معرفی فعالیت ضد میکروبی کونژوگه جنتامایسین- نانوذرات طلای بیوژنیک بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

- اعظم آهنگری[1]
- مجتبی صلوتی*[2]
- زهرا حیدری[3]
- بهروز محمدی[1]
- سمیه زارع[1]
- دنا قمری[4]
- جعفر تاران[5]
- زهره فرهمند کیا[6]
- لیلا دولتیاری[7]

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، ایران

۲. دانشیار فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی،واحد زنجان، ایران. saloutim@yahoo.com

۳. دانشجوی دکتری بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی،واحد زنجان، ایران

۴. کارشناس ارشد شیمی معدنی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، ایران

۵. کارشناس ارشد شیمی آلی، دانشکده بهداشت و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران

۶. کارشناس ارشد مهندسی محیط زیست، دانشکده بهداشت و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ایران

۷. کارشناس ارشد شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، دانشکده علوم پایه و پزشکی، گروه شیمی، زنجان، ایران.

چکیده

مقدمه

عفونت های باکتریایی، هم چنان به عنوان یکی از علت های اصلی بیماریزایی و مرگ و میر در بیشتر کشور های دنیا خصوصا در کشورهای در حال توسعه به شمار می روند. در سال های اخیر کونژوگاسیون نانوذرات با آنتی بیوتیک ها، یک رویکرد امید بخش را جهت افزایش اثر درمانی آنتی بیوتیک ها بر روی کانون ها و زخم های عفونی، ایجاد نموده است. هدف از تحقیق حاضر اتصال جنتامایسین به نانوذرات طلای بیوژنیک به منظور بررسی مقایسه ای اثر ضد میکروبی نانوداروی جدید با جنتامایسین آزاد بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می باشد.

روش کار

در این تحقیق نانوذرات طلا به روش بیولوژیک با استفاده از قارچ آسپرژویلوس فلاووس سنتز گردید. تولید نانوذرات طلا با مشاهده تغییر رنگ محلول واکنش، اسپکتروفتومتری UV/vis و میکروسکوپ الکترونی SEM بررسی گردید. غلظت نانوذرات طلای سنتز شده با استفاده از اسپکتروسکوپی جذب اتمی تعیین شد. نانوذرات طلای بیوژنیک تولیدی با جنتامایسین کونژوگه گردید. حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) کونژوگه و جنتامایسین آزاد با روش رقت در براث تعیین و با یکدیگر مقایسه گردید.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که نانوذرات طلا به صورت خارج سلولی، به شکل کروی و در اندازه های ۲۵۰-۲۰۰

Archive of SID

www.SID.ir

نانومتر به روش بیوژنیک تولید شده اند. غلظت نانوذرات طلای بیوژنیک ۲/۶۳ میلی گرم بر لیتر تعیین شد. MIC کونژوگه و جنتامایسین آزاد به ترتیب ۰/۰۱۵۶۲۵ و ۰/۰۳۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر و MBC کونژوگه و جنتامایسین آزاد به ترتیب ۰/۰۳۱۲ و ۰/۰۶۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید که نشان دهنده افزایش اثر ضد میکروبی جنتامایسین کونژوگه شده با نانوذرات طلا نسبت به جنتامایسین آزاد بود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان می دهد که کونژوگاسیون نانوذرات طلای بیوژنیک با جنتامایسین اثر ضد میکروبی جنتامایسین بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* را افزایش می دهد.

کلید واژه ها

استافیلوکوکوس اورئوس، اثر ضد میکروبی، کونژوگه جنتامایسین- نانوذرات طلای بیوژنیک

Methods

In the present study, gold nanoparticles were biologically synthesized using the fungus *Aspergillus flavus*. The production of gold nanoparticles was characterized by observing the color changing of the reaction mixrure, UV-vis spectroscopy and scanning electron microscopy. The concentration of gold nanoparticles was determined by atomic absorption spectroscopy. The biogenic gold nanoparticles were conjugated with gentamicin (1mg/ml concentration). Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of the conjugate and gentamicin was investigated by liquid broth dilution method.

Results

The results showed that gold nanoparticles have been produced extracellular in spherical shape and in the size range of 200-250 nm. The concentration of biogenic gold nanoparticles was determined 2.63 mg/l. It was also found that, based on the liquid broth dilution test. MIC of the conjugate and free gentamicin were 0.015 and 0.0312 mg/ml, respectively and MBC of the conjugate and free gentamicin were 0.312 and 0.0625 mg/ml, respectively that showed the enhancement of antibacterial effect of the conjugate in comparison with free gentamicin.

Conclusion

This study elucidated that conjugation of biogenic gold nanoparticles with gentamicin enhances the antibacterial

Antibacterial efficacy of biogenic gold nanoparticle-gentamicin conjugate on Staphylococcus aureus

- Ahangari A[1]
- **Salouti M*[2]**
- Heidari Z[2]
- Mohammadi B[1]
- Zare S[1]
- Ghamari D[3]
- Taran J[4]
- Farahmandkia Z[4]
- Dolatyari L[5]

Abstract

Introduction

Bacterial infections continue to be one of the major causes of morbidity and mortality in most countries especially in developing countries**.** The use of gold nanoparticles conjugated with antibiotics is a promising approach for enhancement of therapeutic effect of the antibiotics on infecteous wounds and foci. The aim of this study was to bind gentamicin to biogenic gold nanoparticles to evaluate antimicrobial effect of the new nanodrug against *Staphylococcus aureus*.

1. Dept. of Microbiology, Faculty of Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
2. Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran. saloutim@yahoo.com
3. Department of Chemistry, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
4. Zanjan University of Medical Sciences, Faculty of paramedical and Health, Zanjan, Iran
5. Zanjan University of Medical Sciences, Faculty of paramedical and Health, Zanjan, Iran

Archive of SID

www.SID.ir

effect of gentamicin against *Staphylococcus aureus*.

Keywords
Staphylococcus aureus, Antibacterial activity, Gentamicin- biogenic gold nanoparticles conjugate

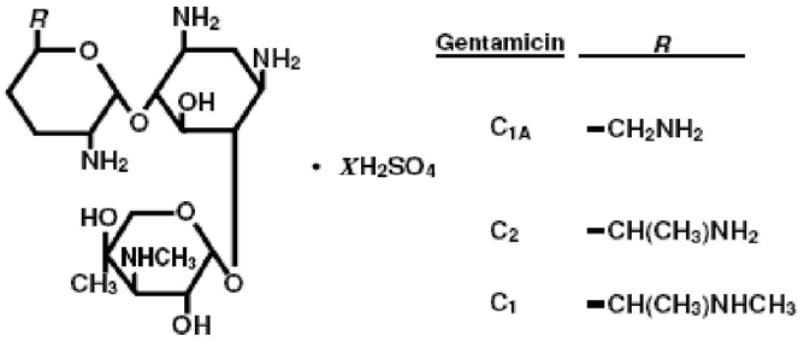
مقدمه و هدف

انتشار سریع و تصاعدی آنتی بیوتیک های مقاوم در برابر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و ارتباط آن ها با میزان مصرف آنتی بیوتیک ها یک نگرانی برای سلامت عمومی و بحران جهانی را ایجاد و مطرح می کند (۱). بنابراین یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید و یا ابداع روش های انتقال داروی جدید با کم ترین اثرات جانبی امری لازم و ضروری می باشد. تقریبا ۶۰ درصد عفونت های بیمارستانی در ایالات متحده آمریکا، ناشی از باکتری های مقاوم چند دارویی می باشند که در این میان، باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس[1]، اشرشیا[2] کولی و سودوموناس آئروژینوزا[3] از اصلی ترین عوامل عفونت و مرگ و میر در میان بیماران مخصوصا بیماران با ضعف سیستم ایمنی محسوب می گردند (۲). در بین این باکتری ها، استافیلوکوکوس اورئوس بسیار حائز اهمیت می باشد. استافیلوکوکوس اورئوس با سرعت و سهولت زیاد نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاوم می شود. دست کم ۹۰درصد از گروه استافیلوکوکوس های منتشر شده در بیمارستان ها نسبت به پنی سیلین مقاومند. این مقاومت به واسطه آنزیم بتا لاکتاماز یا پنی سیلیناز میباشد که باعث شکستن زنجیره بتا لاکتون پنی سیلین می شود (۳). جنتامایسین، آنتی بیوتیکی از دسته آمینوگلیکوزید هاست که در برابر تعداد زیادی از میکروارگانیزم های گرم مثبت و منفی مانند اشرشیاکلی، پروتئوس، سالمونلا و گونه های استافیلوکوک مقاوم به پنی سیلین باکتریواستاتیک است. جنتامایسین ترکیبی از C_1 ، C_1a و انانتیومرهای C_2a ، C_2 است که به وسیله گونه میکرومونوسپورا پورپورا[4] تولید می شود دارای سه گروه NH_2 در ساختار شیمیایی خود می باشد (شکل ۱). طیف سنجی IR از آنتی بیوتیک های آزاد و آنتی بیوتیک های پوشیده با نانوذرات طلا نشان داده است که نانوذرات طلا دارای میل اتصال قوی با گروه های آمین می باشند (۴).

1. S.aureus
2. E.coli
3. Pseudomonasaeruginosa

4. Micromonospora purpurea

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱. ساختار شیمیایی جنتامایسین

نانوذرات طلا دارای سطح کونژوگه مناسب با پروب های مولکولی و آنتی بیوتیکی هستند. کونژوگاسیون این نانوذرات با مولکول های مهم زیستی مانند الیگوساکارید ها، DNA و پروتئین ها از سال ۲۰۰۰ مورد توجه قرار گرفته است و اخیرا جهت نشاندارسازی انواع آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی مانند استرپتومایسین، جنتامایسین و نئومایسین استفاده شده اند (۵). تولید نانوذرات طلا از طریق سیستم های زیستی مخصوصا قارچ ها یکی از بهترین روش های تولید سازگار با طبیعت، به شمار می رود (۶). به همین دلیل در تحقیق حاضر از نانوذرات طلای تولید شده توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس جهت کونژوگاسیون با آنتی بیوتیک جنتامایسین استفاده گردید.

بوری جین (Burygin) و همکارانش در سال ۲۰۰۹، اثر نانوذرات طلا را در حالت ترکیب با جنتامایسین و نه کونژوگه شده بر روی باکتری Escherichia coli K12 بررسی کردند. نتایج تحقیقات ایشان نشان داد که تخریب باکتری تنها وابسته به حضور جنتامایسین بود و نانوذرات طلا به تنهایی فعالیت ضد میکروبی نداشتند و به عنوان حامل دارویی عمل می کردند. بوری جین پیشنهاد کرد که این آزمایش مجددا با کونژوگه جنتامایسین و نانوذرات طلا تکرار شود (۷). از طرف دیگر محمد فیاض (Mohammed Fayaz) و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نانوذرات طلای سنتز شده توسط قارچ Trichoderm viride را به آنتی بیوتیک ونکومایسین متصل کردند و اثر کونژوگه تولیدی را بر روی باکتری اشرشیاکلی بررسی کردند و آنها مشاهده کردند که ونکومایسین اتصال یافته به نانوذرات طلا دارای فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به ونکومایسین تنها بر علیه اشرشیاکلی می باشد (۸). لذا با توجه به مطالعات انجام شده در این زمینه، هدف از تحقیق حاضر اتصال جنتامایسین به نانوذرات طلای بیوژنیک به منظور بررسی اثر ضد میکروبی نانوداروی جدید بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می باشد تا مشخص گردد آیا کونژوگاسیون نانوذرات طلا به جنتامایسین، باعث افزایش اثر این آنتی بیوتیک خواهد شد یا نه.

روش پژوهش

جنتامایسین، عصاره مالت و محلول کلرید طلا از شرکت Sigma Aldrich خریداری گردید. عصاره مخمر از شرکت Liofilchem تهیه گردید. پپتون، گلوکز و محیط های کشت مولر هینتون براث و مولر هینتون آگار از شرکت Merck خریداری گردید.

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، از بیماران بیمارستان آیت ا... موسوی زنجان گردآوری گردید. قارچ آسپرژیلوس فلاووس جدا سازی شده از معدن طلای تکاب، توسط آقای وحید شکوری در اختیار ما گذاشته شد. سنتز نانوذرات طلا به وسیله این قارچ قبلا توسط آقای شکوری و همکارانش در

Archive of SID
www.SID.ir

سال ۱۳۸۹ گزارش و تولید نانوذرات طلا توسط ایشان بهینه سازی شده بوده است (۱۳-۹).

به منظور تولید نانو ذرات طلا، از قارچ آسپرژیلوس فلاووس، بیومس تهیه شد. برای تهیه ی بیومس از پلیت های قارچی تازه رشد کرده داخل ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط MGYP (۰/۳٪ عصاره مالت، ۰/۳درصد عصاره مخمر، ۰/۵درصد پپتون و ۱درصد گلوکز در pH بین ۵-۲) ریخته و ارلن مایر حاوی قارچ و محیط کشت را به مدت ۹۶ ساعت در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه ی سانتی گراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. بیومس قارچی با آب مقطر، توسط سانتریفیوژ یخچال دار با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه، دمای ۱۰ درجه ی سانتی گراد و مدت زمان ۲۰ دقیقه، ۳ بار شستشو داده شد. سپس بیومس قارچی به ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری انتقال داده شد و مقدار ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به داخل ارلن مایر ریخته شد. ارلن مایر حاوی بیومس قارچی، به داخل انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه انتقال داده شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، سوپرناتانت محلول که فاقد محتویات بیومس قارچی است توسط کاغذ واتمن فیلتر گردید. سپس ۲۰ میلی لیتر از سوپرناتانت محلول به ارلن مایر حاوی ۲۰ میلی لیتر کلرید طلا ($HAuCl_4$) ۲ میلی مولار اضافه شد و در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه ی سانتی گراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد و پس از ۷۲ ساعت، تغییرات حاصل بررسی شدند (۱۴، ۸).

در اولین مرحله، تغییر رنگ محلول واکنش بررسی شد. در صورتی که سوپرناتانت محلول، در واکنش با محلول کلرید طلا تغییر رنگ بدهد، بیان گر تولید نانوذرات طلا خواهد بود و مراحل بعدی روی آن انجام خواهد شد (۸، ۷).

پس از مشاهده تغییر رنگ محلول، برای اطمینان خاطر بیشتر برای تایید تولید نانوذرات طلا، از نمونه ی مورد نظر در محدوده ی ۴۰۰ تا ۷۰۰ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV/vis (ساخت شرکت International MAX آمریکا، مدل GENESYSE 5) طیف جذبی تهیه شد. در صورتی که نانوذرات طلا تولید شده باشند، در محدوه طول موجی ۵۱۸ الی ۵۵۰ نانومتر طیف جذبی، پیک مشاهده خواهد شد (۴).

جهت آماده سازی نمونه برای میکروسکوپ SEM مقدار کمی از سوسپانسیون قارچی برای تثبیت اولیه در گلوتارآلدئید ۲/۵درصد به مدت یک ساعت در یخچال گذاشته شد و بعد از این مدت دو بار با بافر فسفات شستشو داده شد، که بار اول ۱۰ دقیقه و بار دوم یک ساعت طول کشید. برای تثبیت ثانویه، نمونه یک ساعت به همراه تتروکسید اسمیوم در دمای اتاق قرار داده شد و بعد از یک ساعت، با بافر فسفات شستشو داده شد. نمونه با الکل هایی با درجات ۲۵، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰×۳ آب گیری و سپس در مجاورت هوا قرار داده شد تا خشک شود. در آخرین مرحله، پوشش نازکی از طلا بر روی نمونه کشیده شد. بعد از آماده سازی نمونه، ابعاد، شکل و محل تولید نانوذرات طلای سنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل SEM, Hitachi-S4160) بررسی گردید (۱۵).

غلظت نانوذرات طلای سنتز شده توسط دستگاه اسپکتروسکوپی جذب اتمی (ساخت شرکت VARIAN، مدل AA240FS) تعیین گردید. جهت تعیین غلظت نانوذرات طلا، محلول اسید سولفوریک به محلول نانوذرات طلای بیوژنیک افزوده شد و در زیر هود بر روی شعله به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد تا نانوذرات طلا به یون طلا تبدیل شوند. سپس رسوب حاصل در مخلوطی از محلول اسید نیتریک و اسید کلریدریک حل گردید. در مرحله بعد محلول در دمای اتاق گذاشته شد تا حلال آن تبخیر گردد، پس از تبخیر حلال به رسوب حاصل به مقدار لازم اسید کلریدریک ۵/۰ نرمال افزوده شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر جذب اتمی غلظت نانوذرات طلای بیوژنیک تعیین گردید (۷).

Archive of SID

www.SID.ir

۱۰ میلی لیتر از نانوذرات طلای بیوژنیک تولید شده به ۵ میلی لیتر جنتامایسین (غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر) افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی همزن قرار داده شد. محلول به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محلول به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصل در آب دیونیزه حل شد (۸).

اسپکتروسکوپی UV/vis یکی از تکنیک های رایج و متداول جهت تائید اتصال نانوذرات طلا به جنتامایسین می باشد. در این بررسی از جنتامایسین، نانوذرات طلای بیوژنیک و کونژوگه جنتامایسین–نانوذرات طلا در محدوده ی ۷۰۰–۲۰۰ نانومتر طیف جذبی تهیه شد و با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/vis اتصال جنتامایسین به نانوذرات طلا بررسی گردید. در صورتیکه نانوذرات طلا به آنتی بیوتیک جنتامایسین متصل شده باشند، شاهد یک شیفت در پیک جذبی خواهیم بود (۴، ۷).

اثر ضد میکروبی کونژوگه جنتامایسین–نانوذرات طلا بر روی استافیلوکوکوس اورئوس به روش انتشار چاهکی در آگار بررسی

گردید. ابتدا بر روی محیط مولر هینتون آگار سوسپانسیون باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با کدورت ۰/۵ مک فارلند در سه جهت مختلف کشت داده شد. سپس سه چاهک با قطر ۵ میلی متر بر روی آگار ایجاد شد. به چاهک ها ۸۰ میکرولیتر جنتامایسین (کنترل)، نانوذرات طلا (کنترل) و کونژوگه جنتامایسین–نانوذرات طلا تلقیح شد. پلیت های تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و در نهایت قطر هاله های عدم رشد باکتری در اطراف چاهک ها اندازه گیری شدند. این آزمایش با سه بار تکرار انجام گردید (۷).

حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده کونژوگه جنتامایسین–نانوذرات طلا بر روی استافیلوکوکوس اورئوس به وسیله روش استاندارد رقت در براث تعیین شد. در این روش، ۱۲ رقت از جنتامایسین با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر (کنترل)، نانوذرات طلا با غلظت ۲/۶۳ میلی گرم بر لیتر (کنترل)، کونژوگه جنتامایسین–نانوذرات طلا در محیط مولر هینتون براث با رقت های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۸، ۱:۱۶، ۱:۳۲، ۱:۶۴، ۱:۱۲۸، ۱:۲۵۶، ۱:۵۱۲، ۱:۱۰۲۴، ۱:۲۰۴۸، ۱:۴۰۹۶ تهیه شد. . سپس ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی با تعداد ۲×۱۰۸ CFU/ml از باکتری مورد مطالعه افزوده شد. یک محیط واجد باکتری و فاقد جنتامایسین و کونژوگه جنتامایسین–نانوذرات طلا به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. تمامی لوله ها به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس تعداد کلونی های استافی با کشت روی نوترینت آگار و بر اساس پروتکل استاندارد شمارش گردید. میزان رشد باکتری در رقت های مختلف با اندازه گیری میزان چگالی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروسکوپی UV/vis بررسی گردید. و MIC و MBC کونژوگه جنتامایسین–نانوذرات طلا تعیین گردید (۷، ۸).

تحقیق حاضر از نوع تجربی بود. کلیه آزمایشات با سه بار تکرار انجام گردید و نتایج پایانی به صورت انحراف معیار± میانگین بیان شده است. آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه در سطح معنی دار α=۰/۰۵ جهت مقایسه نتایج مورد استفاده قرار گرفته است.

یافته‌ها

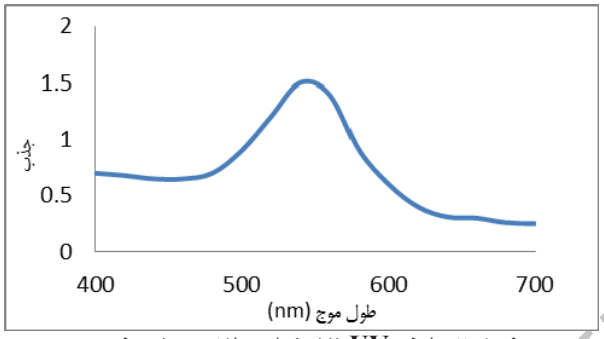
تغییر رنگ محلول واکنش از رنگ زرد به ارغوانی مشاهده شد. این تغییر رنگ به صورت ابتدایی نشان گر احیاء یون های طلا به

تغییر رنگ محلول واکنش از رنگ زرد به ارغوانی مشاهده شد. این تغییر رنگ به صورت ابتدایی نشان گر احیاء یون های طلا به نانوذرات فلزی طلا می باشد. همچنین تولید نانوذرات طلا با نتایج به دست آمده توسط روش های

Archive of SID
www.SID.ir

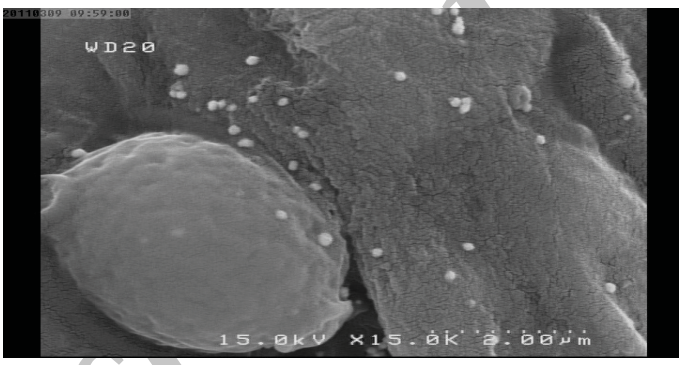
اسپکتروسکوپی UV/vis و میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز تایید گردید.

طیف UV به دست آمده از نمونه ی قارچی آسپرژیلوس فلاووس، بعد از کامل شدن واکنش نشان داد که باند های جذبی قوی در طول موج ۵۴۰ نانومتر متمرکز شده اند که اثبات کننده ی حضور نانوذرات طلا در محلول ارغوانی رنگ می باشد (شکل ۲).



شکل ۲. طیف UV نانوذرات طلای سنتز شده.

مطالعه تصاویر SEM نشان داد که نانوذرات تولیدی دارای شکل کروی بوده و اندازه آن ها بین ۲۰۰ تا ۲۵۰ نانومتر می باشد. این تصاویر نشان می دهد که نانوذرات طلا به صورت خارج سلولی تولید شده اند (شکل ۳).

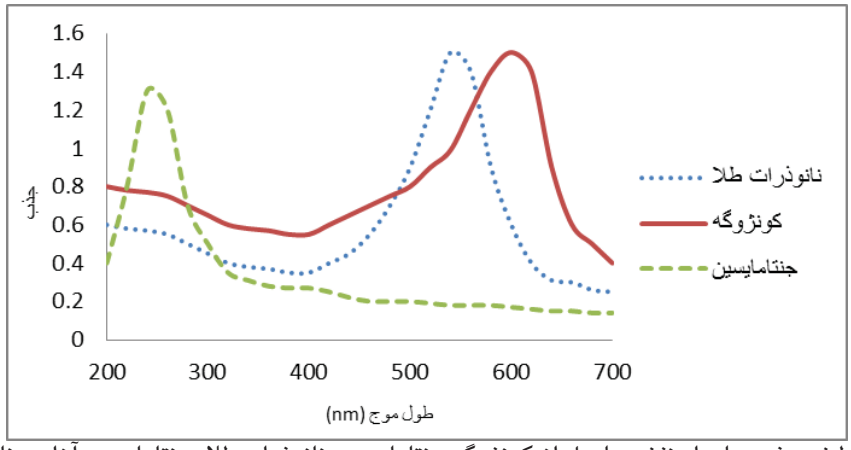


شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی حاصل از توده زیستی قارچ آسپرژیلوس فلاووس. همان طور که مشاهده می شود نانوذرات به شکل کروی در خارج از سلول قارچ و در اندازه های ۲۵۰-۲۰۰ نانومتر تولید شده اند.

جهت تعیین غلظت نانوذرات طلا از دستگاه جذب اتمی استفاده گردید. غلظت نانوذرات طلای بیوژنیک با استفاده از منحنی استاندارد ۲/۶۳ میلی گرم بر لیتر تعیین گردید.

نانوذرات طلای بیوژنیک و جنتامایسین به ترتیب در طول موج ۵۴۰ و ۲۴۵ نانومتر دارای جذب می باشند. در نتیجه اتصال نانوذرات طلا به جنتامایسین این دو پیک ناپدید شده و پیک جدیدی در طول موج ۶۰۰ نانومتر نمایان گردید (شکل ۴) که حاکی از اتصال نانوذرات طلا به آنتی بیوتیک جنتامایسین می باشد (۴).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴.طیف جذبی ماوراءبنفش حاصل از کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا، جنتامایسین آزاد و نانوذرات طلای بیوژنیک.

همان طوریکه در شکل ۵ مشاهده می شود در چاهک واجد نانوذرات طلا هاله عدم رشد باکتری بسیار ناچیز است. همچنین اختلاف معنی داری در محیط آگار مابین اندازه هاله عدم رشد باکتری مربوط به چاهک جنتامایسین و چاهک کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا مشاهده نشد. میانگین قطر هاله عدم رشد در کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا ۱/۶±۱۱ میلی متر و در جنتامایسین۱/۸ ±۱۳ میلی متر بود ($p<0.05$).

شکل ۵. نتایج به دست آمده از قطر هاله عدم رشد بر روی استافیلوکوکوس اورئوس. چاهک ۱ جنتامایسین، چاهک ۲ کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا، چاهک ۳ نانوذرات طلا.

نتایج آزمایش رقت در براث در جدول ۱ نشان داده شده است. MIC جنتامایسین در رقت ۱:۳۲ و MBC جنتامایسین در رقت ۱:۱۶ بر روی استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. MIC کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا در رقت ۱:۶۴ و MBC کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا در رقت ۱:۳۲ بر روی استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. نانوذرات طلا از اولین رقت که ۱:۲ است دارای کدورت بودند و به تنهایی فاقد اثر مهاری رشد بر روی استافیلوکوکوس اورئوس بودند. نتایج جدول ۱ نشان داد که اثر ضد میکروبی کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا نسبت به جنتامایسین آزاد در روش رقت در براث بر روی استافیلوکوکوس اورئوس افزایش یافته است.

جدول ۱ - میزان MIC و MBC جنتامایسین و کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر

نمونه مورد نظر	MIC	MBC
جنتامایسین mg/ml	۰/۰۳۱۲	۰/۰۶۲۵
کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا mg/ml	۰/۰۱۵۶۲۵	۰/۰۳۱۲

بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئوس، به دلیل قدرت بیماری زایی بالقوه و مقاومت روز افزون در برابر داروهای ضد میکروبی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم در

Archive of SID
www.SID.ir

جهان تبدیل شده است. بنابراین جلوگیری از بروز عفونت های ناشی از این باکتری و ریشه یابی کانون های انتشار آن در بیمارستان ها از مسائل ضروری است (۳). نانوذرات طلا به دلیل ویژگی های نوری، پایداری شیمیایی و توانایی کونژگاسیون با طیف وسیعی از مولکول ها مورد توجه قرار گرفته اند. در موارد درمانی نانوذرات طلا با عوامل ضد میکروبی و آنتی بادی ها کونژوگه شده اند و این داروهای کونژوگه فعالیت ضد میکروبی بیشتری را در مقایسه با داروهای غیر کونژوگه نشان داده اند. مکانیسم این فرایند کاملا مشخص نیست. امکان دارد که در نتیجه اتصال و نفوذ داروهای کونژوگه به درون سلول هدف باشد (۱۶). در تحقیق حاضر نانوذرات طلا به روش زیستی با استفاده از قارچ آسپرژیلوس فلاووس به دلیل کاهش هزینه تولید و دوست دار محیط زیست بودن نسبت به روش های شیمیایی سنتز شدند. این قارچ آنزیمی را تولید می کند که قادر است نانوذرات طلا را از محلول $HAuC_{l4}$ تولید کند. آسپرژیلوس فلاووس جداسازی شده در این تحقیق، قادر است در مدت ۱۲ ساعت یون طلا را به طلای فلزی تبدیل نموده و به صورت خارج سلولی ذخیره کند. سپس تولید نانوذرات طلا با مشاهده تغییر رنگ محلول واکنش و با استفاده از اسپکتروسکوپی UV/vis و میکروسکوپ الکترونی روبشی به اثبات رسید. در مرحله بعد نانوذرات طلای بیوژنیک با جنتامایسین کونژوگه گردید و اثر ضد میکروبی جنتامایسین و کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا بر روی استافیلوکوکوس اورئوس بررسی و مقایسه گردید. نتایج آزمایش انجام شده به روش رقت در براث نشان داد که اثر ضد میکروبی کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا نسبت به جنتامایسین آزاد افزایش یافته است. گر چه آزمایش بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات طلا به روش انتشار چاهکی و رقت در براث نشان داد که نانوذرات طلا به تنهایی اثر ضد میکروبی ندارند، با این وجود به نظر می رسد نانوذرات طلا اثر ضد میکروبی جنتامایسین را افزایش می دهند که احتمالا یک دلیل آن می تواند این باشد که نانوذرات طلا به عنوان یک حامل دارویی عمل کرده و جنتامایسین را به محل عفونت منتقل کرده اند. همچنین نتایج آزمایش انتشار چاهکی در آگار نشان داد که اختلاف معنی داری مابین قطر هاله عدم رشد مربوط به چاهک جنتامایسین و چاهک کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا وجود ندارد که امکان دارد علت این پدیده قابلیت انتشار محدود نانوذرات طلا در محیط آگار باشد. نیرمالا گرس (Nirmala Grace) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ سه آنتی بیوتیک استرپتومایسین، جنتامایسین و نئومایسین را با نانوذرات طلا مخلوط کردند و اثر ضد میکروبی ترکیب نانوذرات طلا با آنتی بیوتیک ها را بر روی باکتری های گرم مثبت و منفی مانند Micrococcus luteus, E. coli, Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus بررسی کردند. نتایج تحقیق ایشان نشان داد که ترکیب نانوذرات طلا با آنتی بیوتیک ها اثر ضد میکروبی موثری در مقایسه با آنتی بیوتیک های آزاد دارند که قابل مقایسه با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مبنی بر افزایش اثر کونژوگه نسبت به جنتامایسین به تنهایی است (۴). جیو (Gu) و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۰ نانوذرات طلا را با ونکومایسین کونژوگه کردند آنها نیز مشاهده کردند که فعالیت ونکومایسین کونژوگه با نانوذرات طلا بر علیه انتروکوکوک های مقاوم به ونکومایسین (Enterococcus faecalis,Enterococcus faecium) نسبت به ونکومایسین آزاد ۵۰ برابر افزایش یافته بود. (۱۶). در مقایسه با کار جیو در تحقیق حاضر نیز افزایش اثر ضد میکروبی جنتامایسین بعد از اتصال به نانوذرات طلا بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده گردید. سلواراج (Selvaraj) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ داروی ضد سرطانی ۵-فلورویوراسیل را به نانوذرات طلا متصل نمودند. سپس اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی این کونژوگه را بر علیه Staphylococcus aureus, , Pseudomonas aeruginosa, E.coli ,

Archive of SID

www.SID.ir

Aspergillus niger , Aspergillus fumigates مورد بررسی قرار دادند، نتایج تحقیقات آنها نشان داد که کونژوگه ۵-فلورویوراسیل-نانوذرات طلا تاثیر ضد میکروبی معنی داری را بر علیه رنج وسیعی از قارچ ها و باکتری ها در مقایسه با ۵-فلورویوراسیل به تنهایی دارد. مشابه با کار سلواراج افزایش اثر ضد میکروبی کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا نیز در مقایسه با جنتامایسین تنها در این تحقیق به دست آمد (۱۷). رزماری (Rosemary) و همکارانش در سال ۲۰۰۶ سیپروفلوکساسین را با نانوشل های طلا کونژوگه کردند و مشاهده کردند که کونژوگه اثر ضد میکروبی معنی داری را در مقایسه با سیپروفلوکساسین آزاد بر علیه باکتری E.coli دارد. نتایج مشابهی با کار ایشان در تحقیق حاضر در تاثیر بیشتر کونژوگه نانوذرات طلا با جنتامایسین نسبت به آنتی بیوتیک تنها بر روی استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمد (۱۸). سحا (Saha) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ سه آنتی بیوتیک آمپی سیلین، استرپتومایسین و کانامایسین را با نانوذرات طلا کونژوگه کردند. سپس اثر ضد میکروبی این کونژوگه ها را بر روی Escherichia coli, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus بررسی نمودند. آنها مشاهده کردند که میزان MIC استرپتومایسین و کانامایسین کونژوگه با نانوذرات طلا نسبت به آنتی بیوتیک آزاد به طور معنی داری کاهش یافته است. آمپی سیلین کونژوگه با نانوذرات طلا کاهش ناچیزی را در میزان MIC در مقایسه با آمپی سیلین آزاد نشان داد. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که آنتی بیوتیک های کونژوگه شده با نانوذرات طلا اثر ضدمیکروبی بیشتری بر روی میکروارگانیسم ها دارند و می توانند کاربردهای درمانی بالایی داشته باشند (۵). در مقایسه با کار سحا نتایج مشابهی در کاهش میزان MIC کونژوگه جنتامایسین- نانوذرات طلا نسبت به جنتامایسین آزاد مشاهده گردید که مبنی بر افزایش اثر ضد میکروبی آنتی بیوتیک کونژوگه شده می باشد. ویلیامز (Wiliams) و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که نانوذرات طلا به تنهایی اثر منفی بر روی رشد یا فعالیت باکتری ها ندارند در حالی که کونژوگه ونکومایسین با نانوذرات طلا اثر بازدارنده بر روی رشد باکتری ها دارد (۱۹). با توجه به کار ویلیامز در این تحقیق نیز مشاهده گردید که نانوذرات طلا فاقد اثر ضد میکروبی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس می باشند در حالیکه در ترکیب با جنتامایسین به عنوان حامل دارویی عمل کرده و اثر مهاری بر روی باکتری داشتند. داس (Das) و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نانوذرات طلا را به میسلیوم قارچ Rhizopus oryzae متصل نمودند سپس مشاهده کردند که این میسلیوم های متصل به نانوذرات طلا اثر ضد میکروبی قوی تری بر روی باکتری های E. coli, aeruginosa, S. P. aureus, Bacillus subtilis داشتند. در حالیکه میسلیوم های آزاد فاقد چنین اثر ضد میکروبی بودند. با توجه به کار داس می توان نتیجه گرفت که نانوذرات طلا به عنوان حامل دارویی عمل کرده اند. چنین نتیجه ای در تحقیق حاضر نیز مشاهده گردید (۲۰).

با توجه به نتایج تحقیقات انجام شده در این زمینه به نظر می رسد که کونژوگه نانوذرات طلا با آنتی بیوتیک تحت مکانیسم خاصی وارد سلول هدف در باکتری ها شده و باعث مهار فرایندهای سلولی باکتری می شود. با توجه به عدم مشاهده اثر ضد میکروبی برای نانوذرات طلا به تنهایی احتمالا حضور نانوذرات طلا یا با تقویت اثر ضد میکروبی آنتی بیوتیک ها یا با حمل دارو به محل عفونت باعث تخریب هر چه بیشتر باکتری ها می شوند. نتایج این مطالعه نشان داد که کونژوگه جنتامایسین-نانوذرات طلا دارای اثر ضد میکروبی بیشتری از جنتامایسین آزاد بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Zharov V, Mercer K, Galitovskaya E and Smeltzer M. Photothermal Nanotherapeutics and Nanodiagnostics for Selective Killing of Bacteria Targeted with Gold Nanoparticles. Biophysical Journal 2006; 90: 619–627.
2. Norman R, Stone J, Gole A, Murphy C. Targeted Photothermal Lysis of the Pathogenic Bacteria *Pseudomonas aeruginosa* with Gold Nanorods. Journal of Nano letters 2008; 8:302-306.
3. Wilson M and Yianni C. KiIIing of methiciIIin - resistan t *Staphylococcus aureus* by low-power laser light. Journal of Medical Microbiology 1995; 42: 62-66.
4. Nirmala GA, Pandian K. Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles- a brief study. Journal of Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 2007; 297: 63–70.
5. Saha B, Bhattacharya J and Mukherjee A. In Vitro Structural and Functional Evaluation of Gold Nanoparticles Conjugated Antibiotics. Journal of Nanoscale Research Letters 2007; 2: 614–622.
6. Marie-Christin D, Didier A. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, qunantum-size-related properties and applications toward biology, catalysis and nanotechnology. Journal of Chemical Reviews 2004; 104(1): 293-346.
7. Burygin GL, Khlebtsov BN, Shantrokha AN, Dykman LA, Bogatyrev VA. Khlebtsov NG. On the Enhanced Antibacterial Activity of Antibiotics Mixed with Gold Nanoparticles. Journal of Nanoscale Research Letters 2009; 4(8): 794–801.
8. Fayaz M, Girilal M, Mahdy S, Somsundar SS, Venkatesan R, Kalaichelvan PT. Vancomycin bound biogenic gold nanoparticles: A different perspective for development of anti VRSA agents. Journal homepage Process Biochemistry 2011; 46636-641.
9. Avinash I, Mahendra R, Aniket G, Manisha B. Fusariumsolani: a novel biological agent for the extracellular synthesis of silver nanoparticles. Journal of Nanoparticle Research 2009; 11: 2079-2085.
10. Sheikhloo Z, Salouti M, Katiraee F. Biological Synthesis of Gold Nanoparticles by Fungus *Epicoccum nigrum.* Journal of Cluster Science 2011; 22: 661-665.
11. Kuster E, Williams ST. Selection of media for isolation of Streptomyces sp. Nature journal 1964; 202: 928-929.
12. Shankar SS, Sastry M, Absar A, Pasricha R, Islam KM, Kumar R. Immobilization of biogenic gold nanoparticles in thermally evaporated fatty acid and amine thin films. Journal of Colloid and Interface Science 2004; 247(1): 69-75.
13. Shiying H, Zhirui G, Zhang Y, Zhang S, Wang J, Ning G. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas* capsulate. Journal of Materials Letters 2007; 61: 3984-3987.
14. Karbasian M, Atyabi SM, Siadat SD, Momen SB and Norouzian D. Optimizing Nano-silver Formation by *Fusarium oxysporum* PTCC 5115 Employing Response Surface Methodology. American Journal of Agricultural and Biological Science 2008; 3(1): 433-437.
15. Ranjbar Z, Pazouki M, Halek FS. Investigation of culture condition for biosynthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus fumigates*. Iranian Journal of Biotechnology 2010; 8(1): 56-61.
16. Gu H, Tong E, Wang L and Xu B. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. Journal of Nano letters 2003; 3: 1261–1263.
17. Selvaraj V and Alagar M. Analytical detection and biological assay of antileukemic drug 5-fluorouracil using gold nanoparticles as probe. International Journal of Pharmacology 2007; 337: 275–281.
18. Rosemary MJ, Maclaren L and Pradeep T. Investigations of the antibacterial properties of ciprofloxacin and SiO_2. Journal of Langmuir 2006; 22; 10125–10129.
19. Williams DN, Ehrman SH, Holoman TRP. Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles.

Archive of SID
www.SID.ir

Journal of Nanobio technology 2006; 4(3): 1477-3155.
20. Das SK, Das AR, Guha AK, Gold nanoparticles: microbial synthesis and application in water hygiene management. Journal of Langmuir; 2009; 25: 8192–8199.

Archive of SID

www.SID.ir