

ارزیابی تاثیر ضد باکتریایی نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G7 در محیط آبی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۵ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۲/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۰۶ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۵/۱۰

زمینه و هدف: نانو دندریمرها درشت مولکول‌های مصنوعی هستند که در شاخه پزشکی و بهداشت کاربرد فراوانی دارند. هدف از انجام این پژوهش، سنتز و بررسی کارایی دندریمر پلی آمیدوآمین-G7 (PAMAM-G7) در حذف باکتری‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس از محلول آبی بود.

روش بررسی: مطالعه به صورت تجربی از مرداد تا آذر ۱۳۹۴ در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام گردید. ابتدا از هر سویه باکتری رقت 10^2 واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی لیتر تهیه شد. سپس غلظت‌های مختلفی (۰/۰۲۵، ۰/۲۵، ۲/۵ و $25 \mu\text{g/ml}$) از دندریمر در دمای آزمایشگاه ($25-23^\circ\text{C}$) به نمونه آب اضافه شد. به منظور تعیین کارایی 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.

یافته‌ها: خاصیت ضد باکتریایی دندریمر در محیط آبی با افزایش غلظت دندریمر و زمان تماس، رابطه مستقیم دارد. در غلظت 25 mg/l و در زمان تماس ۶۰ دقیقه تمامی باکتری‌ها به جز استافیلوکوکوس اورئوس و در زمان ۳۰ دقیقه باکتری‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا اوکسی توکا به صورت 10^0 حذف شدند. همچنین در غلظت $2/5 \text{ mg/l}$ و در زمان ۶۰ دقیقه باکتری‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا و پروتئوس میرابیلیس به طور 10^0 حذف شدند.

نتیجه گیری: دندریمر PAMAM-G7 در حذف باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مؤثر است. در این بین تاثیر آن در باکتری‌های گرم منفی بهتر از باکتری گرم مثبت بود.

کلمات کلیدی: باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت، عامل ضد باکتریایی، سنتز، دندریمر پلی آمیدوآمین.

میترا غلامی^۱، شهرام نظری^{۲*}

مهدی فرزادکیا^۱، غریب مجیدی^۳

سودابه علیزاده متبوع^۴

۱- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲- گروه مهندسی بهداشت محیط، عضو کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۳- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

۴- گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، اتوبان همت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده بهداشت، گروه مهندسی بهداشت
تلفن: ۰۲۱-۸۶۷۰۴۶۳۳
E-mail: shahramnazari73@yahoo.com

مقدمه

گندزدایی آب برای از بین بردن میکروب‌های بیماری‌زا ضروری می‌باشد.^۱ گندزدهای شیمیایی که به طور معمول برای تصفیه آب مورد استفاده قرار می‌گیرد شامل کلر آزاد، کلرآمین‌ها و ازن می‌باشد. اگرچه روش‌های گندزدایی که هم‌اکنون در تصفیه آب آشامیدنی استفاده می‌شوند می‌توانند پاتوژن‌های میکروبی را به طور مؤثری کنترل کنند، اما با ترکیبات مختلفی در آب واکنش داده و موجب تشکیل محصولات جانبی گندزدایی می‌شوند. بسیاری از محصولات جانبی گندزدایی سرطان‌زا هستند.^۲ بنابراین روش‌های گندزدایی

آب مایه حیات و فراوان‌ترین ماده مرکب بر روی کره زمین است. جمعیت جهان در حال افزایش و منابع آب آشامیدنی در حال کاهش است. بنابراین در دسترس بودن آب سالم یکی از مهمترین مسائلی پیش روی بشر است.^۱ بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال ۲۰۰۸ میزان مرگ‌ومیر مرتبط با بیماری‌های منتقله آب بیش از پنج میلیون نفر در سال بوده است.^۳ بنابراین

نسل تعداد گروه‌های انتهایی آمینی دو برابر می‌شود. برای نمونه نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G4 دارای ۶۴ گروه انتهایی آمینی می‌باشد،^{۱۱} در حالی که نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G7 که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت دارای ۵۱۲ گروه انتهایی آمینی می‌باشد.^{۱۲} همچنین نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین عامل کی‌لیت‌کننده قدرتمندی می‌باشد، به طوری که می‌تواند با کاتیون‌هایی مانند فلزات واسطه لانتانیدها و آکتینیدها نیز کی‌لیت دهد. این لیگاندها با تغییر pH قابل بازیافت بوده و گزینش‌پذیر هستند.^{۱۳} نانوذرات‌ها می‌توانند به صورت مستقیم (اختلال در انتقال الکترون، اختلال در دیواره سلولی و اکسیداسیون اجزای سلول) یا به واسطه تولید محصولات ثانویه، با سلول‌های میکروبی فعل و انفعال داشته باشند.^{۱۴} اثر ضد میکروبی دندریمر به فعل و انفعال الکترواستاتیکی میان بخش کاتیونی دندریمر (گروه آمینی) و بخش آنیونی سطح سلول باکتری همراه با اختلال در دیواره سلولی نسبت داده می‌شود.^{۱۵}

هنگامی که دندریمر به یک محلول باکتریایی وارد می‌گردد، جانشین یون‌های دو ظرفیتی سطحی باکتری‌ها مانند کلسیم و منیزیم می‌شود، سپس به غشاهای فسفولیپیدی دارای بار منفی متصل و باعث تغییر اندک در نفوذپذیری غشا می‌گردد. غلظت بالاتر دندریمر منجر به دناتوره شدن پروتئین‌های غشایی شده و شروع به سوراخ نمودن فسفولیپید می‌کند. در این مرحله نفوذپذیری بالای غشا باعث نشت یون‌های پتاسیم می‌شود. اگر غلظت دندریمر افزایش یابد می‌تواند ساختار غشایی را بی‌ثبات‌تر کند.

در نهایت، غلظت‌های بالاتری از دندریمر موجب فروپاشی کامل غشای باکتریایی و مرگ باکتری می‌شود.^{۱۵} این مطالعه با هدف سنتز و تعیین کارایی دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G7 (Polyamidoamine-G7) و همچنین شناسایی و ارایه ترکیب شیمیایی دندریمر (PAMAM-G7) پلی‌آمیدوآمین-G7 به‌عنوان عامل ضد باکتریایی در حذف باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا اوکسی توکا*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *پروتئوس میرابیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از محیط آبی انجام شد.

روش بررسی

پژوهش کنونی به‌صورت تجربی از مرداد تا آذر ۱۳۹۴ در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام گردید.

موجود بایستی مورد ارزیابی دوباره قرار گیرند و راهکارهای جدیدی به‌منظور بالا بردن قابلیت اطمینان و کارایی گندزدایی ارایه گردد، به طوری که از تشکیل محصولات جانبی گندزدایی جلوگیری شود. چهار دسته از نانو موادها شامل: نانوذرات فلزی، ژئولیت‌ها، نانو مواد کربن‌دار و دندریمرها در تصفیه آب استفاده می‌شوند.^{۱۶} نانوذرات، آنتی‌اکسیدان‌های قوی نیستند و در آب به‌نسبت خنثی می‌باشند و محصولات جانبی گندزدایی را تولید نمی‌کنند.^{۱۷} دندریمرها ماکرومولکول‌های دارای ساختار سه‌بعدی، منظم و پرشاخه‌اند. ساختار خاص این ترکیبات، آن‌ها را دارای خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه نموده و از پلیمرهای خطی معمولی متمایز می‌سازد. این خواص شامل دارا بودن شکل فشرده و تعداد زیادی گروه‌های انتهایی فعال و فضای خالی آزاد جهت جذب مولکول‌های میزبان بین شاخه‌ها می‌باشد.^{۱۸}

دو روش واگرا و همگرا از روش‌های اصلی برای سنتز دندریمرها هستند. در این روش‌ها اگر سنتز از هسته شروع و به سمت لایه‌های بیرونی گسترش یابد، سنتز از نوع واگراست و چنانچه سنتز از محیط بیرونی آغاز و در هسته پایان یابد، سنتز از نوع همگراست.^{۱۹} در هر مرحله از سنتز، گروه‌های شاخه‌دار جدید با شاخه‌های درونی واکنش می‌دهند و لایه به لایه بر هسته مرکزی افزوده می‌شود. به قرار گرفتن گروه‌های شاخه‌دار در هر مرحله از سنتز بر روی هسته دندریمر، نسل گفته می‌شود.^{۲۰}

دندریمرها نسل‌های مختلف، ابعاد و جرم مولکولی متفاوتی دارند که در طی فرآیند سنتز کنترل می‌شود. شاخه‌های یک دندریمر دارای ساختار منظم و یکنواختی است که روی خواص دندریمرها بسیار تأثیرگذار می‌باشد.^{۲۱} تا به امروز دو گروه از خانواده دندریمرها شامل دندریمرهای پلی‌آمیدوآمین (Polyamidoamine, PAMAM) و پلی‌پروپیلن‌ایمین‌ها (Polypropylenimine, PPI) به‌شکل تجاری ساخته شده‌اند. از مهمترین واحدها در تعیین ویژگی‌ها و کاربردهای یک دندریمر، گروه‌های عامل متصل به واحدهای منشعب می‌باشد. گروه‌های سطحی که به مولکول‌های نانو دندریمر متصل می‌شوند بسیار متنوع می‌باشند. این گروه‌ها شامل آمین، کربوکسیلات، هیدروکسیل و متیل استر می‌باشد. نانو دندریمرهای پلی‌آمیدوآمین با گروه انتهایی آمینی اثر ضدباکتریایی بالایی دارد.^{۲۲} نانو دندریمرهای پلی‌آمیدوآمین در نسل‌های مختلف سنتز می‌شوند و با افزایش هر

گرم منفی اشریشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس می باشد که از مرکز پژوهش های صنعتی ایران خریداری گردید. تمامی سوش های باکتریایی خریداری شده، در محیط کشت نوترینت براث در شرایط هوازی و به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۷ گرمخانه گذاری شدند. سپس با لوپ استریل از محیط کشت نوترینت براث مقداری برداشته و بر روی محیط های کشت اختصاصی هر باکتری، به حالت خطی کشت داده شد. سپس محیط ها به حالت وارونه در انکوباتور با دمای °C ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند.^{۱۷} تمامی محیط کشت های مورد استفاده ساخت Merck KGaA, Darmstadt, Germany بود. 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 دهیدراته (BaCl₂.2H₂O) و اسید سولفوریک (H₂SO₄) بوده که از شرکت Merck تهیه شدند. با مخلوط نمودن ۰/۰۵ ml باریم کلرید دهیدراته (BaCl₂.2H₂O) ۱/۱۷۵٪ با ۹/۹۵ ml اسید سولفوریک (H₂SO₄) ۱٪، استاندارد نیم مک فارلند تهیه گردید. با مخلوط این دو ترکیب رسوب سولفات باریم که سبب ایجاد کدورت در محلول می شود، به وجود آمد.

از آنجایی که تعداد باکتری تلقیح شده یکی از مهمترین متغیرهایی است که بر نتیجه این پژوهش اثر می گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد. بدین منظور برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، از کشت تازه و جوان باکتری با استفاده از سوآپ استریل چند کلنی به لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل منتقل شده و پس از هم زدن محلول، کدورت حاصله در مقابل چراغ مطالعه با کدورت محلول نیم مک فارلند که توسط ورتکس هم زده می شود، مقایسه گردید. این عملیات برای همه باکتری های مورد مطالعه به طور جداگانه انجام گردید. با توجه به اینکه غلظت باکتریایی نیم مک فارلند

نانو دندریمرهای PAMAM با هسته ی اتیلن دی آمین توسط روش Tomalia و روش رشد واگرا سنتز می شوند.^۸ سنتز شامل دو واکنش متوالی تشکیل زنجیره می باشد که شامل واکنش کامل افزودن Micheal و واکنش کامل Amidation می باشد که به طور متناوب تکرار می شوند. واکنش افزودن Michael متیل اکریلات به اتیلن دی آمین در متانول نانو دندریمرهای نسل نیم با گروه های نهایی استر (OH) را که تحت عنوان G0.5 نامیده می شوند به دست می دهد. واکنش کامل Amidation این نانو دندریمرهای با انتهای استری در حضور میزان زیاد اتیلن دی آمین در متانول نانو دندریمرهای نسل کامل با انتهای آمین را که متناسب به Gn می باشند به دست می دهد. تکرار واکنش های افزودن Michael و Amidation نانو دندریمرهای نسل بالاتر بعدی را به دست می دهد. در پژوهش کنونی، نانو دندریمرهای PAMAM بر اساس روش زیر سنتز گردید.^{۱۶}

اتیلن دی آمین (۱۰ g یا ۰/۱۶۶ mol) در ۱۰۰ ml متانول و در داخل یک بالن ته گرد حل شد. متیل اکریلات (۹۴/۶ g یا ۰/۷۵۱ mol) در دمای °C ۴۰ اضافه شد و سیستم تحت نیتروژن به مدت ۲۴ ساعت هم زده شد. متیل اکریلات اضافی تحت خلا و در دمای اتاق حذف شد. یک واکنش افزودن Michael بین آمین و اکریلات محصولی با چهار گروه متیل استر انتهایی به دست می دهد که تحت عنوان G0.5 NPAMAM تعریف می شود. سپس، اتیلن دی آمین (۱۲۰ g یا ۲ mol) در متانول حل شده و به NPAMAM G0.5 اضافه و پس از هم زدن به مدت ۴۸ ساعت تحت نیتروژن و حذف واکنش گره های اضافی توسط تقطیر خلا، محصولی به دست آمد که دارای چهار گروه انتهایی آمین بوده و تحت عنوان NPAMAM-G1 تعریف می شود. با تکرار چرخه ی بالا، نانو دندریمرهای PAMAM نسل بالاتر سنتز شدند. ویژگی های شیمیایی نانو دندریمر PAMAM-G7 در جدول ۱ نشان داده شده است.

سویه های باکتری استفاده شده در این مطالعه شامل باکتری های

جدول ۱: ویژگی های شیمیایی نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G7

فرمول مولکولی	نسل نانو دندریمر	وزن مولکولی (گرم بر مول)	اندازه (nm)	تعداد گروه های انتهایی آمین	تعداد گروه های آمین داخلی
C ₅₁₀₂ H ₁₀₂₀₈ N ₂₀₄₂ O ₁₀₂₀	۷	۱۱۶۴۹۳	۸/۸	۵۱۲	۵۱۰

حذف باکتری‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس در نمودارهای ۱ تا ۵ نشان داده شده است.

نانو دندریمر PAMAM-G7 در برابر هر دو گروه باکتری‌های گرم منفی و مثبت موثر بوده است. خاصیت ضد باکتریایی دندریمر در محیط آبی با افزایش غلظت دندریمر و زمان تماس، رابطه مستقیم داشت.

در زمان ۶۰ دقیقه و غلظت ۲۵ µg/ml تمامی باکتری‌ها به‌جز استافیلوکوکوس اورئوس (میزان حذف آن ۹۷/۵٪ می‌باشد) به‌صورت ۱۰۰٪ حذف شدند. همچنین در غلظت ۲/۵ µg/ml و در زمان ۶۰ دقیقه باکتری‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا و پروتئوس میرابیلیس به‌طور ۱۰۰٪ و باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس به‌ترتیب ۹۸/۸ و ۹۶/۸٪ حذف شدند. در غلظت ۲۵ µg/ml و در زمان ۳۰ دقیقه باکتری‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا به‌طور ۱۰۰٪ و باکتری‌های پرتئوس میرابیلیس، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس به‌ترتیب ۹۹/۸، ۹۹/۲ و ۹۵/۵٪ حذف شدند. تمامی غلظت‌های دندریمر در زمان‌های مختلف باعث کاهش باکتری‌ها شدند. در این بین تاثیر نانو دندریمر PAMAM-G7 بر روی باکتری‌های گرم منفی بهتر از باکتری گرم مثبت بود.

نمودار ۶ مشخصات نانو دندریمر PAMAM-G7، که از طریق دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوری مادون قرمز Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) (Merck, Darmstadt, Germany) اندازه گرفته شده است را نشان می‌دهد.

پیک‌های نشان داده شده در نمودار ۶ به موارد زیر اختصاص دارد: پیک در $1032/56 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های C-O می‌باشد. دو پیک در $1645/91 \text{ cm}^{-1}$ و $1547/25 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی C=O (آمید I) و خمیدگی N-H یا ارتعاشات کششی C-N (آمید II) ساختار داخلی نانو دندریمر اختصاص می‌یابد. ارتعاشات انرژی پایین‌تر گروه‌های متیلن، پراکندگی و حالت‌های تغییر شکل نامتقارن H-C-H به‌ترتیب در پیک‌های $1462/78 \text{ cm}^{-1}$ و $1365/41 \text{ cm}^{-1}$ دیده می‌شود. پیک‌ها در $2828/57 \text{ cm}^{-1}$ و $2942/15 \text{ cm}^{-1}$ به کشش C-H نسبت داده می‌شود. باندها در $3407/84 \text{ cm}^{-1}$ و $3280/00 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب به حالت کششی گروه‌های آمین اولیه و آمید اختصاص می‌یابد. ^{۲۱}

برابر $10^4 \times 1/5 \text{ CFU/ml}$ می‌باشد، از رابطه ۱ برای به‌دست آوردن رقت باکتریایی 10^3 CFU/ml استفاده گردید. $C_1V_1 = C_2V_2$ (۱)

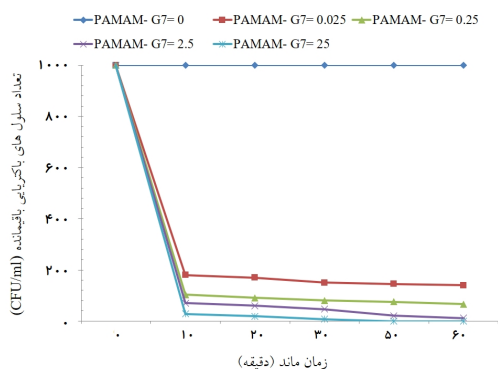
C_1 : غلظت باکتریایی معادل استاندارد نیم‌مک‌فارلند، V_1 : حجم مورد نیاز برای تهیه غلظت باکتریایی برابر 10^3 CFU/ml ، C_2 : غلظت باکتریایی برابر 10^3 CFU/ml ، V_2 : حجمی برابر 40 ml (چهار غلظت نانو دندریمر که هر غلظت به 10 ml آب با غلظت باکتریایی 10^3 CFU/ml انتقال یافت).

حجمی برابر با $40/27 \mu\text{l}$ از غلظت معادل استاندارد نیم‌مک‌فارلند برداشته و توسط آب مقطر استریل شده به حجم 40 ml رسانده شد و رقت باکتریایی برابر 10^3 CFU/ml به‌دست آمد. این عملیات برای هر پنج باکتری مورد مطالعه به‌طور جداگانه انجام گردید. غلظت مورد نظر از نانو دندریمر $(25, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 \mu\text{g/ml})$ به‌وسیله آب مقطر استریل شده به‌روش رقیق‌سازی سریالی تهیه شدند. سپس $50 \mu\text{l}$ از نانو دندریمر PAMAM-G7 در غلظت‌های مختلف و در شرایط کاملاً استریل و در دمای آزمایشگاه ($23-25^\circ \text{C}$) به نمونه آب (حاوی باکتری) اضافه گردید. به‌منظور تعیین کارایی نانو دندریمر در حذف باکتری‌ها، در زمان‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه با استفاده از سواپ نمونه‌برداری انجام و بر روی محیط‌های کشت اختصاصی هر باکتری کشت داده شد. تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده ساخت Merck بود. نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرمخانه‌گذاری شدند و پس از آن تعداد کلنی‌ها شمارش شدند.

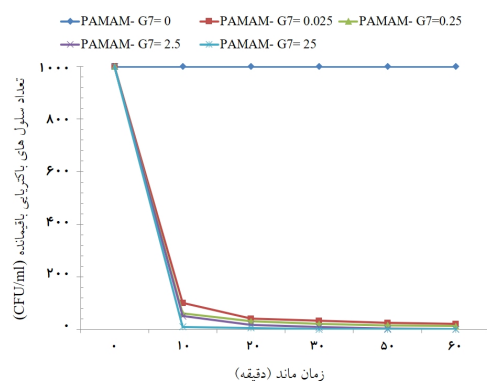
تعداد کل نمونه‌ها با توجه به احتساب سه فاکتور: ۱) غلظت نانو دندریمر، ۲) زمان ماند، ۳) باکتری‌های مورد مطالعه و دو بار تکرار برابر ۲۴۰ عدد به‌دست آمد. تمامی آزمایشات بر اساس دستورکارهای موجود در کتاب آزمایش‌های استاندارد آب و فاضلاب^{۱۹} و دستورکارهای موسسه استاندارد و آزمایشگاه پزشکی (Clinical Laboratory and Standard Institute, CLSI) انجام گردید.^{۱۷} از Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) برای رسم نمودارها استفاده گردید.

یافته‌ها

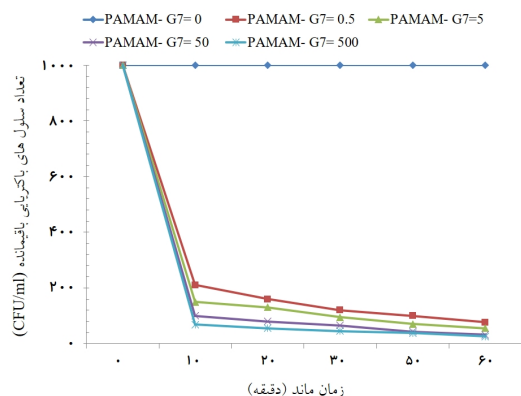
کارایی نانو دندریمر (PAMAM-G7) در



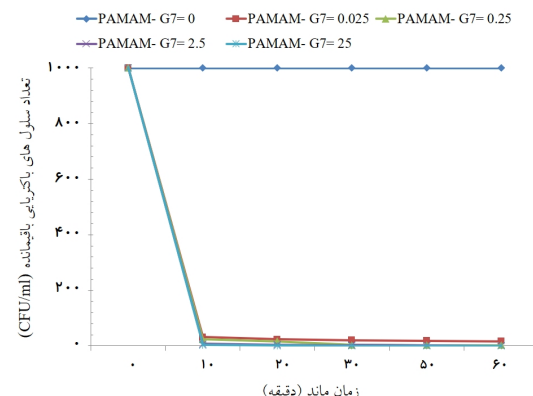
نمودار ۴: تاثیر نانو دندریمر PAMAM-G7 بر تغییرات جمعیت باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا در آب



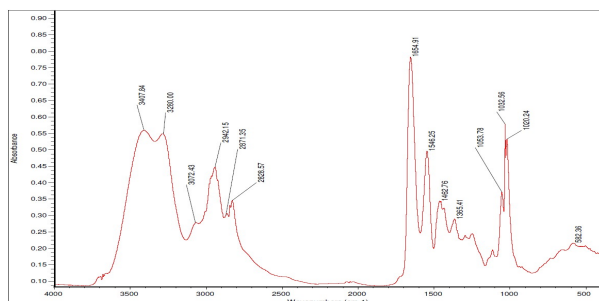
نمودار ۱: تاثیر نانو دندریمر PAMAM-G7 بر تغییرات جمعیت باکتری‌های اشریشیاکلی در آب



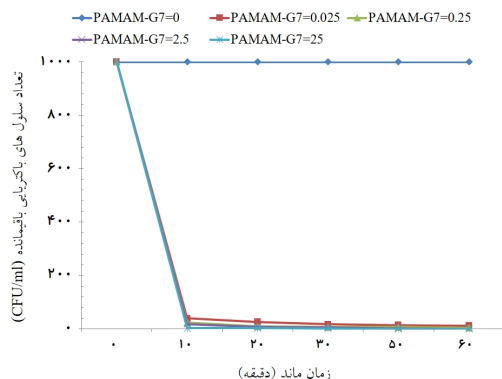
نمودار ۵: تاثیر نانو دندریمر PAMAM-G7 بر تغییرات جمعیت باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس در آب



نمودار ۲: تاثیر نانو دندریمر PAMAM-G7 بر تغییرات جمعیت باکتری‌های کلبسیلا اوکسی توکا در آب



نمودار ۱: طیف‌سنجی تبدیل فوری مادون قرمز (FTIR) نانو دندریمر PAMAM-G7



نمودار ۳: تاثیر نانو دندریمر PAMAM-G7 بر تغییرات جمعیت باکتری‌های پروتئوس میرابیلیس در آب

بحث

دندریمر و زمان تماس، تاثیر ضد باکتریایی نانو دندریمر افزایش یافته و باعث کاهش چشمگیر باکتری‌ها می‌شود. در یک مطالعه‌ای که توسط Charles و همکارانش در مورد خاصیت ضد باکتریایی نانو دندریمرهای PAMAM-G3 بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس انجام شده بود مشخص گردید، با افزایش غلظت نانو دندریمر قطر هاله عدم رشد این باکتری‌ها افزایش می‌یابد.^۹

در مطالعه Miranzadeh و همکارانش، اثر نانو ذرات نقره بر حذف باکتری‌های کلیفرم از آب آلوده بررسی شد، نتایج نشان داد افزایش زمان تماس، باعث حذف بیشتر کلیفرم‌ها می‌شود ($P=0/001$) اما رابطه معناداری بین مقدار نانو نقره و حذف کلیفرم‌ها مشاهده نشد ($P=0/6$). حداکثر حذف ($92/41\%$) در زمان ۱۰۰ دقیقه و غلظت $60 \mu\text{g L}^{-1}$ نانو نقره به دست آمد.^{۲۴} در پژوهش کنونی در زمان ۶۰ دقیقه و غلظت $25 \mu\text{g/ml}$ تمامی باکتری‌ها به جز استافیلوکوکوس اورئوس به صورت 100% حذف شدند. همچنین در غلظت $2/5 \mu\text{g/ml}$ و در زمان ۶۰ دقیقه باکتری‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا و پروتئوس میرابیلیس به طور 100% حذف شدند.

در مطالعه Masoumbeigi و همکاران که در مورد حذف فتوکاتالیستی اشریشیاکلی و استرپتوکوکوس فکالیس از آب به کمک نانوذرات تثبیت شده اکسید روی انجام گردید، نتایج نشان داد که حذف بهینه فتوکاتالیستی برای هر دو باکتری اشریشیاکلی و استرپتوکوکوس فکالیس با شدت تابش $360 \mu\text{W.s/cm}^2$ ، زمان تماس $2-40$ دقیقه و غلظت باکتریایی $100/100 \text{ CFU/ml}$ می‌باشد. کارایی راکتورها با افزایش زمان و شدت تابش افزایش و با افزایش تعداد باکتری‌ها کاهش یافت. همچنین باکتری استرپتوکوکوس فکالیس نسبت به اشریشیاکلی مقاومت بالاتری داشت.^{۲۵} مطالعه انجام شده در مورد اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر پلی پروپیلن ایمین نسل دوم نشان داد که غلظت $0/5 \mu\text{g/ml}$ از این ماده تاثیری بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی و پروتئوس میرابیلیس نداشت و با افزایش غلظت تا $500 \mu\text{g/ml}$ ، باکتری‌هایی مانند اشریشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس را به طور کامل حذف کرد.^{۲۶}

نتایج پژوهش کنونی با این مطالعات مطابقت دارد. پژوهش کنونی نشان داد نانو دندریمر PAMAM-G7 در غلظت‌های پایین تر

پژوهش کنونی نشان داد نانو دندریمر PAMAM-G7 خاصیت ضد باکتریایی بسیار مناسبی بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارد و این تاثیر بر روی باکتری‌های گرم منفی بهتر از باکتری گرم مثبت بود. در مطالعه‌ای با بررسی ضد باکتریایی نانو دندریمر PAMAM-G4 به روش دیسک انتشاری، نشان داده شد که این نانو دندریمر بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس اثر ضد باکتریایی دارد ولی بر روی آنتریباکترکلوکه هیچ گونه اثر ضد باکتریایی ندارد.^{۲۲} در پژوهش دیگر که بر روی اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر PAMAM-G4 انجام گردید، مشخص شد این ماده هیچ گونه خاصیت ضد باکتریایی بر روی سودوموناس آئروژینوزا ندارد.^{۱۱}

همچنین در این مطالعات نشان داده شد، اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G4 بر روی بیشتر باکتری‌ها در غلظت‌های بالاتر اتفاق می‌افتد ($500 \mu\text{g/ml}$).^{۲۳} پژوهش کنونی نشان داد، نانو دندریمر PAMAM-G7 تاثیر ضد باکتریایی بسیار مناسبی داشته و همه باکتری‌های مورد مطالعه را با راندمان بالایی حذف می‌کند. تاثیر ضد باکتریایی بالاتر نانو دندریمر PAMAM-G7 نسبت به نسل‌های پایین تر را می‌توان به تعداد بیشتر گروه انتهایی آمینی آن‌ها نسبت داد. هر چه قدر تعداد گروه انتهایی آمینی بیشتر باشد به همان نسبت خاصیت باکتری‌کشی نانو دندریمر افزایش خواهد یافت. تعداد گروه‌های انتهایی آمینی در نانو دندریمر پلی آمیدوآمین نسل چهارم برابر ۶۴ عدد در حالی که این تعداد در نسل هفتم برابر ۵۱۲ عدد می‌باشد (جدول ۱).^{۲۳}

این گروه‌های عاملی بر روی سطوح سلول باکتریایی جذب شده و از طریق دیوار سلولی نفوذ می‌نمایند. سپس به غشای سیتوپلاسمی متصل شده و آن را متلاشی می‌کنند. در این هنگام الکترولیت‌هایی مانند یون‌های پتاسیم و فسفات و مواد هسته‌ای مانند 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 غشای داخلی و خارجی باکتری‌ها که از طریق گروه‌های انتهایی آمینی صورت می‌گیرد، می‌باشد.^{۲۲} همان‌طور که نمودارهای ۱ تا ۵ نشان می‌دهد با افزایش غلظت نانو

کلر که زمان ماند خیلی پایینی در محلول‌های آبی دارند و پس از چند دقیقه باقیمانده خیلی کمتری از خود به جا می‌گذارند^{۲۸} نانو دندریمر PAMAM-G5 می‌تواند زمان ماند خیلی بالایی در محلول‌های آبی داشته باشند. با توجه به اینکه آلودگی‌های ثانویه در شبکه‌های توزیع آب آشامیدنی در هر لحظه می‌تواند اتفاق بیفتد، بنابراین استفاده از این ماده به دلیل ماندگاری بالای آن به‌عنوان گندزدا می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

بر اساس نتایج این مطالعه نانو دندریمر PAMAM-G7 برای حذف باکتری‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بسیار موثر می‌باشد و حتی در غلظت‌های پایین‌تر نیز اثر ضد باکتریایی مناسبی بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت داشت. در ادامه این پژوهش پیشنهاد می‌شود، با توجه به اینکه نانو دندریمرهای PAMAM سمیت خیلی پایین‌تری بر روی سلول‌های انسانی و حیوانی دارند، بنابراین از این ماده می‌توان به‌عنوان گندزدا در صنعت آب و موارد مشابه استفاده کرد. با این حال استفاده از نانو دندریمر برای گندزدایی آب آشامیدنی نیازمند مطالعات بیشتر و وسیع‌تر است.

سیاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی گروه‌های عاملی دندریمر پلی‌امید و آمین-G7 و تاثیر آن در حذف باکتری‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا، پروتئوس میرابیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس از محلول آبی" مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایران در سال ۱۳۹۴ به کد ۲۷۱۹۲-۱۹۳-۰۵-۹۴ می‌باشد که با حمایت کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران اجرا شده است.

نیز (۰/۰۲۵ μg/ml) خاصیت باکتری‌کشی به‌نسبت مناسبی دارد. به‌احتمال این می‌تواند به‌دلیل خاصیت درخت‌سانی، ساختار منظم و پرشاخه، فضا‌های خالی مابین شاخه‌ها، تعداد زیاد گروه‌های عاملی آمینی انتهایی و ماکرو مولکول بودن نانو دندریمر PAMAM-G7 باشد. این ویژگی‌ها 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 تولیدمثل باکتری‌ها می‌شود.^{۲۲}

در پژوهش کنونی با افزایش زمان تماس کارایی نانو دندریمر در حذف باکتری‌ها به‌طور چشمگیر افزایش یافت (نمودارهای ۱ تا ۵). در مطالعه‌ای که از فرآیند نانو ذرات آهن صفر ظرفیتی برای حذف باکتری اشریشیاکلی استفاده شده بود، یافتند که با افزایش زمان تماس راندمان غیرفعال‌سازی اشریشیاکلی افزایش می‌یابد.^{۲۷} در مطالعه‌ای که توسط IZANLOO و همکارانش در مورد اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر پلی‌پروپیلن ایمن نسل دوم بر روی برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی انجام داده‌اند، مشاهده کردند که با افزایش زمان تماس تعداد باکتری‌ها در محیط آبی کاهش می‌یابد.^{۲۶} پژوهش کنونی نشان داد با افزایش زمان تماس به ۶۰ دقیقه همه باکتری‌ها به‌جز استافیلوکوکوس اورئوس (میزان حذف آن در این زمان ۹۷/۵٪ بود) به‌صورت ۱۰۰٪ حذف شدند. افزایش راندمان حذف باکتری‌ها با افزایش زمان تماس نشان‌دهنده ماندگاری بالای این ماده در محلول‌های آبی می‌باشد. بر خلاف ازن، UV و دی‌اکسید

References

- Diallo MS. Water treatment by dendrimer enhanced filtration. Google Patents; 2008. U.S. Patent No.: US7758755 B2
- Diallo MS, Christie S, Swaminathan P, Johnson JH Jr, Goddard WA 3rd. Dendrimer enhanced ultrafiltration. 1. Recovery of Cu(II) from aqueous solutions using PAMAM dendrimers with ethylene diamine core and terminal NH₂ groups. *Environ Sci Technol* 2005;39(5):1366-77.
- Our Planet, Our Health. Report of the Commission on Health and Environment. Geneva: World Health Organization, 1992.
- Rutala WA, Weber DJ. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2008.
- Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, Alvarez PJ. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Res* 2008;42(18):4591-602.
- Xu P, Zeng GM, Huang DL, Feng CL, Hu S, Zhao MH, et al. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review. *Sci Total Environ* 2012;424:1-10.
- Lee CC, MacKay JA, Fréchet JM, Szoka FC. Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* 2005;23(12):1517-26.
- Esfand R, Tomalia, DA. Laboratory synthesis of poly (amidoamine) (PAMAM) dendrimers. In: Fréchet JMJ, Tomalia DA, editors. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*. New York, NY: John Wiley and Sons; 2001. p. 589-604.

9. Charles S, Vasanthan N, Kwon D, Sekosan G, Ghosh S. Surface Modification of Poly(amidoamine) (PAMAM) Dendrimer as Antimicrobial Agents. *Tetrahedron Lett* 2012;53(49):6670-6675.
10. Khakzar BF, Malek R, Mazaheri F. The effect of dendrimer on cotton dyeability with direct dyes. *Chem Industry Chem Eng Q* 2014;20(3):379-85.
11. Izanloo H, Tashauoei HR, Khazae M, Nazari Sh, Mjidi Gh, Vaziri Rad V, et al. The antimicrobial effects of Polypropylenimine-G2 and Polyamidoamine-G4 Dendrimers on *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*, in vitro experiment. *J Sabzevar Univ Med Sci* 2014;21(5):925-33.
12. Hermanson GT. Bioconjugate Techniques. 3rd ed. New York, NY: Academic Press; 2013. p. 351-86.
13. Diallo MS, Arasho W, Johnson JH Jr, Goddard WA 3rd. Dendritic chelating agents. 2. U(VI) binding to poly(amidoamine) and poly(propyleneimine) dendrimers in aqueous solutions. *Environ Sci Technol* 2008;42(5):1572-9.
14. Strydom SJ, Rose WE, Otto DP, Liebenberg W, de Villiers MM. Poly(amidoamine) dendrimer-mediated synthesis and stabilization of silver sulfonamide nanoparticles with increased antibacterial activity. *Nanomedicine* 2013;9(1):85-93.
15. Chen CZ, Cooper SL. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials* 2002;23(16):3359-68.
16. Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, et al. Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules* 1986;19(9):2466-8.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk diffusion susceptibility tests. 19th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 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. Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), 2005.
20. Divsar F, Ju H. Electrochemiluminescence detection of near single DNA molecules by using quantum dots-dendrimer nanocomposites for signal amplification. *Chem Commun (Camb)* 2011;47(35):9879-81.
21. Priyam A, Blumling DE, Knappenberger KL Jr. Synthesis, characterization, and self-organization of dendrimer-encapsulated HgTe quantum dots. *Langmuir* 2010;26(13):10636-44.
22. Izanloo H, Ahmadi Jebelli M, Nazari S, Safavi N, Tashayoe HR, Majidi G, et al. Studying the antibacterial effect of polyamidoamine-g4 dendrimer on some of the gram-negative and gram-positive bacteria. *Arak Univ Med Sci J* 2014;17(9):1-10.
23. Boas U, Christensen JB, Heegaard PM. Dendrimers: design, synthesis and chemical properties. *J Mater Chem* 2006;16(38):3785-98.
24. Miranzadeh MB, Rabbani D, Naseri S, Nabizadeh R, Mousavi SGA, Ghadami F. Coliform bacteria removal from contaminated water using nanosilver. *KAUMS J (FEYZ)* 2012;16(1):31-5.
25. Masoumbeigi H, Rezaee A, Khataee A, Hashemian J. Photocatalytic removal of *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis* from water using immobilized ZnO nanoparticles. *Qom Univ Med Sci J* 2012;6(4):24-35.
26. Izanloo H, Nazari S, Ahmadi Jebelli M, Alizadeh Matboo S, Tashauoei HR, Vakili B, 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. *Arak Univ Med Sci J* 2015;18(6):8-16.
27. Zarei R, Mosaferi 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):214-223.
28. Chowdhury S, Rodriguez MJ, Sadiq R. Disinfection byproducts in Canadian provinces: associated cancer risks and medical expenses. *J Hazard Mater* 2011;187(1-3):574-84.

Assessment of nanopolyamidoamine-G7 dendrimer antibacterial effect in aqueous solution

Abstract

Received: 15 Mar. 2016 Revised: 15 May 2016 Accepted: 27 Jul. 2016 Available online: 31 Jul. 2016

Mitra Gholami Ph.D.¹
Shahram Nazari Ph.D. Student^{2*}
Mahdi Farzadkia Ph.D.¹
Gharib Majidi M.Sc.³
Soudabeh Alizadeh Matboo
B.Sc.⁴

1- Department of Environmental Health Engineering, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Student Research Committee, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

4- Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

* Corresponding author: Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Hemmat High Way, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 86704633
E-mail: shahramnazari73@yahoo.com

Background: Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimer derivatives have been investigated for their biological applications, especially for delivery of drugs, including antimicrobial drugs to eukaryotic cells, but their effects on bacterial cells are largely unexplored. Nanotechnology and its application is one of the rapidly developing sciences. As demand of fresh drinking water is increasing, nanotechnology can contribute noticeable development and improvement to water treatment process. This study was aimed to examine synthesis and the antibacterial effect of Nanopolyamidoamine-G7 (NPAMAM-G7) dendrimer on *Escherichia Coli* (*E. Coli*), *Klebsiella Oxytoca* (*K. Oxytoca*), *Pseudomonas Aeruginosa* (*P. Aeruginosa*), *Proteus Mirabilis* (*P. Mirabilis*) and *Staphylococcus Aureus* (*S. Aureus*) from aqueous solution.

Methods: In this experimental study that has been conducted in August to December 2015 in the laboratory of microbiology of Iran University of Medical Sciences, initially dilution of 10³ CFU/ml were prepared from each strain of bacteria. Then different concentrations of dendrimer (0.025, 0.25, 2.5 and 25 µg/ml) in the laboratory temperature (23-25 °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, 40, 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 in aqueous solution by increasing the dendrimer concentration and contact time is directly related. At a concentration of 25 µg/ml at 60 minutes all bacteria except *S. Aureus*, and at 30 minutes, *E. Coli* and *K. Oxytoca* bacteria for 100% excluded. The concentration of 2.5 µg/ml at 60 minutes of bacteria, *E. Coli*, *K. Oxytoca* and *P. Mirabilis* are 100% excluded. All concentrations of dendrimers at different times were reduced bacteria in the PAMAM- G7 dendrimer effect on gram-negative bacteria, gram-positive bacteria was better.

Conclusion: The NPAMAM-G7 dendrimer with end amine groups exhibited a positive impact on the removal of standard strains, gram-positive and gram-negative bacteria. Therefore, it is possible to use these nanodendrimers as antibacterial in the future.

Keywords: anti-bacterial agents, gram-negative bacteria, gram-positive bacteria, PAMAM dendrimer.