد و مجدداً سانتریفیوژ شد. این مرحله دو بار دیگر تکرار شد. سپس محلول حاوی باکتری هزار برابر رقیق شد تا آماده اضافه کردن به لوله‌های حاوی نمونه گردد.

برای محاسبه MIC ابتدا محلول ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از سه نمونه در دست بررسی در محلول آبی تهیه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت یک ساعت در سونیکیتور آبی قرار گرفت تا نمونه‌ها به خوبی در آب حل شوند. غلظت‌های مختلف از محلول آماده شده به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت مولر هینتون و باکتری رقیق شده اضافه شدند. لوله‌های حاصل به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون شیکر انکوباتور قرار داده شدند. لوله حاوی باکتری بدون نمونه به عنوان کنترل مثبت و لوله فاقد باکتری و نمونه به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. از کدورت ۰/۵ مک‌فارلند به عنوان مرجع تنظیم کدورت سوسپانسیون باکتری استفاده شد. این محیط حاوی  $10^8 \times 1/5$  باکتری است. پس از این که رشد باکتری در لوله کنترل مثبت به حد کدورت مک‌فارلند رسید؛ تمامی لوله‌ها از انکوباتور خارج شدند. در روند معمول، غلظت نمونه در اولین لوله شفاف یعنی لوله‌ای که هم از نظر چشمی شفاف بود و هم در بین لوله‌های شفاف کمترین غلظت نمونه را دارا بود؛ معیار تعیین MIC قرار گرفت؛ اما با توجه به این که محلول حاوی خود نمونه‌ها (نانوذرات) شفافیت کامل نداشتند؛ شفافیت بصری معیار تعیین MIC قرار نگرفت و جذب تمامی نمونه‌ها در ۶۰۰ نانومتر

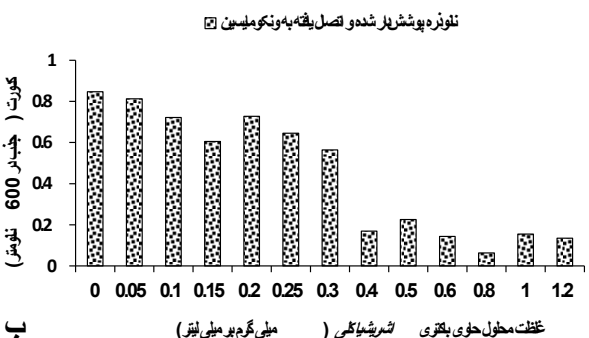
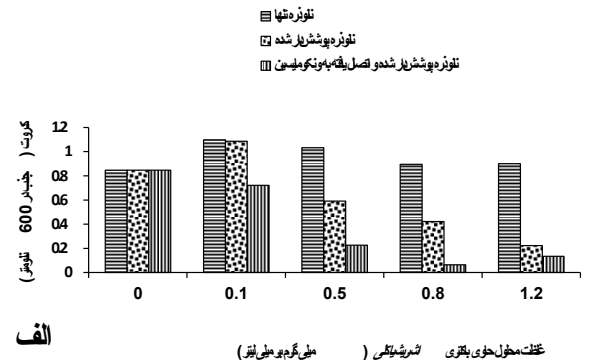


نمودار ۲: الف) کدورت (جذب در ۶۰۰ نانومتر) محلول‌های حاوی باکتری *اشریشیا کلی* در آنروزینوزا در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۵، ۰/۸، ۱/۲ میلی گرم بر میلی لیتر نمونه‌های مورد مطالعه. ب) کدورت (جذب در ۶۰۰ نانومتر) محلول حاوی باکتری *اشریشیا کلی* در ۱۲ غلظت (محدوده صفر تا ۱/۲ میلی گرم بر میلی لیتر) از نمونه نانوذره پوشش دار شده و اتصال یافته به ونکومایسین.

باکتری *E. coli* در حضور تمام غلظت‌های نانوکامپوزیت‌های ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES و ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell در پلیت‌ها رشد کرد. این ترکیبات اثر کشندگی قابل توجهی بر باکتری نداشتند. در صورتی که نتایج مربوط به ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van نشان داد که این نانوسامانه در غلظت‌های ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و بیشتر از آن تاثیر به سزایی بر مرگ باکتری *E. coli* داشته است و در مقایسه با پلیت کنترل مثبت که در آن باکتری در تمام سطح پلیت به صورت فشرده رشد کرده بود؛ فقط تعداد محدودی باکتری در پلیت‌ها دیده شدند. نانوسامانه مزبور باعث کشته شدن کامل باکتری *E. coli* نشد؛ اما تعداد باکتری‌های زنده را به شدت کاهش داد. اثر کشندگی قوی نانوسامانه مزبور در غلظت‌های بالای ۰/۴ میلی گرم بر میلی لیتر ظاهر شد. افزایش چند برابری غلظت، تاثیر بیشتری در توان کشندگی آن نداشت و در نهایت، مرگ کامل باکتری حتی در غلظت‌های بالای ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van نیز مشاهده نشد.

اثر نانوذرات علیه باکتری گرم منفی *P. aeruginosa* نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری فعالیت ضدباکتریایی سه نانوکامپوزیت ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES، ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell و

پوشش دار شده و اتصال یافته به ونکومایسین) بودند؛ به ترتیب نمونه‌های ۱، ۲ و ۳ نامگذاری شدند (نمودار یک).



نمودار ۱: الف) کدورت (جذب در ۶۰۰ نانومتر) محلول‌های حاوی باکتری *اشریشیا کلی* در غلظت‌های صفر، ۰/۱، ۰/۵، ۰/۸، ۱/۲ میلی گرم بر میلی لیتر نمونه‌های مورد مطالعه. ب) کدورت (جذب در ۶۰۰ نانومتر) محلول حاوی باکتری *اشریشیا کلی* در ۱۲ غلظت (محدوده صفر تا ۱/۲ میلی گرم بر میلی لیتر) از نمونه نانوذره پوشش دار شده و اتصال یافته به ونکومایسین.

در نمودار یک جذب خوانده شده لوله‌های حاوی باکتری رشد کرده در ۶۰۰ نانومتر علیه غلظت‌های مختلف نانوذره نشان داده شده است.

با توجه به نمودار یک-الف ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell مانع رشد باکتری *E. coli* نشد و حتی به نظر می‌رسد در غلظت‌های پایین تا حدی باعث افزایش رشد باکتری شده است. ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES در ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و بیشتر از آن باعث کاهش رشد باکتری گردید. اثر ضدباکتری ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van در نمودار یک-ب مشهود است. رشد باکتری *E. coli* در تمام غلظت‌ها کاهش یافت و ارتباط مستقیمی بین کاهش میزان رشد باکتری و افزایش غلظت نانوسامانه تا غلظت ۰/۴ میلی گرم بر میلی لیتر وجود داشت و در غلظت‌های بیشتر از آن تغییری محسوس در کدورت دیده نشد. در غلظت ۰/۴ میلی گرم بر میلی لیتر و بیشتر از آن باکتری همچنان در لوله‌ها رشد کرد؛ اما میزان رشد آن به میزان قابل توجهی (حدود ۸۰ درصد) کاهش یافت. هرچند رشد باکتری *اشریشیا کلی* به‌طور کامل مهار نشد؛ اما کاهش زیادی در میزان رشد آن رخ داد.

Van@APTES@Cell@ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> علیه *P. aeruginosa* در نمودار

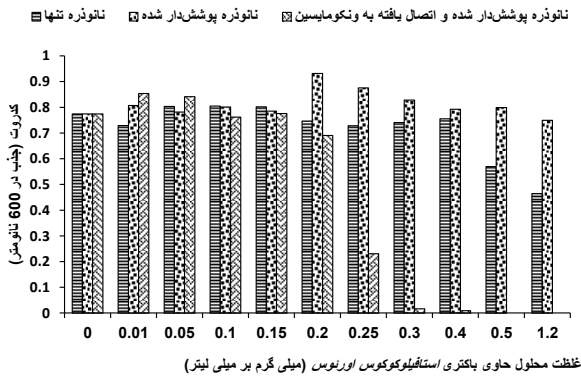
۲ نشان داده شده است.

در نمودار ۲-الف اثر سه نانوذره، در چهار غلظت ۰/۱، ۰/۵، ۰/۸ و ۱/۲ میلی گرم بر میلی لیتر بر مهار رشد *P. aeruginosa* با هم مقایسه شده است. نانوکامپوزیت ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell و نانوکامپوزیت ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES اثر قابل توجهی بر رشد باکتری نداشتند. در حالی که ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van در غلظت‌های کم باعث مهار کامل رشد باکتری گردید. با توجه به میزان کدورت نمونه‌ها در نمودار ۲-ب در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر و بیش از آن، رشد باکتری به صورت کامل مهار شد. MIC نانوسامانه ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van علیه *P. aeruginosa* حدود ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد.

در ادامه آزمایشات، اثر کشندگی هر سه نانوذره بر باکتری *P. aeruginosa* با کشت این باکتری در محیط کشت جامد بررسی شد. نتایج مربوط به اثر نانوسامانه متصل به نکومایسین در نمودار ۲ آمده است. باکتری در تمام غلظت‌های ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell و ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES در پلت‌ها رشد نمود. در حالی که کلونی باکتری تنها در غلظت ۰/۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوسامانه متصل به نکومایسین دیده شد و در غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر و بالاتر از آن هیچ کلونی در پلت‌ها مشاهده نشد (نمودار ۲) که مبین از بین رفتن کامل باکتری است. غلظت MBC نانوسامانه متصل به نکومایسین برای *P. aeruginosa* معادل MIC و حدود ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد. اتصال نکومایسین به نانوکامپوزیت پوشش دار شده باعث اثر مهاری آن بر رشد و همچنین اثر کشندگی آن بر *P. aeruginosa* در غلظت‌های پایین گردید.

اثر نانوذرات علیه باکتری گرم مثبت *S. aureus*: نتایج اندازه گیری فعالیت ضدباکتریایی سه نمونه ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell، ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van و ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES (به ترتیب نمونه‌های ۱، ۲ و ۳) علیه باکتری *S. aureus* در نمودار ۳ نشان داده شده است.

با توجه به نمودار ۳، نانوذرات ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell و ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES اثر قابل توجهی در مهار رشد باکتری *S. aureus* نداشتند و صرفاً در غلظت‌های بالاتر تا حدی باعث کاهش رشد باکتری گردید. تاثیر ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van بر مهار رشد باکتری از غلظت ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر شروع شد و اثر آن در غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر کاملاً مشهود گردید و در غلظت ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر رشد *S. aureus* را به صورت کاملاً مهار نمود.



نمودار ۲: کدورت (جذب در ۶۰۰ نانومتر) محلول حاوی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در ۱۲ غلظت (محدوده صفر تا ۱/۲ میلی گرم بر میلی لیتر) از نمونه‌های مورد مطالعه

اثر کشندگی هر سه نانوذره بر *S. aureus*، با کشت این باکتری در محیط کشت جامد بررسی شد. باکتری در تمام غلظت‌های ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell و ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES در پلت‌ها رشد نمود. در حالی که در حضور نانوسامانه متصل به نکومایسین، کلونی باکتری در غلظت‌های کمتر از ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر رشد کرد و در غلظت‌های بالاتر از آن هیچ کلونی در پلت‌ها مشاهده نشد.

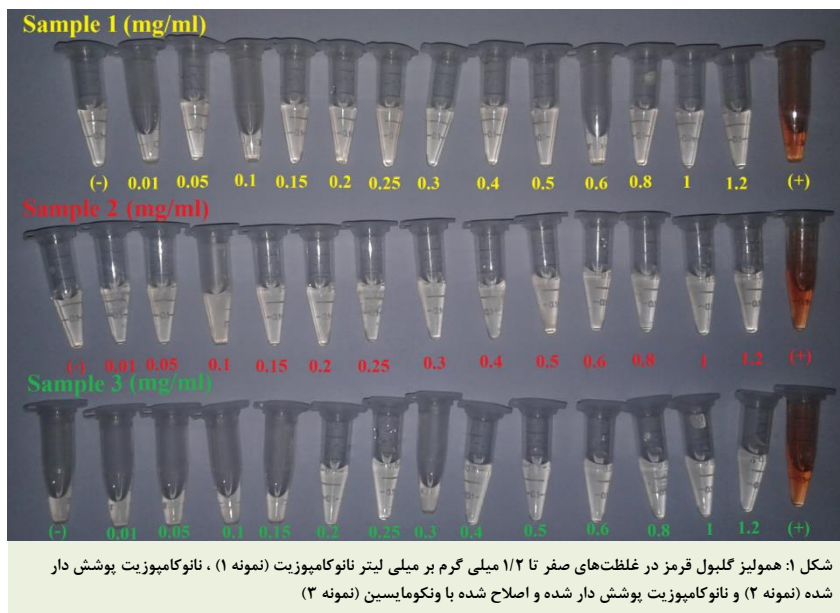
نتایج آزمایشات ضدباکتریایی نانوکامپوزیت پوشش دار شده و اصلاح شده با نکومایسین در جدول یک آمده است. برای باکتری *E. coli* به MIC و MBC نرسیدیم. اثرات مهار رشد و کشندگی نانوکامپوزیت پوشش دار شده و اصلاح شده با نکومایسین برای باکتری *P. aeruginosa* نسبت به *S. aureus* در غلظت‌های کمتر رخ داد.

**فعالیت همولیتیک نانوذرات:** نتایج به دست آمده از آزمایش همولیز گلبول قرمز خون در نمونه‌های حاوی ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell، ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van و ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES (به ترتیب نمونه‌های ۱، ۲ و ۳) در شکل یک نشان داده شده است.

جدول ۱: مقادیر حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوکامپوزیت پوشش دار شده و اصلاح شده با نکومایسین برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس کلی*، *سودوموناس آئروزیئوزا*

باکتری‌ها	حداقل غلظت مهارکنندگی (mg/mL)	حداقل غلظت کشندگی (mg/mL)
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۰/۳	۰/۵
<i>استافیلوکوکوس کلی</i>	-	-
<i>سودوموناس آئروزیئوزا</i>	۰/۱	۰/۱

مقایسه شدت رنگ در نمونه کنترل مثبت با نمونه‌های حاوی نانوذرات نشان داد که در تمامی غلظت‌های هر سه نانوذره، نمونه‌ها کاملاً فاقد رنگ هستند و همولیز مشخصی در هیچکدام از نمونه‌ها



اتفاق نیفتاد. خوانش جذب در نمونه‌های نشان داده شده در شکل یک نیز موید این نتیجه بود.

### بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، نانوکامپوزیت پوشش دار شده و اصلاح شده با ونکومایسین علیه هر دو گروه باکتری گرم مثبت و گرم منفی تاثیر داشت و باعث کاهش و یا توقف رشد در آنها گردید. بر اساس گزارشات منتشر شده<sup>۱۸</sup> ونکومایسین مانع سنتز دیواره سلولی در باکتری‌های گرم مثبت شده و می‌تواند علیه این دسته از باکتری‌ها عمل کند؛ اما در خصوص باکتری‌های گرم منفی، به جز در موارد محدود، موثر واقع نشده است. در این تحقیق نشان داده شد که ونکومایسین اتصال یافته به نانوکامپوزیت پوشش دار شده، هرچند باعث توقف کامل در رشد و مرگ باکتری گرم منفی اشرشیا کلی نگردید؛ اما تاثیر قابل توجهی بر کاهش رشد آن داشت و در غلظت ۰/۴ میلی گرم بر میلی لیتر باعث شد که رشد این باکتری به میزان ۸۵ درصد کاهش یابد که این میزان از تاثیر بر رشد قابل ملاحظه است. همچنین نتایج نشان دادند که ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van سبب توقف کامل رشد و مرگ باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا گردید. چنین نتیجه‌ای در مورد باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نیز به دست آمد. در سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۰/۱ و ۰/۳ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شدند. در مورد MBC نیز تفاوت مشابهی دیده شد. این نتیجه اثبات می‌کند که سودوموناس

آئروژینوزا نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس در مقابل نانوذره ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES@Van حساس تر است. علاوه بر این نتایج این تحقیق نشان دادند که نانوکامپوزیت‌های ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Cell@APTES و ونکومایسین نداشته و اتصال نانوکامپوزیت پوشش دار شده به ونکومایسین باعث فعالیت ضدباکتریایی آن می‌شود. تعیین مکانیسم دقیق اثر ضدباکتریایی نانوکامپوزیت متصل به ونکومایسین به تحقیقات و آزمایشات بیشتری نیاز دارد.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج این مطالعه، علیرغم این که ونکومایسین اصولاً دارویی موثر علیه باکتری‌های گرم مثبت است و تاثیر مناسبی بر باکتری‌های گرم منفی ندارد؛ نانوکامپوزیت پوشش دار شده و اتصال یافته به ونکومایسین علاوه بر این که اثر ضدباکتریایی بر باکتری گرم مثبت *S. aureus* داشت؛ بر دو باکتری گرم منفی *E. coli* و *P. aeruginosa* نیز اثر مهاری و کشندگی داشت. به نظر می‌رسد اتصال ونکومایسین به نانوذره در بروز این ویژگی تاثیر داشته است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه (شماره ۲۸۴۴۵/۰۶/۱۵) خانم مینو اکبری برای اخذ درجه دکتری در رشته نانویوتکنولوژی از دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران بود. بدین وسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران ایران (INSF) به خاطر حمایت مالی پروژه (شماره ۹۶۰۰۲۰۹۴) تشکر می‌نمایم.

### References

1. Rajaei M, Foroughi MM, Jahani S, Shahidi Zandi M, Hassani Nadiki H. Sensitive detection of morphine in the presence of dopamine with La<sup>3+</sup> doped fern-like CuO nanoleaves/MWCNTs modified carbon paste electrode. *J Mol Liq.* 2019 Jun; 284: 462-72. DOI: 10.1016/j.molliq.2019.03.135
2. Mofazzal Jahromi MA, Sahandi Zangabad P, Moosavi Basri SM, Sahandi Zangabad K, Ghamarypour A, Aref AR, et al.

Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018 Jan; 123: 33-64. DOI: 10.1016/j.addr.2017.08.001

3. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small.* 2005 Mar; 1(3): 325-27. DOI: 10.1002/sml.200400093

4. Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist.* 2018 Oct; 11: 1645-58. DOI: 10.2147/IDR.S173867
5. Zhu X, Radovic-Moreno AF, Wu J, Langer R, Shi J. Nanomedicine in the Management of Microbial Infection - Overview and Perspectives. *Nano Today.* 2014 Aug; 9(4): 478-98. DOI: 10.1016/j.nantod.2014.06.003
6. Teixeira MC, Sanchez-Lopez E, Espina M, Calpena AC, Silva AM, Veiga FJ, et al. Advances in antibiotic nanotherapy: Overcoming antimicrobial resistance. In: Shegokar R, Souto EB. *Emerging Nanotechnologies in Immunology.* 1<sup>st</sup> ed. Elsevier. 2018; pp: 233-59. DOI: 10.1016/B978-0-323-40016-9.00009-9
7. Zaidi S, Misba L, Khan AU. Nano-therapeutics: A revolution in infection control in post antibiotic era. *Nanomedicine.* 2017 Oct; 13(7): 2281-301. DOI: 10.1016/j.nano.2017.06.015
8. Jijie R, Barras A, Teodorescu F, Boukherroub R, Szunerits S. Advancements on the molecular design of nanoantibiotics: current level of development and future challenges. *Mol Syst Des Eng.* 2017; 2(4): 349-69. DOI: 10.1039/C7ME00048K
9. Saúde a, Franco OL. Functionalization of nanostructures for antibiotic improvement: an interdisciplinary approach. *Ther Deliv.* 2016 Nov; 7(11): 761-71. DOI: 10.4155/tde-2016-0047
10. Beyth N, Hourri-Haddad Y, Domb A, Khan W, Hazan R. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015: 246012. DOI: 10.1155/2015/246012
11. Ramanavičius S, Žalneravičius R, Niaura G, Drabavičius A, Jagminas A. Shell-dependent antimicrobial efficiency of cobalt ferrite nanoparticles. *Nano-Structures & Nano-Objects.* 2018 Jul; 15: 40-47. DOI: 10.1016/j.nanos.2018.03.007
12. Chakraborty SP, Sahu SK, Mahapatra SK, Santra S, Bal M, Roy S, et al. Nanoconjugated vancomycin: new opportunities for the development of anti-VRSA agents. *Nanotechnology.* 2010 Mar; 21(10): 105103. DOI: 10.1088/0957-4484/21/10/105103
13. Natan M, Banin E. From Nano to Micro: using nanotechnology to combat microorganisms and their multidrug resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017 May; 41(3): 302-22. DOI: 10.1093/femsre/fux003
14. Raghunath A, Perumal E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *Int J Antimicrob Agents.* 2017 Feb; 49(2): 137-52. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011
15. Arias LS, Pessan JP, Miranda Vieira AP, Toito de Lima TM, Botazzo Delbem AC, Monteiro DR. Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. *Antibiotics (Basel).* 2018 Jun; 7(2): 46. DOI: 10.3390/antibiotics7020046
16. Wang F, Zhou H, Olademehin OP, Kim SJ, Tao P. Insights into Key Interactions between Vancomycin and Bacterial Cell Wall Structures. *ACS Omega.* 2018 Jan; 3(1): 37-45. DOI: 10.1021/acsomega.7b01483
17. Stogios PJ, Savchenko A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Sci.* 2020 Mar; 29(3): 654-69. DOI: 10.1002/pro.3819
18. Faron ML, Ledebouer NA, Buchan BW. Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant Enterococcus in the Health Care Setting. *J Clin Microbiol.* 2016 Oct; 54(10): 2436-47. DOI: 10.1128/JCM.00211-16
19. Ayobami O, Willrich N, Reuss A, Eckmanns T, Markwart R. The ongoing challenge of vancomycin-resistant Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis in Europe: an epidemiological analysis of bloodstream infections. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec; 9(1): 1180-93. DOI: 10.1080/22221751.2020.1769500
20. Griffin JH, Linsell MS, Nodwell MB, Chen Q, Pace JL, Quast KL, et al. Multivalent drug design. Synthesis and in vitro analysis of an array of vancomycin dimers. *J Am Chem Soc.* 2003 May; 125(21): 6517-31. DOI: 10.1021/ja021273s
21. Regiel-Futyr A, Dąbrowski J, Mazuryk O, Spiewak K, Kyzioł A, Pucelik B, et al. Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era. *Coord Chem Rev.* 2017; 351: 76-117. DOI: 10.1016/J.CCR.2017.05.005
22. Hemeg HA. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *Int J Nanomedicine.* 2017 Nov; 12: 8211-25. DOI: 10.2147/IJN.S132163
23. Aderibigbe BA. Metal-Based Nanoparticles for the Treatment of Infectious Diseases. *Molecules.* 2017 Aug; 22(8): 1370. DOI: 10.3390/molecules22081370
24. Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *J Med Plant Res.* 2010 Jan; 4(2): 104-11. DOI: 10.5897/JMPR09.030
25. Helmerhorst EJ, Reijnders IM, van 't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Lett.* 1999 Apr; 449(2-3): 105-10. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00411-1