

## Application of the Nano Polyamidoamine –G5 (NPAMAM-G5) Dendrimer in Removal of *Escherichia Coli*, *Klebsiella Oxytoca*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Proteus Mirabilis* and *Staphylococcus Aureus* from Aqueous Medium

Sharam Nazari<sup>1</sup>, Sajad Ashkani<sup>2</sup>, Hadi Yosefzadeh<sup>2</sup>, Fazel Aghaei<sup>2</sup>, Gharib Majidi<sup>1</sup>, Aziz Kamran<sup>3</sup>, Peyman Azghani<sup>4</sup>, Ayoob Rastegar<sup>5</sup>, Zohreh Nazari<sup>6</sup>, Soodabeh Alizadeh Matboo<sup>7\*</sup>

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

2- BS in Environmental Health, Student Research Committee, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Health Education, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

4- MSc, Department of Bacteriology, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

5- MSc, Department of Environmental Health Engineering, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

6- BS in Nursing, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

7- BS in Environmental Health, Student Research Committee, Faculty of Health, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

Received: 29 Aug 2015, Accepted: 4 Nov 2015

### Abstract

**Background:** Dendrimers are macromolecules with regular three-dimensional structure that have many branches. The aim of this study was to investigate the efficiency of Nano Polyamidoamine–G5 (NPAMAM-G5) dendrimers in removal of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus aureus* from aqueous solution.

**Materials and Methods:** In this experimental study, initially, dilution of 10<sup>3</sup> CFU/ml was prepared from each strain of bacteria. Then, different concentrations of dendrimers (0.025, 0.25, 2.5 and 25 µg/ml) in the ambient 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, 50 and 60 min) and were cultured on nutrient agar medium. Samples were incubated for 24 hours at 37 ° C and then the number of colonies was counted.

**Results:** There is a direct relation between antibacterial properties of dendrimers in aqueous solution and increasing the dendrimer concentration and contact time. At a concentration of 25 µg/ml and 60 minutes, all kinds of bacteria except *Staphylococcus aureus*, and at 30 minutes, *E. coli* and *Klebsiella* bacteria, were removed by 100% The concentration of 2.5 µg/ml at 60 minutes of bacteria, *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Proteus mirabilis*, 100% Were removed. All concentrations of dendrimer at different times were reduced bacteria.

**Conclusion:** Results of this study indicated that NPAMAM–G5 dendrimer is able to remove *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* and *Staphylococcus aureus* from aqueous solution.

**Keywords:** Bacteria, Antibacterial properties, Aqueous solution, Nano Polyamidoamine–G5 Dendrimer

\*Corresponding Author:

Address: Student Research Committee, Faculty of Health, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.  
Email: Soudabehalizadeh@ymail.com

## کاربرد نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G5 در حذف باکتری‌های اشرشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس از محیط آبی

شهرام نظری<sup>۱</sup>، سجاد اشکانی<sup>۲</sup>، هادی یوسف زاده<sup>۳</sup>، فاضل آقایی<sup>۴</sup>، غریب مجیدی<sup>۱</sup>، عزیز کامران<sup>۳</sup>، پیمان آذغانی<sup>۵</sup>، ایوب رستگار<sup>۶</sup>،  
 زهره نظری<sup>۱</sup>، سودابه علیزاده متبوع<sup>۷\*</sup>

۱- کارشناس ارشد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

۲- کارشناس بهداشت محیط، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده علوم پزشکی خلخال، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

۳- استادیار، گروه آموزش بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

۴- کارشناس ارشد، گروه باکتری‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

۵- کارشناس ارشد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران.

۶- کارشناس پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

۷- کارشناس بهداشت محیط، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۱۳

### چکیده

**زمینه و هدف:** دندریمرها ماکرومولکول‌های دارای ساختار سه بعدی، منظم و پرشاخه‌اند. هدف از انجام این تحقیق بررسی کارایی دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G5 در حذف باکتری‌های اشرشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس از محلول آبی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ابتدا از هر سویه باکتری رقت ۱۰<sup>۳</sup> واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس غلظت‌های مختلفی (۰/۲۵، ۰/۵، ۲/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از دندریمر در دمای آزمایشگاه (۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد) به نمونه آب اضافه شد. به منظور تعیین کارایی دندریمر در حذف باکتری‌ها، نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف (صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه) صورت گرفت و نمونه‌ها بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند و پس از آن تعداد کلنی‌ها شمارش شدند.

**یافته‌ها:** خاصیت ضد باکتریایی دندریمر در محیط آبی با افزایش غلظت دندریمر و زمان تماس، رابطه مستقیم دارد. در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در زمان ۶۰ دقیقه تمامی باکتری‌ها به جز استافیلوکوکوس اورئوس و در زمان ۳۰ دقیقه باکتری‌های اشرشیاکلی و کلبسیلا اوکسی توکا، به صورت ۱۰۰ درصد حذف شدند. همچنین در غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در زمان ۶۰ دقیقه باکتری‌های اشرشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا و پروتئوس میرابیلیس به طور ۱۰۰ درصد حذف شدند. تمامی غلظت‌های دندریمر در زمان‌های مختلف باعث کاهش تمامی باکتری‌ها شدند.

**نتیجه گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G5 قادر به حذف اشرشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس از محلول آبی می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** باکتری‌ها، خاصیت ضدباکتریایی، محلول آبی، نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین-G5

\*نویسنده مسئول: ایران، اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده بهداشت، کمیته تحقیقات دانشجویی

Email: Soudabehalizadeh@ymail.com

## مقدمه

یون‌های بروماید موجب تشکیل برومات می‌گردد. دی اکسید کلر می‌تواند منجر به تشکیل کلریت شود. استفاده از کلر آمین، ازن و دی اکسید کلر پر هزینه‌تر از کلر است. ممکن است ازن و دی اکسید کلر نتوانند شبکه توزیع آب را به اندازه کافی در برابر میکروب‌های بیماری‌زا محافظت نمایند (۸). یافتن روش‌های جایگزین که بتوانند بدون تولید محصولات جانبی گند زدایی، کارایی بالایی در حذف میکروب‌های بیماری‌زا داشته باشند ضروری است. نانو ذرات موجب تشکیل محصولات جانبی گند زدایی نمی‌شوند. نانو ذرات علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت خاصیت ضد باکتریایی بسیار خوبی دارند (۹). برخی از نانوذرات که بر علیه میکروارگانیسم‌های موجود در آب آشامیدنی دارای خاصیت ضدباکتریایی می‌باشند شامل نانو ذرات آهن صفر ظرفیتی (۱۰)، نانو ذرات نقره، نانو لوله‌های کربنی، دی اکسید تیتانیوم و دندریمر هستند (۱۱-۱۴). دندریمرها از یک هسته مرکزی، واحدهای سه بعدی به صورت شاخه درخت و گروه‌های سطحی یا عاملی تشکیل شده‌اند. از ویژگی‌های منحصر به فرد ساختارهای دندریمری می‌توان به گروه‌های فعال انتهایی چند کاره، ساختار منظم و پرشاخه و فضاهای خالی مابین شاخه‌ها اشاره نمود (۱۲). دندریمرها در نسل سوم، ابعادی در حد هورمون انسولین دارند و در پنجمین نسل می‌توان آن‌ها را با پروتئین انتقال دهنده اکسیژن (هموگلوبین) مقایسه کرد. گروه‌های سطحی یا عاملی که به مولکول‌های دندریمر متصل می‌شوند بسیار متنوع می‌باشند. این گروه‌ها شامل آمین، کربوکسیلات، هیدروکسیل و متیل استر هستند (۱۴، ۱۵). نانوپلیمرهای دندریتیکی می‌توانند گستره‌ی وسیعی از حل شونده‌ها در آب را کپسوله نمایند. این حل شونده‌ها شامل کاتیون‌ها (از قبیل مس، نقره، طلا و اورانیوم)، آنیون‌ها (از قبیل پرکلرات، نترات و فسفات) و ترکیبات آلی (از قبیل داروها و آفت‌کش‌ها) می‌باشند. لایه‌های داخلی دندریمر به دلیل خاصیت هیدروفوبیک می‌توانند ترکیبات آلی را جذب نمایند. شاخه‌های خارجی دندریمرهایی که دارای گروه انتهایی هیدروکسیل یا آمین باشند قادرند فلزات سنگین را

کمیاب منابع آب هم از نظر کیفی و هم از نظر کمی تهدیدی جدی برای جمعیت دنیا به ویژه برای کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود. ۱۳ درصد از جمعیت جهان هنوز به منابع آب سالم دسترسی ندارند (۱). باکتری‌ها پروکاریوت‌های تک سلولی بوده و به دلیل ایجاد بیماری، طعم و بو، خوردگی و انسداد لوله‌ها در آب از اهمیت زیادی برخوردارند. در سرتا سر جهان روزانه بیش از ۴۵۰۰ مرگ کودکان زیر ۱۴ سال به علت بیماری‌های ناشی از آب رخ می‌دهد (۲). در کشورهای در حال توسعه، سالانه ۳/۴ میلیون نفر در اثر بیماری‌های ناشی از آب می‌میرند (۳). بنابراین گندزدایی آب برای از بین بردن میکروب‌های بیماری‌زا ضروری می‌باشد. یک گندزدای ایده آل بایستی ویژگی‌هایی از قبیل خاصیت ضد باکتریایی گسترده در دمای محیط و در زمان کوتاه، عدم تولید محصولات جانبی گندزدایی مضر برای سلامتی در طی استفاده و بعد از استفاده، قیمت ارزان، ذخیره سازی و استفاده آسان، حلالیت بالا در آب و عدم خوردگی داشته باشد (۴). در اکثر تصفیه‌خانه‌ها برای گندزدایی آب معمولاً از کلر یا مشتقات آن استفاده می‌شود. کلرزنی روشی جا افتاده، قابل اطمینان و پیشرفته است. ولی تشکیل تری‌هالومتان‌ها و سلامتی مردم مهم‌ترین نگرانی مهندسان و مردم از این ماده است. هم‌چنین در طی فرآیند گندزدایی واکنش بین کلر و ترکیبات آلی طبیعی منجر به تولید انواع مختلفی از محصولات جانبی گندزدایی از قبیل هالواستیک اسیدها، هالواستونیتریل‌ها، هالوکتون‌ها و نیتروزو دی متیل آمین‌ها می‌شود. وجود محصولات جانبی گندزدایی در آب آشامیدنی، احتمال ابتلا به سرطان را در انسان افزایش می‌دهد. تماس پوستی با محصولات جانبی گندزدایی نیز ممکن است موجب سرطان‌زایی شود (۵، ۶). کلر آمین، ازن و دی اکسید کلر از دیگر روش‌های گندزدایی جایگزین می‌باشند. کلر آمین نسبت به کلر یک گندزدای ضعیف‌تر می‌باشد و منجر به تشکیل محصولات جانبی گندزدایی سمی‌تر مانند N نیتروزو دی متیل آمین‌ها (NDMA) می‌شود (۷). ازن در حضور

مرکز پژوهش‌های صنعتی ایران خریداری گردید. تمامی باکتری‌ها قبل از استفاده در محیط کشت نوترینت براث و در شرایط هوای برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. آب مورد استفاده به وسیله اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه) استریل شد. از هر سویه باکتری رقت  $10^3$  واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی‌لیتر (CFU/ml) تهیه شد. برای تهیه رقت باکتریایی  $10^3$  CFU/ml، ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری، غلظت معادل استاندارد نیم مک فارلند تهیه گردید و با توجه به این که غلظت باکتریایی نیم مک فارلند برابر با  $10^8 \times 1/5$  باکتری در هر میلی‌لیتر می‌باشد، از رابطه ۱ برای به دست آوردن رقت باکتریایی  $10^3$  CFU/ml استفاده گردید.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad (1)$$

$C_1$ : غلظت باکتریایی معادل استاندارد نیم مک فارلند،  $V_1$ : حجم مورد نیاز برای تهیه غلظت باکتریایی برابر  $10^3$  CFU/ml،  $C_2$ : غلظت باکتریایی برابر  $10^3$  CFU/ml،  $V_2$ : حجمی برابر ۴۰ میلی‌لیتر (چهار غلظت دندریمر که هر غلظت به ۱۰ میلی‌لیتر آب با غلظت باکتریایی  $10^3$  CFU/ml انتقال یافت). حجمی برابر با  $0/27$  میکرولیتر را از غلظت معادل استاندارد نیم مک فارلند برداشته و به کمک آب مقطر استریل شده به حجم ۴۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم و رقت باکتریایی برابر  $10^3$  CFU/ml را به دست می‌آوریم. این عملیات برای هر ۵ باکتری مورد مطالعه به طور جداگانه انجام گردید.

غلظت محلول مادر دندریمر NPAMAM-G5 برابر ۱ درصد بود. غلظت مورد نظر از دندریمر (۰/۲۵)، ۰/۲۵، ۲/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به وسیله آب مقطر استریل شده به روش رقیق سازی سریالی تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از دندریمر NPAMAM-G5 در غلظت‌های مختلف و در شرایط کاملاً استریل و در دمای آزمایشگاه (۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) به نمونه آب اضافه گردید. به منظور تعیین کارایی دندریمر در حذف باکتری‌ها، نمونه‌برداری در زمان‌های صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه انجام گرفت و بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد.

حذف نمایند. نانو ذرات دندریمر می‌توانند به باکتری‌ها و ویروس‌ها متصل شوند و آن‌ها را غیرفعال نمایند (۱۶). دو دسته از پرکاربردترین دندریمرها پلی آمیدوآمین و پلی پروپیلن ایمین می‌باشند که به صورت تجاری هم وجود دارند (۱۷). دندریمرهای پلی آمیدوآمین دارای گروه انتهایی آمینی می‌باشند که بر روی سطوح سلول باکتریایی جذب شده و از طریق دیوارسلولی نفوذ می‌نمایند، سپس به غشاء سیتوپلاسمی متصل شده و غشاء سیتوپلاسمی را متلاشی می‌کنند (۱۲). دندریمرها به دلیل شباهت داشتن به برخی از پروتئین‌های بدن، سمیت خیلی کمتری را برای سلول‌های یوکاریوتیک دارند (۱۸). بنابراین امکان استفاده از دندریمرها به عنوان گندزدا می‌تواند مورد پژوهش قرار گیرد.

این مطالعه با هدف تعیین کارایی نانو دندریمر پلی‌آمیدوآمین - G5 Nano Polyamidoamine-G5 (NPAMAM-G5) و هم‌چنین شناسایی و ارائه ترکیب شیمیایی دندریمر پلی‌آمیدوآمین - G5 به عنوان عامل ضد باکتریایی در حذف باکتری‌های اشرشیاکلی، کلبسیلا اوکسی‌توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس از محیط آبی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

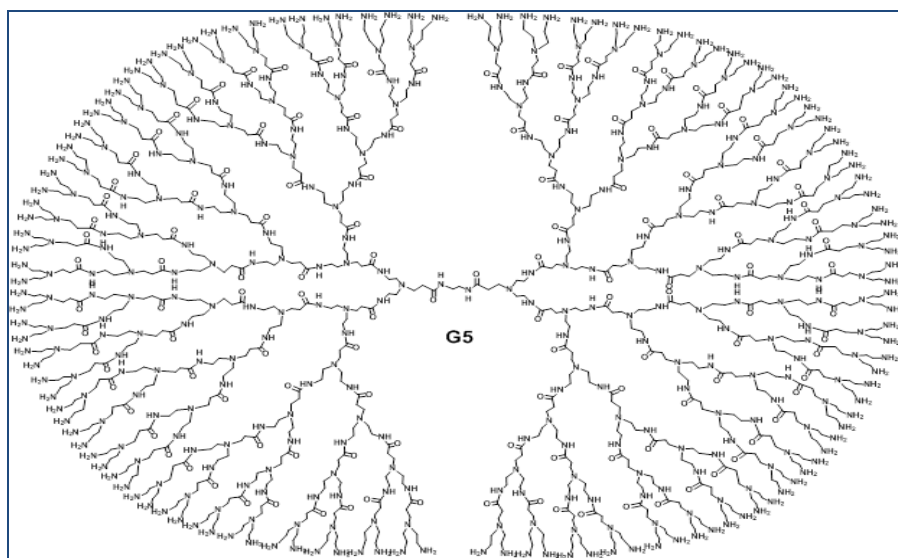
این مطالعه به صورت تجربی و در مقیاس آزمایشگاهی انجام شد. گونه‌های باکتری استفاده شده در این مطالعه شامل باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی، کلبسیلا اوکسی‌توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. ماده ضدباکتریایی مورد استفاده، دندریمر NPAMAM-G5 می‌باشد که از دانشگاه صنعتی امیرکبیر ایران خریداری گردید. ویژگی‌های شیمیایی و ساختار شیمیایی دندریمر NPAMAM-G5 به ترتیب در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است (۱۹). هم‌چنین نمودار ۱ مشخصات NPAMAM-G5 که از طریق دستگاه طیف سنجی تبدیل فوری مادون قرمز (FTIR) اندازه گیری شده را نشان می‌دهد. در این پژوهش سویه‌های استاندارد باکتری‌ها از

تمامی آزمایشات بر اساس دستورالعمل‌های موجود در کتاب آزمایش‌های استاندارد آب و فاضلاب (۲۰) و دستورالعمل‌های موسسه استاندارد و آزمایشگاه پزشکی (Clinical Laboratory and Standard Institute-CLSI) انجام گردید (۲۱). از نرم افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

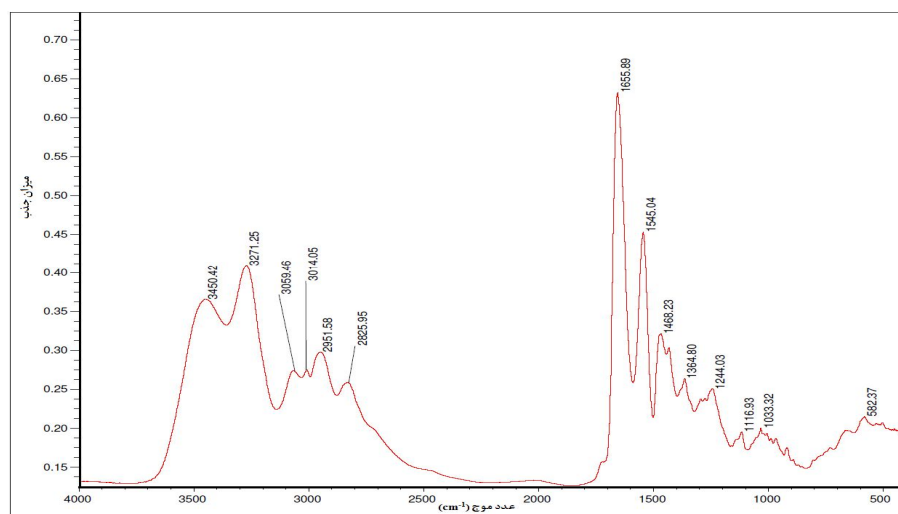
نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار گرفتند و پس از آن تعداد کلنی‌ها شمارش شدند. تمامی محیط‌کشت‌های مورد استفاده ساخت شرکت مرک آلمان بود.

جدول ۱. ویژگی‌های شیمیایی نانو دندریمر پلی آمیدوآمین-G5

تعداد گروه‌های آمین داخلی	تعداد گروه‌های انتهایی آمینی	اندازه (نانو متر)	وزن مولکولی (گرم بر مول)	نسل دندریمر	فرمول مولکولی
۱۲۶	۱۲۸	۵/۷	۲۸۸۲۶	۵	$C_{1262}H_{2528}N_{506}O_{252}$



شکل ۱. ساختار شیمیایی دندریمر پلی آمیدوآمین-G5



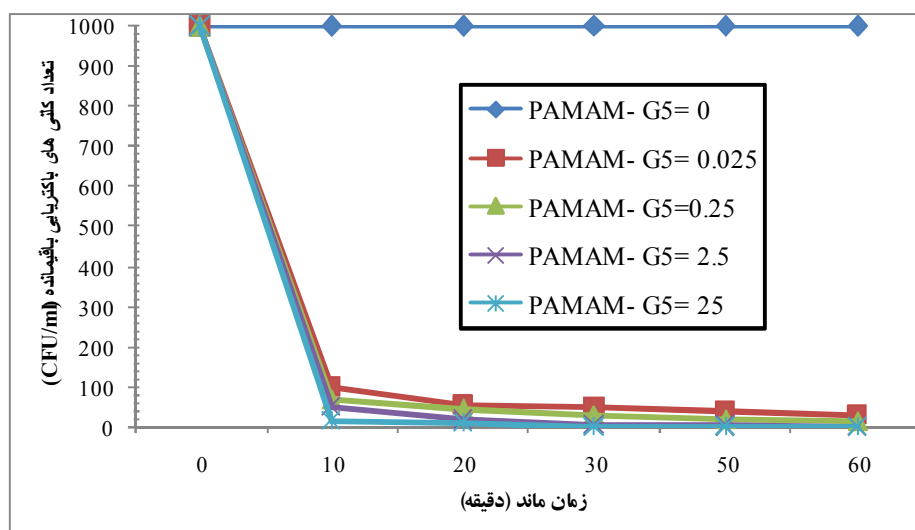
نمودار ۱. طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G5

## یافته‌ها

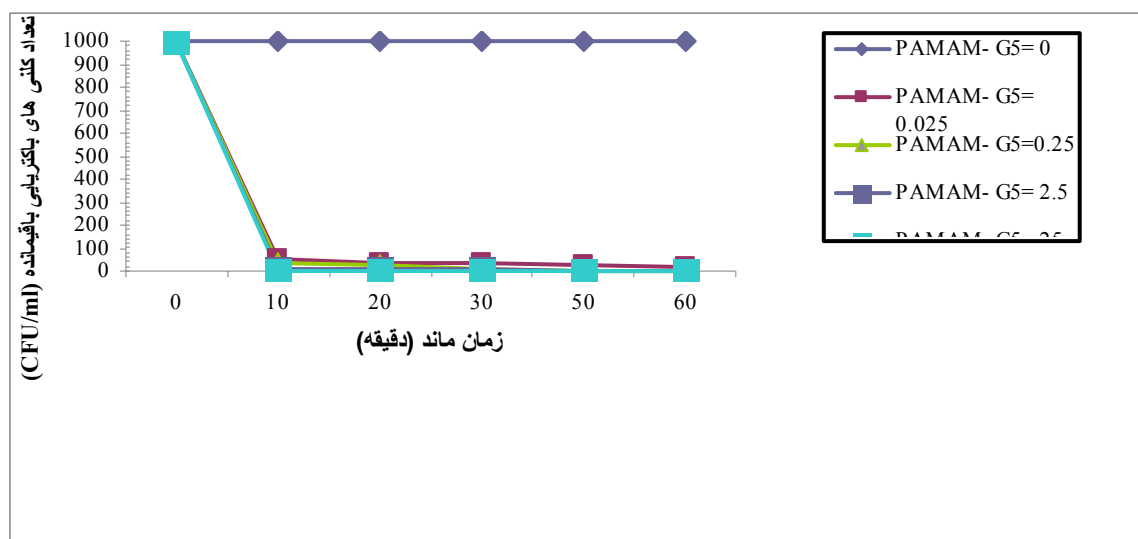
در غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان ۶۰ دقیقه، باکتری‌های اشرشیاکلی، کلبسیلا اوکسی‌توکا و پروتئوس میرابلیس به صورت ۱۰۰ درصد و باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۹۸/۴ و ۹۶/۴ درصد حذف شدند. در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در زمان تماس ۳۰ دقیقه، باکتری‌های اشرشیاکلی و کلبسیلا اوکسی‌توکا به طور ۱۰۰ درصد و باکتری‌های پروتئوس میرابلیس، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب به میزان ۹۹/۸، ۹۸/۹ و ۹۴/۶ درصد حذف شدند. تمامی غلظت‌های دندریمر در زمان‌های مختلف باعث کاهش باکتری‌ها شدند. همان‌طور که از نمودارهای ۲ تا ۶ مشخص است، تأثیر دندریمر NPAMAM-G5 با غلظت ۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های مختلف بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی و کلبسیلا اوکسی‌توکا بیشتر از باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و پروتئوس میرابلیس بود.

کارایی NPAMAM-G5 حذف باکتری‌های اشرشیاکلی، کلبسیلا اوکسی‌توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابلیس و استافیلوکوکوس اورئوس در نمودارهای ۲ الی ۶ نشان داده شده است. دندریمر NPAMAM-G5 در برابر هر دو گروه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت موثر بود. نتایج نشان می‌دهد که خاصیت ضد باکتریایی دندریمر در محیط آبی با افزایش غلظت دندریمر و زمان تماس رابطه مستقیم دارد. در زمان صفر، دندریمر NPAMAM-G5 تأثیری بر باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی، کلبسیلا اوکسی‌توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابلیس و گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس نداشت. در زمان ۱۰ دقیقه، دندریمر NPAMAM-G5 باعث کاهش چشم‌گیر باکتری‌ها گردید.

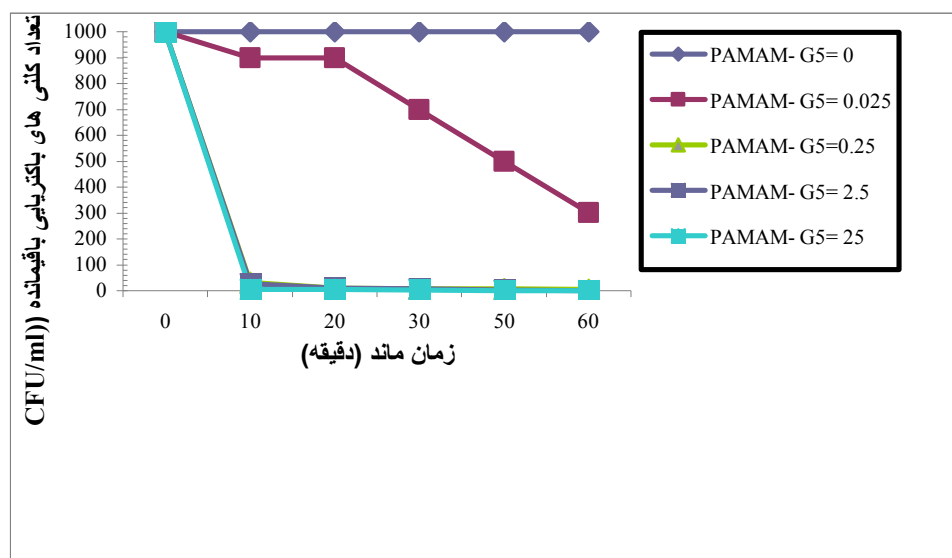
در زمان تماس ۶۰ دقیقه و غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دندریمر به جز استافیلوکوکوس اورئوس (میزان حذف آن در این غلظت ۹۷ درصد بود) تمامی باکتری‌های مورد مطالعه به صورت ۱۰۰ درصد حذف شدند. هم‌چنین



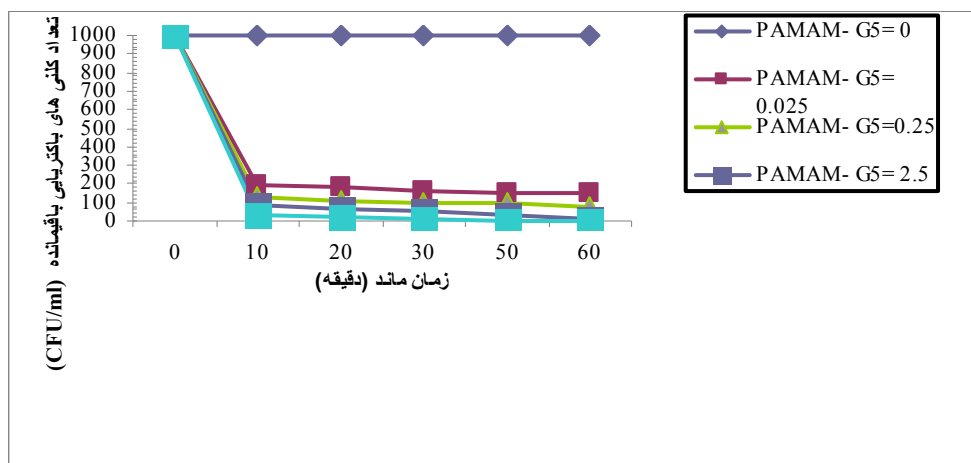
نمودار ۲. تأثیر دندریمر NPAMAM-G5 بر تغییرات جمعیت باکتری‌های اشرشیاکلی در آب



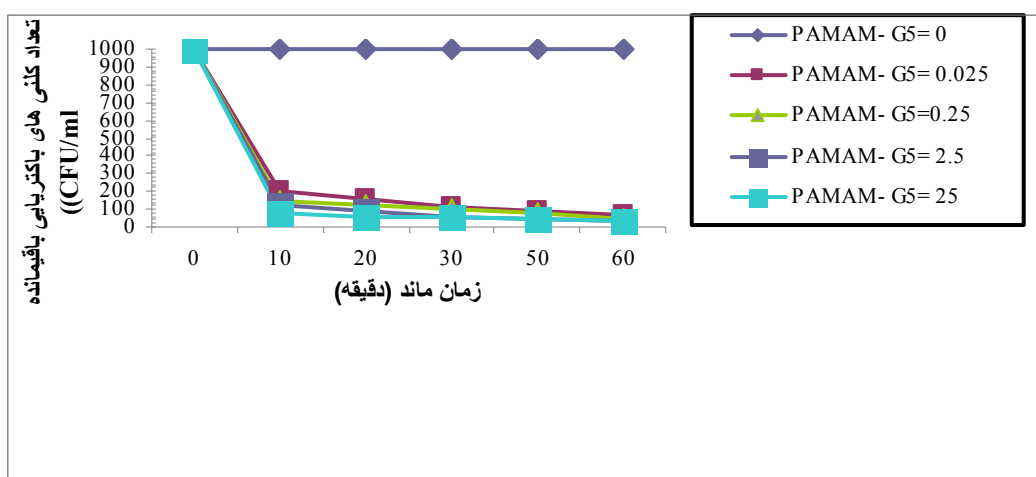
نمودار ۳. تأثیر دندریمر NPAMAM-G5 بر تغییرات جمعیت باکتری های کلبسیلا اوکسی توکا در آب



نمودار ۴. تأثیر دندریمر NPAMAM-G5 بر تغییرات جمعیت باکتری های پروتئوس میرابیلیس در آب



نمودار ۵. تأثیر دندریمر NPAMAM-G5 بر تغییرات جمعیت باکتری های سودوموناس آئروژینوزا در آب



نمودار ۶. تأثیر دندریمر NPAMAM-G5 بر تغییرات جمعیت باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس در آب

## بحث

استافیلوکوکوس اورئوس دارد، ولی بر روی باکتری آنتروباکتر کلوواکه هیچ گونه اثر ضد باکتریایی ندارد (۱۲). در مطالعه دیگر که بر روی اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G4 انجام گردید، مشخص شد این ماده هیچ گونه خاصیت ضد باکتریایی بر روی باکتری سودوموناس آئروژنز ندارد (۱۳). هم‌چنین در این مطالعات نشان داده شد که اثر ضدباکتریایی نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G4 بر روی بیشتر باکتری‌ها در غلظت‌های بالاتر اتفاق می‌افتد (۱۲، ۱۳).

مطالعه حاضر نشان داد که نانو دندریمر پلی آمید و آمین نسل پنجم تأثیر ضد باکتریایی بسیار مناسبی داشته و همه باکتری‌ها را با راندمان بالایی حذف می‌کند و حتی در غلظت ۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر نیز خاصیت ضدباکتریایی نسبتاً مناسبی بر روی همه باکتری‌های مورد مطالعه دارد. تأثیر ضدباکتریایی بالاتر دندریمر نسل پنجم نسبت به نسل‌های پایین‌تر را می‌توان به تعداد بیشتر گروه انتهایی آمینی آن‌ها نسبت داد. هر چه قدر تعداد گروه انتهایی آمینی بیشتر باشد، به همان نسبت خاصیت باکتری کشی دندریمر افزایش می‌یابد. تعداد گروه‌های انتهایی آمینی در نانو دندریمر پلی آمید و آمین نسل چهارم برابر ۶۴ عدد است، در حالی که این تعداد در دندریمر پلی آمید و آمین نسل پنجم برابر ۱۲۸ عدد (جدول ۱) می‌باشد (۱۹). این گروه‌های عاملی بر روی سطوح سلول باکتریایی جذب شده

در دنیا حدود ۸۰ درصد بیماری‌های واگیر از طریق آب آلوده منتقل می‌شود. در منابع آب، آلودگی به باکتری‌های کلیفرم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و گونه‌های بیماری‌زای آن موجب مشکلات بهداشتی متعددی می‌شود (۲۲). بر اساس اعلام سازمان بهداشت جهانی (WHO) تعداد کلیفرم‌ها و باکتری‌های گوارشی شمارش شده در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر آب نوشیدنی باید صفر باشد (۲۳)، در پژوهش حاضر، اثر نانو دندریمر پلی آمید و آمین نسل پنجم بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی، کلبسیلا اوکسی‌توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس در محلول آبی مورد بررسی قرار گرفت.

هم‌چنین در مطالعه حاضر مشخص گردید که باکتری‌های اشرشیاکلی و کلبسیلا اوکسی‌توکا نسبت به باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و پروتئوس میرابیلیس در مقابل عامل ضدباکتریایی از مقاومت کمتری برخوردار بوده و در غلظت‌های کمتری از بین می‌روند. در مطالعه‌ای که در مورد اثر ضد باکتریایی نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G4 به روش دیسک انتشاری انجام گرفته بود، این نتیجه به دست آمد که نانو دندریمر پلی آمید و آمین-G4 یک اثر ضد باکتریایی بر روی باکتری‌های اشرشیا کلی، باسیلوس سوبتیلیس و



باکتری‌هایی از جمله اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس را به طور کامل حذف می‌کند (۱۴). مطالعه حاضر نشان داد NPAMAM-G5 در غلظت‌های پایین‌تر نیز خاصیت باکتری‌کشی مناسبی دارد.

احتمالاً علت این امر خاصیت درخت‌سانی، ساختار منظم و پرشاخه، فضاهای خالی ما بین شاخه‌ها، تعداد زیاد گروه‌های عاملی انتهایی و ماکرو مولکول بودن دندریمر NPAMAM-G5 باشد. این خصوصیات سبب افزایش سطح ویژه نانو دندریمرها می‌شود و با افزایش هر نسل سطح ویژه آن افزایش پیدا می‌کند. بالا بودن سطح ویژه، اجازه فعالیت در سطح بیشتری را به نانودندریمرها می‌دهد و در نتیجه باکتری‌های موجود در محلول را در شاخه‌های میانی و انتهایی خود به دام انداخته و مانع از فعالیت و تولید مثل باکتری‌ها می‌شود (۱۲). در مطالعه حاضر، با افزایش زمان تماس کارایی دندریمر در حذف باکتری‌ها به طور چشم‌گیری افزایش یافت. مطالعه انجام شده بر روی دندریمر پلی پروپیلن ایمین نسل دوم در حذف برخی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نشان داد که با افزایش زمان تماس راندمان حذف باکتری‌ها افزایش می‌یابد (نمودارهای ۲ تا ۶) (۱۴). در مطالعه‌ای که در مورد اثر نانونقره بر حذف باکتری‌های کلیفرم از آب آلوده انجام شد، نتایج نشان داد که افزایش زمان تماس با نانونقره، باعث حذف بیشتر کلیفرم‌ها می‌شود. اما رابطه معنی‌داری بین مقدار نانونقره و حذف کلیفرم‌ها دیده نشد ( $p=0/6$ ) (۲۸). نتایج مطالعه‌ای بر روی فرآیند نانو ذرات آهن صفر ظرفیتی برای حذف باکتری اشرشیاکلی نشان داد که با افزایش زمان تماس راندمان غیرفعال سازی اشرشیاکلی افزایش می‌یابد (۲۹). این مطالعه نشان داد که با افزایش زمان تماس به ۶۰ دقیقه همه باکتری‌ها به جز استافیلوکوکوس اورئوس (میزان حذف آن در این زمان ۹۷ درصد بود) به صورت ۱۰۰ درصد حذف شدند. افزایش راندمان حذف باکتری‌ها با افزایش زمان تماس نشان دهنده ماندگاری بالای این ماده در محلول‌های آبی می‌باشد. بر خلاف ازن، UV و دی اکسید کلر که زمان

و از طریق دیوارسلولی نفوذ می‌نمایند، سپس به غشاء سیتوپلاسمی متصل شده و غشاء سیتوپلاسمی را متلاشی می‌کنند. در این هنگام الکترولیت‌هایی از قبیل یون‌های پتاسیم و فسفات و مواد هسته‌ای از قبیل DNA و RNA از سلول آزاد می‌شوند که در نتیجه به مرگ سلول باکتریایی می‌انجامند. پس می‌توان گفت خاصیت ضد میکروبی نانو دندریمرها به واسطه اختلال در غشاء داخلی و خارجی باکتری‌ها که از طریق گروه‌های انتهایی آمینی صورت می‌گیرد، می‌باشد (۱۲).

همان‌طور که در نمودارهای ۲ تا ۶ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت دندریمر و زمان تماس، تأثیر ضد باکتریایی نانو دندریمر افزایش یافته و باعث کاهش چشم‌گیر باکتری‌ها می‌گردد.

در مطالعه‌ای اثر ضد باکتریایی نانو دندریمرهای پلی‌آمید و آمین-G3 بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه نشان داد با افزایش غلظت دندریمر، قطر هاله عدم رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی افزایش می‌یابد (۲۵). خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم پوشیده شده با نقره ( $\text{TiO}_2:\text{Ag}$ ) بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت کشندگی و بازدارندگی برای اشرشیاکلی برابر با ۶/۴ و ۳/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی و بازدارندگی برای استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۲۵/۶ و ۱/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (۲۶). نتایج مطالعه مربوط به تأثیر نانوذرات CuO،  $\text{TiO}_2$  و ZnO بر حذف باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت از فاضلاب شهری نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات، درصد حذف باکتری‌ها افزایش می‌یابد (۲۷). مطالعه انجام شده در مورد اثر ضدباکتریایی دندریمر پلی پروپیلن ایمین نسل دوم نشان داد که غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از این ماده تأثیری بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی و پروتئوس میرابیلیس ندارد و با افزایش غلظت آن تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر،

2. Misra A, Singh V. A delay mathematical model for the spread and control of water borne diseases. *Journal of theoretical biology*. 2012; 301: 49-56.
3. Chowdhury S, Champagne P, Husain T. Fuzzy risk-based decision-making approach for selection of drinking water disinfectants. *Journal of water supply: research and technology-AQUA*. 2007; 56(2):75-93.
4. Rutala WA, Weber DJ, Control CfD. *Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008: Centers for Disease Control (US)*; 2008.
5. Karagas MR, Villanueva CM, Nieuwenhuijsen M, Weisel CP, Cantor KP, Kogevinas M. Disinfection byproducts in drinking water and skin cancer? A hypothesis. *Cancer Causes and Control*. 2008; 19(5):547-8.
6. Richardson SD, Plewa MJ, Wagner ED, Schoeny R, DeMarini DM. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2007; 636(1):178-242.
7. Mitch WA, Sedlak DL. Formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) from dimethylamine during chlorination. *Environmental Science & Technology*. 2002; 36(4): 588-95.
8. Chowdhury S, Rodriguez MJ, Sadiq R. Disinfection byproducts in Canadian provinces: associated cancer risks and medical expenses. *Journal of hazardous materials*. 2011; 187(1): 574-84.
9. Li W-R, Xie X-B, Shi Q-S, Duan S-S, Ouyang Y-S, Chen Y-B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals*. 2011; 24(1):135-41.
10. Nazari S, reza Yari A, Mahmodian MH, Reshvanloo MT, Matboo SA, Majidi G, et al. Application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sub>0</sub> in removal of Acid Red 18 dye from aqueous solutions. *Archives of Hygiene Sciences*. 2013; 2(3):114-20.
11. Hossain F, Perales-Perez OJ, Hwang S, Roman F. Antimicrobial nanomaterials as water disinfectant: applications, limitations and future perspectives. *Science of the total environment*. 2014; 466:1047-59.

ماند خیلی پایینی در محلول‌های آبی دارند و بعد از چند دقیقه باقیمانده خیلی کمتری از خود به جا می‌گذارند(۸)، دندریمر NPAMAM-G5 می‌تواند زمان ماند خیلی بالایی در محلول‌های آبی داشته باشد. با توجه به این که آلودگی ثانویه در هر لحظه می‌تواند در شبکه‌های آب آشامیدنی اتفاق بیفتد، بنابراین استفاده از این ماده به عنوان گندزدا می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

### نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانو دندریمر پلی آمید و آمین - G5 با زمان ماند و غلظت کم نیز راندمان خیلی بالایی در حذف باکتری‌های اشرشیاکلی، کلبسیلا اوکسی توکا، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس از محلول‌های آبی دارد. با توجه به این که نانو دندریمرهای پلی آمید و آمین هیچ گونه سمیتی برای سلول‌های انسانی و حیوانی ندارند، از این ماده می‌توان به عنوان گندزدا در صنعت آب و موارد مشابه استفاده کرد. با این حال استفاده از نانو دندریمر برای گندزدایی آب آشامیدنی نیازمند مطالعات بیشتر و وسیع‌تر است.

### تشکر و قدرانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اردبیل در سال ۱۳۹۴ با شماره مصوب ۴۹۳۴ است. بدین وسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن آوری و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تشکر و قدردانی می‌شود. هم‌چنین از آقای آرزغانی کارشناس آزمایشگاه میکروبی شناسی پزشکی به جهت همکاری کامل در انجام این پروژه سپاس‌گزاری می‌گردد.

### منابع

1. Behra R, Krug H. Nanoecotoxicology: Nanoparticles at large. *Nature Nanotechnology*. 2008; 3(5):253-4.

12. Izanloo H, Ahmadi Jebelli M, Nazari Sh SN, Tashauoei H. Studying the antibacterial effect of polyamidoamine-G4 dendrimer on some of the gram-negative and gram-positive bacteria. *J Arak Univ Med Sci*. 2014; 17(90):1-10.[Persian]
13. Izanlou H, Ahmado Jabali M, Tashyiee H, Khazae M, Nazari Sh MG. 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.[Persian]
14. Izanloo H, Sh N, Ahmadi Jebelli M, Alizadeh Matboo S, Tashauoei H. Studying the polypropylenimine-G2 (PPIG2) Dendrimer Performance in Removal of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* from Aqueous Solution. *J Arak Univ Med Sci*. 2015; 18(99):8-16.
15. Hermanson GT. *Bioconjugate techniques*: Academic press; 2013.p. 351-86.
16. Diallo MS. Water treatment by dendrimer enhanced filtration. Google Patents; 2008.
17. Abkenar SS, Malek RMA. Preparation, characterization, and antimicrobial property of cotton cellulose fabric grafted with poly (propylene imine) dendrimer. *Cellulose*. 2012; 19(5):1701-14.
18. Felczak A, Wrońska N, Janaszewska A, Klajnert B, Bryszewska M, Appelhans D, et al. Antimicrobial activity of poly (propylene imine)dendrimers. *New Journal of Chemistry*. 2012; 36(11): 2215-22.
19. Boas U, Christensen JB, Heegaard PM. Dendrimers: design, synthesis and chemical properties. *Journal of Materials Chemistry*. 2006; 16(38):3785-98.
20. Federation WE, Association APH. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA. 2005.
21. Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) performance standards for antimicrobial disk diffusion susceptibility tests 19th ed. approved standard. CLSI document M100-S19. 2009: 29.
22. Nemade PD, Kadam AM, Shankar HS. Removal of iron, arsenic and coliform bacteria from water by novel constructed soil filter system. *Ecological Engineering*. 2009; 35(8): 1152-7.
23. Jamieson R, Gordon R, Joy D, Lee H. Assessing microbial pollution of rural surface waters: A review of current watershed scale modeling approaches. *Agricultural water management*. 2004; 70(1):1-17.
24. Odonkor ST, Ampofo JK. *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology research*. 2013; 4(1):2-3.
25. Charles S, Vasanthan N, Kwon D, Sekosan G, Ghosh S. Surface modification of poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimer as antimicrobial agents. *Tetrahedron letters*. 2012; 53(49):6670-5.
26. Kedziora A, Strek W, Kepinski L, Bugla-Ploskonska G, Doroszkiewicz W. Synthesis and antibacterial activity of novel titanium dioxide doped with silver. *Journal of sol-gel science and technology*. 2012; 62(1):79-86.
27. Malakootian M, Toolabi A. Determining and comparing the effect of nanoparticle CuO, TiO<sub>2</sub> and ZnO in removing gram positive and negative bacteria from wastewater. *Tooloe Behdasht*. 2010; 9(2):1-11.
28. Miranzadeh MB, Rabbani D, Naseri S, Nabizadeh R, Mousavi SGA, Ghadami F. Coliform bacteria removal from contaminated water using nanosilver. *Feyz Journals of Kashan University of Medical Sciences*. 2012; 16(1):16-23.
29. Zarei R, Mosafieri M, Soroush Barhagi M, Khataee A, Asghari Jafarabadi M. E. coli Inactivation Efficiency of Zero-Valent Iron Nanoparticles Stabilized by Carboxymethyl Cellulose. *Journal of Health*. 2014; 5(3):214-23.