

ارزیابی کارآیی ضد میکروبی دندریمر نانوساختار پلی آمیدوآمین نسل ۴ بر باکتریهای بومی منابع آب و مقایسه آن با آنتی بیوتیک های رایج

افشین ملکی^۱، محمد احمدی جبلی^۲، باقر حیاتی^۳، هیوا دارایی^۴، ندا درویش^۵

۱. استاد بهداشت محیط، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۲. دانشجوی دکتری مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. (مؤلف مسوول)، تلفن: ۰۲۵-۳۷۷۸۰۱۷۵
m.ahmadijebelli@yahoo.com

۳. دانشجوی دکتری مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۴. مربی، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۵. دانشجوی دکتری محیط زیست، دانشکده محیط زیست و انرژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به خواص ضد باکتریایی دندریمرها، یکی از برنامه های آینده امکان استفاده از آنها به عنوان یک ماده آنتی باکتریال جایگزین با کمترین اثرات جانبی در مقابله با عفونت های میکروبی است. لذا هدف از این مطالعه ارزیابی مقاومت باکتری های جدا شده از منابع آبی نسبت به آنتی بیوتیک های رایج و مقایسه آن با ماکرومولکول نانوساختار دندریمر پلی آمیدوآمین نسل ۴ (PAMAM-G4) است.

روش بررسی: ۵۲۳ نمونه از ۱۰۸ منبع آبی مختلف برداشت شد و به روش فیلتر غشایی مورد آزمایش میکروبی قرار گرفت. مقاومت جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین، اریترومايسين، تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین به روش اندازه گیری هاله عدم رشد بررسی و سپس با مقاومت همان گونه ها نسبت به دندریمر پلی آمیدوآمین نسل ۴ (PAMAM-G4) مقایسه شد. همچنین حداکثر غلظت بازمانده رشد (MIC) دندریمر در مواجهه با جدایه ها اندازه گیری شد.

یافته ها: ۷/۴ درصد از نمونه ها آلودگی باکتریایی نشان دادند. فراوانی گونه های میکروبی جدا شده شامل اشیریشیا کلی (۲/۲۸٪)، پروتئوس (۸/۱۲٪)، کلبسیلا (۹/۱۷٪)، انتروباکتر (۳/۱۵٪)، سودوموناس (۹/۱۷٪)، باسیلوس سوبتیلیس (۵/۱٪) و استافیلوکوکوس اورئوس (۶/۲۵٪) بود. در روش اندازه گیری هاله عدم رشد، گونه های گرم منفی مقاومت بالایی نسبت به دندریمر-PAMAM-G4 نشان دادند، به گونه ای که این دندریمر تاثیری بر بازدارندگی از رشد انتروباکتر و سودوموناس نداشت و MIC باکتری های اشیریشیا کلی، کلبسیلا و پروتئوس نیز به ترتیب ۱۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد. باکتری های گرم مثبت پاسخ مناسبی به دندریمر PAMAM-G4 نشان دادند به گونه ای که MIC برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب ۱ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد.

نتیجه گیری: با افزایش گونه های مقاوم به آنتی بیوتیک های رایج، می توان از این نوع دندریمر به عنوان یک ماده آنتی باکتریال قوی در مقابله با گونه های گرم مثبت باکتری ها استفاده نمود.

کلید واژه ها: دندریمر پلی آمیدوآمین، آنتی بیوتیک، عوامل ضد باکتری، مقاومت دارویی، منابع آب

وصول مقاله: ۹۴/۱۰/۵ اصلاحیه نهایی: ۹۴/۱/۲۴ پذیرش: ۹۵/۱/۱۸

مقدمه

پایداری باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای در آب به رغم تعداد زیادی از باکتری‌های رقیب، نشان داده شده است (۱). این پاتوژن‌ها عامل ایجاد اسهال و اختلالات گوارشی و در نتیجه ناخوشی و مرگ و میر در گروه‌های سنی مختلف در سراسر جهان هستند (۲). آب آشامیدنی برای مصرف انسان باید عاری از آلودگی، ایمن و قابل قبول برای مصرف کننده باشد. در واقع کیفیت آب آشامیدنی نباید از رهنمودهای کیفی آب تجاوز کند (۳). جداسازی عوامل بیماری‌زا از منابع آبی، نشانه خطر جدی برای بهداشت عمومی مصرف کنندگان است. اگر باکتری‌های بیماری‌زا توسعه پیدا کرده و نسبت به یک آنتی‌بیوتیک مقاوم شوند، لذا این آنتی‌بیوتیک در درمان بیماری‌های عفونی حاصل از این باکتری‌ها ناتوان خواهد بود (۴و۵). این خطر در مواردی همراه با مقاومت باکتری‌های پاتوژن روده‌ای نسبت به چند آنتی‌بیوتیک گزارش شده است (۶). استفاده بیش از حد و یا سوء مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در طب انسانی و دامپزشکی، عامل اصلی توسعه و گسترش باکتری‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک در سراسر جهان است (۷و۸). استفاده از کودهای حیوانی و انسانی نیز به انتشار باکتری‌های روده‌ای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط منجر می‌شود (۹).

از آنجا که مقاومت پاتوژن‌ها به عوامل ضد میکروبی به سرعت رو به افزایش است، لذا تحقیق و کشف مواد ضد باکتریایی جدید که دارای خواص ویژه‌ای بوده و مکانیسم تاثیر آنها موجب مقاومت سریع باکتری‌ها نشود، مورد انتظار است. دندریمرها پلیمرهایی منظم، پُرشاخه، دارای گروه‌های سطحی بسیار فعال چندکاره و فضاهای خالی مابین شاخه‌ها هستند (۱۰-۱۲). این فضاهای خالی قابلیت پذیرش مولکول‌های میهمان و کپسوله کردن ذرات در اندازه‌های مختلف را فراهم می‌آورند به همین دلیل، در سال‌های اخیر محققین از ساختارهای دندریتیکی و به ویژه دندریمرها در علوم پزشکی، داروسازی، بیولوژی و غیره

بهره برده‌اند (۱۳). دندریمرهای پلی‌پروپیلن ایمن از قدیمی‌ترین دندریمرهای شناخته شده هستند که اولین بار توسط شخصی بنام وگتل (vogtle) سنتز و معرفی شد. این دندریمرها دارای یک هسته مرکزی با عوامل فعال متعدد هستند (۱۴). اگر گروه‌های انتهایی دندریمرها با گروه‌های ضد میکروبی عامل دار شوند، توانایی بالای آنها در حذف میکروب‌ها را می‌توان انتظار داشت. در این رابطه لویز و همکاران و همچنین کالابرتا و همکاران نشان دادند که دندریمر پلی‌آمیدوآمین [Polyamidoamine Dendrimers (PAMAM)] با گروه‌های انتهایی آمین واجد فعالیت ضد باکتری علیه باکتری اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس هستند (۱۵ و ۱۶). همچنین تاثیر ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی در تخریب و تجزیه دیواره سلولی باکتری‌ها نشان داده شده است (۱۷ و ۱۸). بیشتر عوامل ضد میکروبی دندریمری از سنتز گروه‌های فعال انتهایی با نمک‌های آمونیوم چهار ظرفیتی حاصل می‌شوند (۱۹). لذا وجود گروه‌های آمین انتهایی در ساختار آنها سبب خاصیت میکروب‌کشی شده است (۲۰ و ۱۴). البته این خاصیت ضد میکروبی دندریمر به فاکتورهای کلیدی چون نوع هسته دندریمر، شارژ سطحی و گروه‌های عاملی آن، ساختار سه بعدی دندریمر و اندازه آن وابسته است (۲۱). به هر حال مشخص شده است که عوامل ضد حیات تثبیت شده بر روی دندریمرها در صورتی که محل اثر آنها دیواره سلولی یا غشاء سلولی باشد موثرتر عمل می‌کنند (۱۷).

با اضافه کردن گروه‌های انتهایی محلول در آب به دندریمرها، دندریمرهای محلول در آب به دست می‌آیند. هنگامی که این دندریمرها با آنتی‌بیوتیک‌های باکتریواستاتیک ضعیف محلول یا غیر محلول در آب واکنش می‌دهند، خواص ضدباکتریایی آنها بهبود یافته به گونه‌ای که کاربردهای کلینیکی آنها در مطالعات تجربی مشاهده شده است (۲۲). از سولفونامیدها، به دلیل سهولت مصرف و طیف وسیع فعالیت ضد باکتریایی، به گونه‌ای

این پژوهش یک مطالعه مداخله‌ای-آزمایشگاهی است که طی آن تاثیر دندریمر پلی آمیدوآمین نسل ۴ بر روی باکتری های بومی جدا شده از منابع آبی و مقایسه آن با آنتی بیوتیک های رایج، مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تهیه باکتری های مورد نظر برای مطالعه، نمونه برداری از منابع آبی مختلف انجام شد. بدین منظور ۵۲۳ نمونه از ۱۰۸ منبع آب واقع در روستاهای استان قم از ابتدای اردیبهشت لغایت پایان شهریور سال ۱۳۹۳ برداشت شد. نمونه برداری طبق روش استاندارد با استفاده از ظروف شیشه‌ای درب دار استریل همراه با ۰/۱ میلی لیتر محلول تیوسولفات سدیم ۱۰ درصد به منظور حذف کلر باقیمانده انجام گرفت (۳). نمونه ها در دمای ۴ درجه سلیسیوس برای انجام آزمایش های بعدی به آزمایشگاه منتقل شدند. بر روی تمام نمونه ها به روش فیلتر غشایی آزمون میکروبی انجام شد. از پرگنه های رشد کرده کشت خالص تهیه شد و باکتری های جدا شده با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی (مانند کاتالاز، اکسیداز، کوآگولاز، لیستیناز، سیترات، تخمیر مانیتول و تولید اسید، تخمیر گلوکز، سوکروز و گالاکتوز، احیا نیترات، اوره آز، هیدرولیز اسکولین، تولید ایندول) شناسایی شدند (۳).

آماده سازی ماده ضد میکروبی و باکتری های هدف: ماده ضد میکروبی مورد استفاده، گونه ای دندریمر نسل ۴ به نام پلی آمیدوآمین (PAMAM) است. دندریمر به روش دایورژن و با تکرار تصاعدی گروه های آمینی همراه با متیل آکریلات سنتز شد. سپس واکنش با استری شدن گروه های آمین و الکل ادامه یافت و در نهایت بعد از دو تکرار به گروه های آمین منتهی شد. در انتها محصول خام برای تخلیص و حذف محصولات جانبی غیر ضروری به یک کیسه دیالیز (MWCO5000) (Sigma-Aldrich, France) حاوی آب مقطر برای ۴۸ ساعت منتقل شد (جدول ۱ و شکل ۱) (۲۶).

گسترده استفاده می شود. با این حال، استفاده کلینیکی از سولفونامیدها به دلیل حلالیت بسیار پایین در آب، حذف سریع از سیستم گردش خون، سطح پایین پیوستگی به پروتئین های پلاسما و عوارض جانبی متعدد، محدود شده است (۲۲). مطالعات میکروبیولوژیک نشان می دهند که دندریمرهای PAMAM می توانند حلالیت در آب و فعالیت ضد باکتریایی نوعی از سولفونامید به نام سولفامتوکسازول را در مقایسه با نوع خالص آن به مقدار ۴ تا ۸ برابر افزایش دهند (۲۳). همچنین کینولون ها که از نظر کلینیکی آنتی بیوتیک های قوی به شمار می آیند، به شکل آزاد در آب محلول نمی باشند. مطالعات میکروبیولوژیک بر روی کینولون ها نشان می دهد که فعالیت ضد میکروبی و حلالیت آنها در آب، در حضور دندریمرها به طور قابل توجهی افزایش می یابد (۲۴).

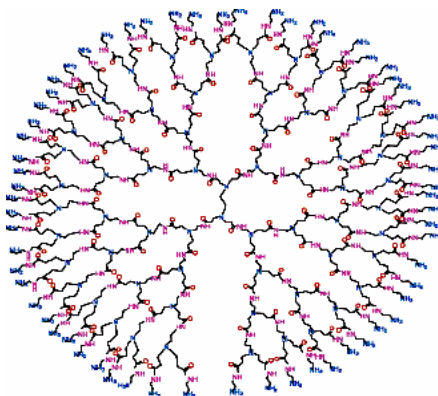
در این گونه مطالعات سلول هدف برای ماده ضد میکروبی باید به دقت انتخاب شود زیرا دندریمرهای پر حجم نمی توانند به درون سد غشاء سلولی نفوذ کرده و برای فعالیت ضد میکروبی از پیش تعیین شده، به محل اثر برسند (۲۵). به عنوان مثال لوپز و همکاران در سال ۲۰۰۹ میلادی اعلام نمودند که خاصیت ضد میکروبی دندریمر پلی- آمیدوآمین نسل سوم در مقایسه با دندریمر پلی آمیدوآمین نسل پنجم بسیار بیشتر است (۱۶). بنابراین با توجه به خواص ضد میکروبی دندریمرها، هدف این مطالعه ارزیابی خواص ضد میکروبی دندریمر پلی آمیدوآمین نسل ۴ با استفاده از روش انتشار دیسک، حداقل غلظت بازدارندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی و مقایسه آن با آنتی بیوتیک های رایج است.

روش بررسی

نوع مطالعه، نمونه برداری و جداسازی باکتری ها از منابع آب آشامیدنی:

جدول ۱- ویژگی های دندریمر پلی آمیدوآمین G4

دندریمر	فرمول مولکولی	چگالی (g/cm ³)	وزن مولکولی (g/mol)	تعداد کل گروه های آمینی	تعداد گروه های آمینی انتهاپی
پلی آمیدو آمین G4	C ₆₂₂ H ₁₂₄₈ N ₂₅₀ O ₁₂₄	۰/۹۸	۱۴۲۱۵	۲۵۰	۶۴



شکل ۱: ساختار شیمیایی دندریمر پلی آمیدوآمین نسل ۴

به منظور سنجش فعالیت آنتی باکتریایی دندریمر مورد آزمایش، رقت های متوالی ۵، ۵۰، ۵۰۰، ۵، ۵۰ و ۰/۵ μg/ml از ماده ضد میکروبی در آب مقطر استریل تهیه شد. برای ارزیابی سمیت دندریمر در برابر باکتری های هدف، از روش های تعیین هاله عدم رشد، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و تعیین حداقل غلظت کشندگی استفاده شد.

تعیین هاله عدم رشد:

این آزمایش به روش انتشار دیسک انجام شد. در این روش ۲۵ میکرولیتر از غلظت های مختلف ماده آنتی باکتریال به بلاتک دیسک های استاندارد به قطر ۰/۶ میلی متر اضافه شد. دیسک ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلیسیوس خشک شدند. از جدایه های مختلف رقت معادل ۰/۵ مک - فارلند تهیه و سپس با استفاده از سوآب استریل بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد. دیسک ها با استفاده از پنس استریل روی محیط کشت قرار داده شدند. کلیه محیط های کشت به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرما گذاری شدند.

تمام باکتری ها قبل از استفاده، در شرایط هوایی و در محیط کشت نوترینت براث برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرما گذاری شدند. غلظت بهینه باکتری ها برای انجام آزمایش های بعدی، مطابق استاندارد ۰/۵ مک فارلند تهیه شد.

آنتی بیوگرام با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیک تجاری:

به منظور سنجش مقاومت جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک ها، از دیسک های آنتی بیوگرام رایج شامل اریترومایسن، آموکسی سیلین، سپروفلوکساسین و تتراسایکلین استفاده شد. کلیه دیسک ها از شرکت پادتن طب خریداری شد. از جدایه های مختلف رقت معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و سپس با استفاده از سوآب استریل بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد. دیسک ها با استفاده از پنس استریل روی محیط کشت قرار داده شدند. کلیه محیط های کشت به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرما گذاری شدند.

سنجش فعالیت ماده ضد میکروبی:

به منظور تحلیل و مقایسه اثرات نه گروه ضد میکروبی شامل چهار آنتی بیوتیک رایج و پنج غلظت از دندریمر نسل چهارم که هر کدام در آزمایشات مشابه بر روی یک دسته هفت تایی از باکتری های یکسان اثر داده شده اند، از روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. در این روش نوع آنتی بیوتیک، متغیر مستقل بوده که در این مطالعه شامل نه سطح است. همچنین هاله عدم رشد هر باکتری در محیط کشت به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد. از نرم افزار SPSS ورژن ۱۸ جهت نمایش آمار توصیفی گروه ها و از MINITAB ورژن ۱۶ و نوار ابزار ANOVA و قسمت آنالیز یکطرفه جهت مقایسه میانگین گروه ها استفاده شد. در نهایت از روش های Tukey نیز برای مقایسه گروه ها با مقدار p کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به نوع و فراوانی باکتری‌های جدا شده در جدول ۲ ارایه شده است. از مجموع ۵۲۳ نمونه مورد آزمایش، ۴۸۴ نمونه فاقد آلودگی و ۳۹ نمونه واجد آلودگی کلیفرمی و سایر باکتری‌های هتروتروف بودند. گونه‌های جدا شده شامل اشیریشیا کلی، کلبسیلا اکسی توکا، پروتئوس میرابیلیس، انتروباکتر آئروژنز، سودوموناس، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس بودند.

جدول ۲- درصد فراوانی گونه‌های جدا شده از منابع آبی مختلف

نام جدایه	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Entrobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>
فراوانی گونه‌ها	۱۱	۷	۵	۶	۷	۱	۲
درصد فراوانی	۲۸/۲	۱۷/۹	۱۲/۸	۱۵/۳	۱۷/۹	۲/۵۶	۵/۱

پاسخ را در مواجهه با باکتری‌های گرم مثبت نشان می‌دهد و بر باکتری‌های گرم منفی تاثیر چندانی ندارد که این وضعیت از لحاظ کیفی نیز در شکل ۲ نمایش داده شده است.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی: حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی با استفاده از روش پیشنهاد شده توسط کمیته ملی برای استانداردهای آزمایشگاه تشخیص طبی (NCCLS) همراه با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد (۲۷). در این روش، لوله‌های حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط نوترینت براث که حاوی 10^8 cfu سلول باکتری و رقت‌های صفر (کنترل مثبت)، ۵۰۰، ۵۰، ۵، ۰٫۵ و ۰٫۰۵ $\mu\text{g/ml}$ از دندریمر بودند آماده و برای یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. لوله‌ای با کمترین غلظت از ماده ضد میکروبی که رشد سلول باکتری در آن دیده نشد، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی گزارش شد. برای ارزیابی حداقل غلظت کشندگی، با استفاده از فیلدوپلاتین، یک لوپ از هر کدام از لوله‌هایی که رشد در آنها دیده نشد، به پلیت‌های حاوی نوترینت آگار منتقل شد. پلیت‌ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. لوله‌ای با کمترین غلظت از ماده ضد میکروبی که پس از انتقال به محیط نوترینت آگار، رشد باکتری در آن مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد. همه آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

تحلیل آماری داده‌ها:

نتایج مربوط به فعالیت‌های ضد میکروبی دندریمر پلی آمیدوآمین نسل ۴ بر اساس هاله عدم رشد به روش انتشار دیسک در جدول ۳ ذکر شده است. همانگونه که در جدول دیده می‌شود دندریمر پلی آمیدوآمین نسل چهارم بهترین

جدول ۳- میانگین قطر هاله عدم رشد در روش انتشار دیسک در برابر غلظت‌های مختلف دندریمر پلی آمیدوآمین نسل ۴

هاله عدم رشد (میلیمتر)							غلظت دندریمر (µg/ml)
<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	
۲۵	۳۵	۰	۱۸	۲۱	۰	۱۷	۵۰۰
۲۱	۲۲	۰	۹	۱۲	۰	۰	۵۰
۱۷	۱۸	۰	۰	۰	۰	۰	۵
۸	۱۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰٫۵
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰٫۰۵



شکل ۲: تاثیر غلظت های مختلف دندریمر PAMAM-G4 بر تشکیل هاله عدم رشد در باکتری های گرم مثبت

جدول ۴ نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی دندریمر پلی آمیدوآمین نسل ۴ را بر روی باکتری های مورد مطالعه نمایش می دهد. همانطور که ملاحظه می شود حداقل غلظت دندریمر که مانع رشد باکتری ها می شود برای باکتری های گرم منفی بسیار بیشتر از باکتری های گرم مثبت است.

جدول ۴- حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی دندریمر پلی آمیدوآمین نسل ۴

<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	
۲٫۵	۱	-	۱۲۵۰	۵۰۰	-	۱۲۵۰	MIC (µg/ml)
۵	۵	-	۲۵۰۰	۱۲۵۰	-	۲۵۰۰	MBC (µg/ml)

نتایج مربوط به فعالیت ضد میکروبی آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین (AMX)، تراسایکلین (Te)، اریترومايسين (E) و سیپروفلوکساسین (Cp) بر روی جدایه ها بر اساس هاله عدم رشد به روش انتشار دیسک در جدول ۵ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول دیده می شود باکتری *E. coli* فقط به آنتی بیوتیک Cp حساس بوده و نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها مقاوم است. باکتری های *P. aeruginosa*، *K. oxytoca*، *E. aerogenes* به Cp حساس به Te متوسط و به سایر آنتی بیوتیک ها مقاوم است. باکتری *S. aureus* نسبت به Cp و AMX حساس، به E متوسط و به Te مقاوم است و باکتری *B. subtilis* نسبت به کل آنتی بیوتیک های مورد استفاده حساس است.

نتایج مربوط به فعالیت ضد میکروبی آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین (AMX)، تراسایکلین (Te)، اریترومايسين (E) و سیپروفلوکساسین (Cp) بر روی جدایه ها بر اساس هاله عدم رشد به روش انتشار دیسک در جدول ۵ نشان داده شده است. همانگونه که در جدول دیده می شود باکتری *E. coli* فقط به آنتی بیوتیک Cp حساس بوده و نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها مقاوم است. باکتری های *P. aeruginosa*، *K. oxytoca*، *E. aerogenes* به Cp حساس به Te متوسط و به سایر آنتی بیوتیک ها مقاوم است. باکتری *S. aureus* نسبت به Cp و AMX حساس، به E متوسط و به Te مقاوم است و باکتری *B. subtilis* نسبت به کل آنتی بیوتیک های مورد استفاده حساس است.

جدول ۵: میانگین قطر هاله عدم رشد در روش انتشار دیسک در برابر آنتی بیوتیک های Cp, E, Te, AMX
هاله عدم رشد (میلیمتر)

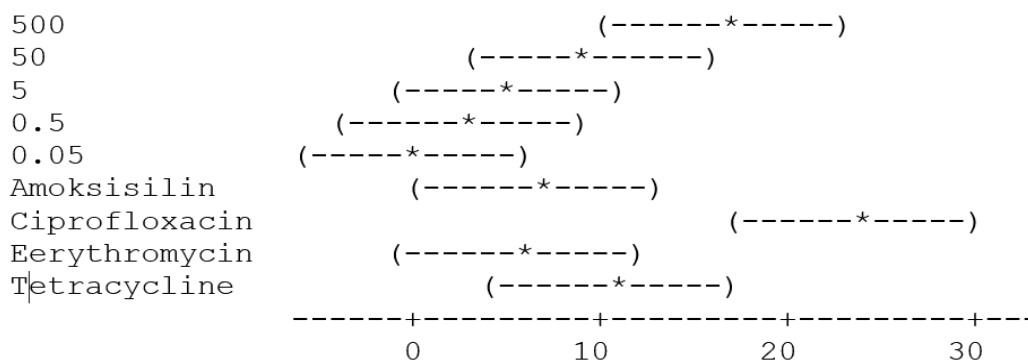
آنتی بیوگرام						
<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>K.oxytoca</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>
۲۵	۲۱	۰	۰	۰	۰	۰
۲۰	۱۲	۱۲	۰	۱۵	۱۵	۰
۱۸	۱۶	۰	۰	۰	۰	۰
۲۵	۱۸	۳۰	۱۲	۲۵	۲۶	۲۹

ANOVA برای گروه ها است. همانطور که از نتایج بالا دیده میشود میانگین کارایی دندریمرها با غلظت های مختلف و آنتی بیوتیک های مختلف همپوشانی بالایی دارند که نشان از توانایی آنتی باکتریالی دندریمرها دارد. ضمناً از آزمون Tukey نیز جهت بررسی ارتباط بین گروه ها استفاده شد و نتایج آن ها در قالب جدول ۷ نمایش داده شده است. در این جدول، اختلاف معناداری در سطح معناداری ۰/۰۵ مابین آنتی بیوتیک هایی که حروف مشترک کسب کرده اند وجود ندارد.

نتایج مقایسه آماری هاله عدم رشد در غلظت های مختلف دندریمر و آنتی بیوتیک های رایج:
نتایج مربوط به آمار تحلیلی گروه ها در جدول ۶ ارایه شده است. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معناداری ۰/۰۵ با $F=۵/۲۳$ و $p=۰/۰۰۰$ نشان از وجود اختلاف معنادار در گروه های مورد مطالعه داشت که به صورت شماتیک در شکل ۳ نمایش داده شده است. در این شکل ستاره مشخص کننده میانگین هر گروه و دنباله های آن انحراف استاندارد پیش بینی شده توسط آنالیز

جدول ۶: آمار توصیفی گروه های مورد مطالعه

گروه	تعداد آزمایشات گروه	انحراف معیار گروه	میانگین گروه
آموکسی سیلین	۷	۱۱/۲۸۲۱۰	۶/۵۷۱۴
تتراسایکلین	۷	۷/۶۹۹۷۲	۱۰/۵۷۱۴
اریترومایسین	۷	۸/۳۱۵۲۲	۴/۸۵۷۱
سیپروفلوکساسین	۷	۶/۳۹۹۴۰	۲۳/۵۷۱۴
دندریمر با غلظت ۵۰۰ میلیگرم بر لیتر	۷	۱۲/۷۹۱۳۷	۱۶/۵۷۱۴
دندریمر با غلظت ۵۰ میلیگرم بر لیتر	۷	۹/۷۰۲۷۲	۹/۱۴۲۹
دندریمر با غلظت ۵ میلیگرم بر لیتر	۷	۸/۵۴۴۰۰	۵/۰۰۰۰
دندریمر با غلظت ۰,۵ میلیگرم بر لیتر	۷	۴/۷۱۵۷۳	۲/۷۱۴۳
دندریمر با غلظت ۰,۰۵ میلیگرم بر لیتر	۷	۰/۰۰۰۰۰	۰/۰۰۰۰



شکل ۳: شماتیک نتایج آنالیز واریانس در گروه های مختلف آنتی بیوتیک و غلظت های مختلف از دندریمر

جدول ۷: اطلاعات دسته بندی بر اساس روش Tukey (در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵)

گروه	میانگین گروه ها	گروه بندی
سیروفلوکساسین	۲۳/۵۷	A
دندریمر با غلظت ۵۰۰ میلیگرم بر لیتر	۱۶/۵۷	B A
تتراسایکلین	۱۰/۵۷	C B A
دندریمر با غلظت ۵۰ میلیگرم بر لیتر	۹/۱۴	C B A
آموکسی سیلین	۶/۵۷	C B
دندریمر با غلظت ۵ میلیگرم بر لیتر	۵/۰۰	C B
اریترومایسین	۴/۸۶	C B
دندریمر با غلظت ۰/۵ میلیگرم بر لیتر	۲/۷۱	C B
دندریمر با غلظت ۰/۰۵ میلیگرم بر لیتر	۰	C

روده ای آن، نشانه وسعت پراکندگی این باکتری در محیط می باشد. همچنین سایر باکتری ها از خانواده اتروباکتریاسه که به طور طبیعی ساکن روده انسان و حیوانات می باشند و همچنین باسیلوس سوبتیلیس که به فراوانی در خاک وجود دارد و سایر باکتری های هتروتروف ساپروفیت در بین جدایه ها نشان دهنده احتمال آلودگی آب به منابع مختلف می باشد.

نتایج به وضوح نشان می دهد که با افزایش غلظت ماده ضد میکروبی، هاله بزرگتری در اطراف دیسک ها ایجاد می شود. این وضعیت نشان دهنده قدرت ماده ضد میکروبی در غلظت های بالاتر است. ضمناً با توجه به نتایج حاصل تفاوت در اندازه هاله های عدم رشد در مواجهه غلظت های مختلف ماده ضد میکروبی برای باکتری های مورد بررسی نیز

بحث

همانطوریکه بیان شد از مجموع ۵۲۳ نمونه مورد آزمایش، ۴۸۴ نمونه معادل ۹۲٫۵ درصد از نمونه ها فاقد آلودگی و ۳۹ نمونه دیگر معادل ۷/۴ درصد از نمونه ها واجد آلودگی باکتریایی بودند. همچنین در آزمون کلیفرم گرم پای، تنها ۱۱ نمونه معادل ۲٫۸٪ کل نمونه ها به این آزمون پاسخ مثبت دادند و سایر نمونه ها فاقد آلودگی با باکتری های گروه کلیفرم گرم پای بودند. بای و همکاران نیز در مطالعه کیفیت میکروبی آب شرب گرگان نتایج تقریباً مشابهی را بدست آوردند. بطوریکه از تعداد ۵۹۸ نمونه مورد بررسی ۹۲/۲ درصد فاقد آلودگی، ۷/۸ درصد واجد آلودگی کلیفرمی و ۲/۷ درصد واجد کلیفرم گرم پای بودند (۲۸). فراوانی باکتری اشریشیاکلی در بین جدایه ها با توجه به منشاء

سلولی، فیزیولوژی و متابولیسم سلول نسبت دادند (۳۲). همانگونه که نتایج مربوط به تاثیر چهار نمونه از آنتی بیوتیک‌های رایج بر جدایه‌ها نشان می‌دهد، آنتی بیوتیک‌های نمونه نیز بیشترین تاثیر را بر باکتری‌های گرم مثبت دارند. البته با تنوع چشمگیری که در این صنعت وجود دارد، فراوانی آنتی بیوتیک‌های موثر بر باکتری‌های گرم منفی نیز قابل توجه است. نکته قابل ذکر در این مطالعه هزینه اثر بخشی مقرون به صرفه دندریمرها، عدم القاء مقاومت و یا مقاومت ارگانسیم‌ها نسبت به آنها و حداقل عوارض جانبی دندریمرها در مقایسه با آنتی بیوتیک‌ها است که آنها را از آنتی بیوتیک‌ها متمایز می‌نماید (۳۳-۳۵).

در نهایت تحلیل آماری داده‌ها نشان می‌دهد که دندریمر با غلظت‌های مطالعه شده کارایی بالایی آنتی باکتریالی مشابه آنچه در آنتی بیوتیک‌های رایج مشاهده میشود، از خود نشان می‌دهد. به طوری که دندریمر با غلظت‌های ۵۰ و ۵۰۰ توانسته است با آنتی بیوتیک‌هایی مانند تتراسایکلین و سیپروفلوکساسین در یک گروه قرار بگیرند که قدرت ضد باکتریالی آنها را نشان می‌دهد. همچنین گروه‌های دیگری نیز وجود دارند که تایید کننده قدرت آنتی باکتریالی غلظت‌های پایینتر از دندریمر میباشد. این نتایج میتواند امیدواری بالایی جهت کاربرد چنین دندریمرهایی را به عنوان جایگزین روش‌های رایج در کنترل آلودگی‌های میکروبی در آب و فاضلاب که دارای معایب تایید شده هستند را ایجاد کند، هر چند که مطالعات کمی تر و با حجم داده‌های بیشتر میتواند جهت تایید این مدعا بسیار سودمند باشد.

نتیجه گیری

دندریمرها گونه‌ای از مواد نانوساختار هستند که به دلیل شباهت ساختاری خود با انواع ماکرومولکول‌های حیاتی مانند پروتئین‌ها، می‌توانند به عنوان مواد ضد میکروبی ایمن و موثر مطرح شوند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که دندریمر پلی آمیدو آمین نسل چهار به گونه‌ای موثر قادر

دیده می‌شود. نتایج حداقل غلظت دندریمر که مانع رشد باکتری‌ها و همچنین باعث کشته شدن باکتری‌ها میگردد حاکی از آن است که دندریمر پلی آمیدو آمین نسل ۴ واجد خاصیت ضد میکروبی بوده و قادر است به عنوان ماده ضد میکروبی به کار گرفته شود (۲۶). تحقیقات پیشین نشان داده است که عموماً تخریب باکتری‌ها به وسیله مواد ضد باکتری بر اثر یکی از روش‌های تخریب غشای سیتوپلاسمی باکتری، تغییر شکل فضایی، تخریب آنزیم‌های باکتری، آسیب به کروموزوم و تخریب دیواره سلولی باکتری انجام می‌شود (۲۹). مشخص شده است که دندریمرها از طریق تخریب دیواره سلولی باکتری منجر به مرگ سلولی می‌شوند (۳۰). این نتیجه را می‌توان به حضور گروه‌های آمین انتهایی موجود در ساختار دندریمر نسبت داد که در واکنش با بار منفی غشاء سطحی میکرواورگانسیم‌ها، منجر به آسیب دیواره سلولی باکتری شده و بدین ترتیب از فعالیت آن جلوگیری می‌نماید (۲۱).
 نتوان عنوان نمود فعالیت ضد میکروبی دندریمرها به دلیل توانایی آنها در افزایش نفوذ پذیری غشاء باکتری‌ها بوده که در نهایت غلظت‌های بالاتر دندریمر منجر به تجزیه کامل غشاء باکتری و مرگ آن می‌شود. ضمناً اتصال دندریمر و سلول باکتری از طریق پیوندهای الکترواستاتیک ناشی از شارژ منفی سطح باکتری و شارژ مثبت دندریمر صورت می‌گیرد (۳۱). همانگونه که نتایج نشان می‌دهند، دندریمر پلی آمیدو آمین نسل ۴ به عنوان یک عامل ضد باکتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در دیواره سلولی و مقدار ماده سازنده غشاء پپتیدو گلیکان آنها است به گونه‌ای که لایه پپتیدو گلیکان در باکتری‌های گرم مثبت چند برابر ضخیم‌تر از باکتری‌های گرم منفی است. در مطالعه‌ای که توسط سلاواتین و همکاران انجام شد حساسیت بالاتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی گزارش شد و دلیل آن را به تفاوت در ساختمان دیواره

این مقاله مستخرج از بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی به شماره ۹۱/۶۸ مصوب مرکز تحقیقات بهداشت محیط کردستان و معاونت پژوهش و فناوری است که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شده است. لذا نویسندگان این مقاله از حامیان مالی طرح و همکاران اجرایی تشکر می‌نمایند.

به مقابله با برخی گونه‌های میکروبی است. لذا توسعه پژوهش‌ها بر روی نسل‌های مختلف این گونه از دندریمر همراه با گروه‌های عاملی مختلف می‌تواند ایده مناسبی در دستیابی به مواد آنتی باکتریال جدید همراه با اثر بخشی بیشتر و عوارض جانبی کمتر باشد.

تقدیر و تشکر

Reference

1. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews* 2013;26:822-80.
2. BLACK RE. Persistent diarrhea in children of developing countries. *The Pediatric infectious disease journal*. 1993;12:751-61.
3. Federation WE, Association APH. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA. 2005.
4. Furushita M, Shiba T, Maeda T, Yahata M, Kaneoka A, Takahashi Y, et al. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 2003;69:5336-42.
5. Toroglu S, Dincer S, Korkmaz H. Antibiotic resistance in Gram negative bacteria isolated from Aksu River in (Kahramanmaraş) Turkey. *Annals of Microbiology* 2005;55:229.
6. Baquero F, Martínez J-L, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology* 2008;19:260-265.
7. Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *Journal of Infection* 2009;59:S4-S16.
8. Gootz TD. The global problem of antibiotic resistance. *Critical ReviewsTM in Immunology*. 2010;30: 79-93
9. Reinthaler F, Posch J, Feierl G, Wüst G, Haas D, Ruckebauer G, et al. Antibiotic resistance of E. coli in sewage and sludge. *Water Research* 2003;37:1685-90.
10. de Brabander-van den Berg E, Meijer E. Poly (propylene imine) dendrimers: large-scale synthesis by heterogeneously catalyzed hydrogenations. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1993;32:1308-11.
11. Baars MW, Meijer E. Host-guest chemistry of dendritic molecules. *Dendrimers II*: Springer; 2000. p. 131-82.
12. Moritz M, Geszke-Moritz M. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chemical Engineering Journal* 2013;228:596-613.
13. Caminade A-M, Turrin C-O. Dendrimers for drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B* 2014;2:4055-66.
14. Salimpour Abkenar S, Malek RMA, Taher S. Effect of poly (propylene imine) dendrimer nano structure on antimicrobial property of cotton fabric. *Pejouhesh* 2012;36:11-8.

15. Calabretta MK, Kumar A, McDermott AM, Cai C. Antibacterial activities of poly (amidoamine) dendrimers terminated with amino and poly (ethylene glycol) groups. *Biomacromolecules* 2007;8:1807-11.
16. Lopez AI, Reins RY, McDermott AM, Trautner BW, Cai C. Antibacterial activity and cytotoxicity of PEGylated poly (amidoamine) dendrimers. *Molecular BioSystems*. 2009;5:1148-56.
17. Ghosh M. Synthetic macromolecules as potential chemotherapeutic agents. *Polym News* 1988;13:71-7.
18. Kourai H, Horie T, Takeichi K, Shibasaki I. The antimicrobial characteristics of quaternary ammonium salts and their alkyl chain length. *J Antibact Antifung Agents* 1980;8:9-17.
19. Chen CZ, Beck-Tan NC, Dhurjati P, van Dyk TK, LaRossa RA, Cooper SL. Quaternary ammonium functionalized poly (propylene imine) dendrimers as effective antimicrobials: structure-activity studies. *Biomacromolecules* 2000;1:473-80.
20. Jebelli MA, Kalantar E, Maleki A, Izanloo H, Gharibi F, Daraei H, et al. Antimicrobial activities of the polypropylene imine dendrimer against bacteria isolated from rural water resources. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 2015;10:11-17
21. Wang B, Navath RS, Menjoge AR, Balakrishnan B, Bellair R, Dai H, et al. Inhibition of bacterial growth and intramniotic infection in a guinea pig model of chorioamnionitis using PAMAM dendrimers. *International Journal of Pharmaceutics* 2010;395:298-308.
22. Meyers SR, Juhn FS, Griset AP, Luman NR, Grinstaff MW. Anionic amphiphilic dendrimers as antibacterial agents. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130:14444-5.
23. Ma M, Cheng Y, Xu Z, Xu P, Qu H, Fang Y, et al. Evaluation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as drug carriers of anti-bacterial drugs using sulfamethoxazole (SMZ) as a model drug. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2007;42:93-8.
24. Cheng Y, Qu H, Ma M, Xu Z, Xu P, Fang Y, et al. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as biocompatible carriers of quinolone antimicrobials: an in vitro study. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2007;42:1032-8.
25. Chen CZ, Cooper SL. Recent advances in antimicrobial dendrimers. *Advanced Materials* 2000;12:843-6.
26. Maleki A, Jebelli MA, Hayati B, Daraei H, Gharibi F. Antimicrobial effect of Poly (amidoamine)-G2 and G4 dendrimers on some bacteria in water resources. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences (JMUMS)* 2015;25:56-68
27. Jorgensen JH, Hindler JF, Reller LB, Weinstein MP. New consensus guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. *Clinical infectious diseases*. 2007;44:280-6.
28. Bay A, Poorshamsian K, Karimi K, Hashemi M, Maghsodlo B. Determination of bacteriological and physiochemical parameters of drinking water of Gorgan city, Iran (2010). *Medical Laboratory Journal* 2011;5:13-7.
29. Hebeish A, Hashem M, Abdel-Rahman A, El-Hilw Z. Improving easy care nonformaldehyde finishing performance using polycarboxylic acids via precationization of cotton fabric. *Journal of Applied Polymer Science* 2006;100:2697-704.
30. Good L. Antisense antibacterials. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2002;12:1173-9.
31. Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 1992;257:1064-73.
32. Selahattin A, Kadri G, Ramazan C. Effect of zinc on microbial growth. *Tr J Med Sciences* 1998;28:595-7.

- 33.Pankhurst Q, Thanh N, Jones S, Dobson J. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2009;42:68-75.
- 34.Cohen H, Levy R, Gao J, Fishbein I, Kousaev V, Sosnowski S, et al. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Therapy* 2000;7:1896-905
- 35.Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *Chem Med Chem* 2007;2:129-36.