

بررسی اثر ضد میکروبی فیلم و ژل کیتوزان حاوی نانوذرات رامنولپید تولیدی از باکتری سودوموناس آئروژینوزا بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلی

مریم کاظمیان^۱، حسین امانی^۱، علی رستگاری^۲، شکوفه ملک محمودی^۱، مهدی اقسامی^۲

(۱) گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، مازندران، ایران.

(۲) گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

*نشانی برای مکاتبه: hamani@nit.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: اخیراً مقاومت باکتری ها در مقابل آنتی بیوتیک ها یکی از مهم ترین چالش های علم پزشکی شده، از این رو مطالعات زیادی برای گسترش ترکیبات ضد میکروبی جهت درمان با روش های نوین انجام شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات ضد میکروبی فیلم و ژل کیتوزان به همراه نانو ذرات رامنولپید تولید شده از سودوموناس آئروژینوزا بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلی می باشد.

روش بررسی: در مطالعه حاضر، نانوذرات رامنولپید با فرمولاسیون ژل و فیلم تهیه شده و توسط آنالیزهای پراکندگی نور دینامیکی، طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه [FTIR] و میکروسکوپ الکترونی روبشی مشخصه یابی شدند. فعالیت ضد باکتریایی فیلم و ژل کیتوزان و نانوذرات رامنولپید در مقابل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلی با حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشندگی و قطر ناحیه مهار رشد بررسی شد.

یافته ها: اندازه نانوذرات رامنولپید کمتر از ۵۰ نانومتر گزارش شد، بیشترین اثر ضد میکروبی در ماده فیلم کیتوزان ۲٪ با نانوذرات رامنولپید بر روی دو میکروارگانیزم مشاهده گردید که قطر هاله ایجاد شده در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۳۸ میلی متر و MIC برابر با ۶/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر و در MBC برابر با ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر است، اثر آنتی باکتریال همین ماده در اشیریشیا کلی با قطر هاله ۲۷ میلی متر، MIC برابر با ۱۲/۵ میکرولیتر و MBC برابر با ۲۵ میکرولیتر مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که همراه کردن فیلم و ژل کیتوزان با نانوذرات رامنولپید و نانوفرموله کردن آن ها استراتژی مناسبی به جهت افزایش اثرات ضد میکروبی آن است. اما برای تایید آن باید مطالعات بالینی انجام گیرد.

کلیدواژه: اثرات ضد باکتری، نانوذرات، رامنولپید، کیتوزان

مقدمه

ها افزایش یافته و منجر به افزایش عفونت و طولانی شدن مدت زمان بهبودی شده است (۲). میکروارگانیزم استافیلوکوکوس اورئوس کوکسی گرم مثبت، کوآگولاز مثبت و خوشه ایی شکل از خانواده استافیلوکوکاسه و یک عامل عفونت فرصت طلب در انسان است (۳). این باکتری به دلیل افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و علاوه بر این از مهمترین و فراوانترین عوامل عفونت های بیمارستانی در سرتاسر جهان بشمار می رود (۴،۵). میکروارگانیزم اشیریشیا کلی باسیل گرم منفی، بی هوازی اختیاری، متحرک،

عفونت زخم یکی از شایع ترین عوارض جانبی است که می تواند مربوط به محیط های مرطوب و گرم در محل زخم باشد (۱). با توجه به استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک ها برای ترمیم زخم، مقاومت سویه های مختلف مانند استافیلوکوکوس اورئوس^۱، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس^۲، اشیریشیا کلی^۳ و سودوموناس آئروژینوزا^۴ در برابر آنتی بیوتیک

¹ *Staphylococcus aureus*

² *Staphylococcus epidermidis*

³ *Escherichia coli*

⁴ *Pseudomonas aeruginosa*

خاصیت آنتی باکتریالی نانورامنولپید بر روی زخم ها ارائه نشده است. لذا هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات ضد میکروبی فیلم و ژل کیتوزان به همراه نانو ذرات رامنولپید تولید شده از سودوموناس آئروژینوزا بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و شریشیا کلی می باشد.

روش بررسی

در این مطالعه باکتری سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 از شرکت داروآش به صورت کشت زنده خریداری شد و سویه های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس ATCC29213 گرم مثبت و شریشیا کلی IBRC-M 10708 گرم منفی برای سنجش فعالیت ضد باکتریایی استفاده شدند.

جهت تولید رامنولپید از محیط کشت LB^{۱۳} به عنوان پیش کشت استفاده شد. سپس در شرایط استریل، یک لوپ از باکتری سودوموناس آئروژینوزا به محیط پیش کشت (مایع) تلقیح شد. برای تهیه محیط کشت اصلی ابتدا محلول A شامل ۰/۵ g/L، NaNO₃؛ ۱۵ g/L، KCl؛ ۱ g/L، MgSO₄.7H₂O؛ ۶/۲۷ g/L؛ Na₂HPO₄ و ۱۰/۱۱ g/L و محلول B شامل ۱۲۵ g/L؛ روغن آفتابگردان به طور جداگانه اتوکلاو شدند و محلول C شامل ۲ g/L Na-Citrat؛ ۰/۲۸ g/L، ZnSO₄.7H₂O؛ ۱/۴ g/L، FeCl₃.6H₂O؛ ۰/۸ g/L، CuSO₄.5H₂O؛ ۱/۲ g/L، CoCl₂.6H₂O؛ ۰/۲۲ g/L، MnSO₄.H₂O؛ به دلیل حساس بودن به دما بعد از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی استریل شد. سپس زیر هود با یکدیگر مخلوط شدند و به مدت ۱۶۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه، درون شیکر انکوباتور قرار داده شد. جهت تولید نانوذرات رامنولپید، توسط سمپلر ۱۰۰۰ میکرولیتری مقدار ۲ میلی لیتر از رامنولپید به ۱ میلی لیتر آب اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط سونیکه شد.

تولید ژل و فیلم کیتوزان به همراه رامنولپید

برای تهیه ژل و فیلم از کیتوزان با وزن مولکولی بالا استفاده شد. ابتدا محلول کیتوزان ۲٪ (w/v) با استفاده از اسید استیک ۱٪ (v/v) تهیه شد. سپس گلیسرین ۷/۵٪ (w/v) به عنوان نرم کننده اضافه شد و نانوذرات رامنولپید ۰/۱٪ (w/v) توسط سمپلر به محلول همگن به دست آمده اضافه شد. جهت ژل سازی، محلول به دست آمده را در یک پتری دیش با قطر ۸ سانتی متر ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق درون راکتور شیشه ای حاوی ۰/۵ NH₄OH مولار قرار داده شد. بعد

خون گرم است (۶). این باکتری از طریق انتقال مدفوعی دهانی ممکن است - به غذاهای سرد مانند: سالاد، ساندویچ های سرد که حرارت داده نمی شوند منتقل شود و دیگران را آلوده کند (۷). اگرچه معمولاً سویه های مختلف شریشیا کلی غیر بیماری زا هستند اما با بدست آوردن ژن های بیماری زا سبب ایجاد بیماری در انسان و حیوانات می شوند (۸).

زخم^۵ به عنوان آسیب و هرگونه اختلال در ساختار پوست تعریف می شود، هدف از درمان زخم پیشگیری از عفونت و بسته شدن آن توسط بافت های جدید می باشد (۱). اما درمان موضعی با فرمولاسیون معمولی نفوذ ضعیفی به عمیق ترین لایه های پوست دارند (۹) و گاهی باعث بروز عوارض جانبی (مانند حساسیت، عفونت) و درماتیت تماسی آلرژیک می شوند (۱۰). برای رفع این مشکل، پانسمان زخم بر پایه پلیمرهای طبیعی به عنوان کارآمدترین و مؤثرترین روش درمانی پیشنهاد شده است (۱۱). کیتوزان^۶ یک بیوپلیمر است که بر اساس خواص جالب آن از جمله زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری، غیرسمی بودن، اثر ضد میکروبی و اثر هموستاتیک، ماده ایده آلی برای پانسمان زخم است (۱۲).

مطالعات اخیر نشان داده اند که پانسمان های زخم مبتنی بر کیتوزان می تواند برای ترمیم زخم ها موثر باشد اما به تنهایی کافی نیست و به اجزای بیشتری در فرمولاسیون خود نیاز دارد تا اثربخشی بالایی در برابر عفونت میکروبی مربوط به ناحیه زخم داشته باشد (۱۳). امروزه علم بیوتکنولوژی با کشت میکروبی^۷ به تولید متابولیت های ثانویه کمک می کند که دارای خواص بیولوژیکی فراوان به ویژه خواص ضد باکتریایی هستند (۱۴). رامنولپید^۸ به عنوان متابولیت ثانویه از کشت باکتری سودوموناس آئروژینوزا تولید شده و دارای دو نوع مونورامنولپید^۹ و دی رامنولپید^{۱۰} بوده و اثرات ضد باکتریایی بسیار خوبی در برابر باکتری های گرم مثبت^{۱۱} و گرم منفی^{۱۲} نشان داده است (۱۵). گزارشات زیادی در مورد خاصیت آنتی باکتریالی بیوسورفکتانت رامنولپید و خاصیت تسریع در ترمیم زخم بیوپلیمر کیتوزان وجود دارد اما تاکنون گزارشی در مورد

⁵ Wound

⁶ Chitosan

⁷ In vitro

⁸ Rhamnolipid

⁹ Monorhamnolipid

¹⁰ Dirhamnolipid

¹¹ Grampositive

¹² Gramnegative

بالا محلول کیتوزان ۳٪ (w/v) بدون گلیسرین تهیه شد
(۱۶).

خاصیت ضد میکروبی

فعالیت ضدباکتریایی ترکیبات با استفاده از قطر هاله (دیسک
دیفیوژن)، حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت
کشندگی باکتری (MBC) مورد بررسی قرار گرفت. سویه های
استاندارد/ستافیلوکوکوس/اورئوس ATCC29213 گرم مثبت و
اشریشیاکلی IBRC-M 10708 گرم منفی برای سنجش
فعالیت ضد باکتریایی استفاده شدند (۱۷). به طور خلاصه،
کشت تازه ای از سویه های آزمایشی در محیط LB برات تهیه
شد. ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به صورت سریالی در LB برات
با رقت ۰/۵ رقیق شد.

سپس میکروتیوب ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در انکوباتور در
دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس رشد قابل
مشاهده باکتری ها به صورت چشمی با توجه به کدر بودن
میکروتیوب ها مشاهده و حداقل غلظت مهار رشد باکتری ها و
حداقل غلظت کشندگی تعیین شد. جهت آزمون قطر هاله
(دیسک دیفیوژن)، برای هر نمونه یک پلیت پلاستیکی استریل
با قطر ۸ سانتی متر حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه
و روی هر کدام باکتری ها به صورت چمنی رشد داده شد، به
مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور
قرار داده شد، بعد از آلوده نبودن محیط کشت ها، ۵۰
میکرولیتر از نمونه ژل کیتوزان ۳٪ و فیلم ژل کیتوزان ۲٪ و
نانوذرات ۰/۱٪ در دیسک استریل استاندارد و بر روی ماده
مغذی مولر هینتون آگار قرار داده شد. سپس مجدد به مدت

۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار
داده شد، هاله عدم رشد بر حسب میلی متر بیان می شود.

آنالیزها

جهت اثبات تولید رامنولیپید از آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک
استفاده شد. در ابتدا جهت انجام این آنالیز، کاغذ TLC
(کد ۱۰۵۵۵۴مرک) آماده شد. سپس با سمپلر ۵ میکرولیتری
مقداری از بیوسورفکتانت برداشته و با فاصله ی مشخص روی
کاغذ TLC نقطه گذاری شد. کاغذ درون فاز متحرک شامل
 $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{CH}_3\text{OH} : \text{CHCl}_3$ با نسبت حجمی (۲:۱۵:۶۵)
قرار گرفت، پس از آن درون محلول آشکارساز شامل
 $\text{CH}_3\text{COOH} : \text{H}_2\text{SO}_4 : \text{Anisaldehyde}$ با نسبت حجمی
(۱۰:۲:۱) قرار داده شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، کاغذ از
محلول خارج و به مدت ۱۵ دقیقه درون آون با دمای ۱۵۰
درجه سانتی گراد قرار داده شد، سپس لکه های زرد رنگ روی
کاغذ ظاهر شد که مربوط به رامنولیپید بود. با توجه به فاصله ی
طی شده ماده و ظهور لکه ها، جهت تشخیص نوع رامنولیپید از
فاکتور تاخیر^{۱۴} R_f ، رابطه (۱) استفاده شد (۱۸). آنالیز
طیفسنجی مادون قرمز تبدیل فوریه جهت شناسایی گروه
عاملی بیوسورفکتانت تولید شده انجام شد و همچنین آنالیز
پراکندگی نور پویا جهت اندازه گیری توزیع اندازه ذرات
رامنولیپید و آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی
جهت اندازه نانوذرات و کروی بودن آن انجام شد.

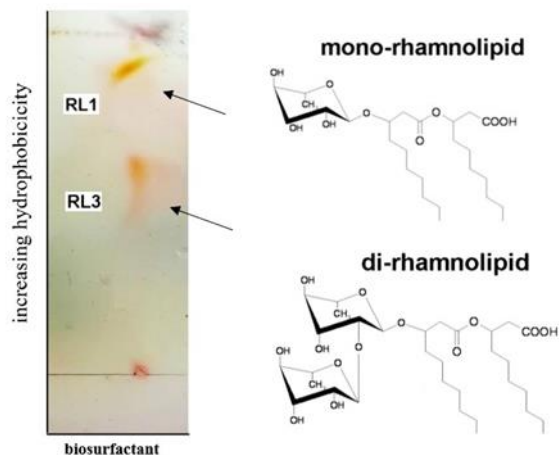
رابطه ۱

$$R_f = \frac{\text{فاصله طی شده توسط ماده مورد نظر}}{\text{فاصله طی شده توسط حلال}}$$

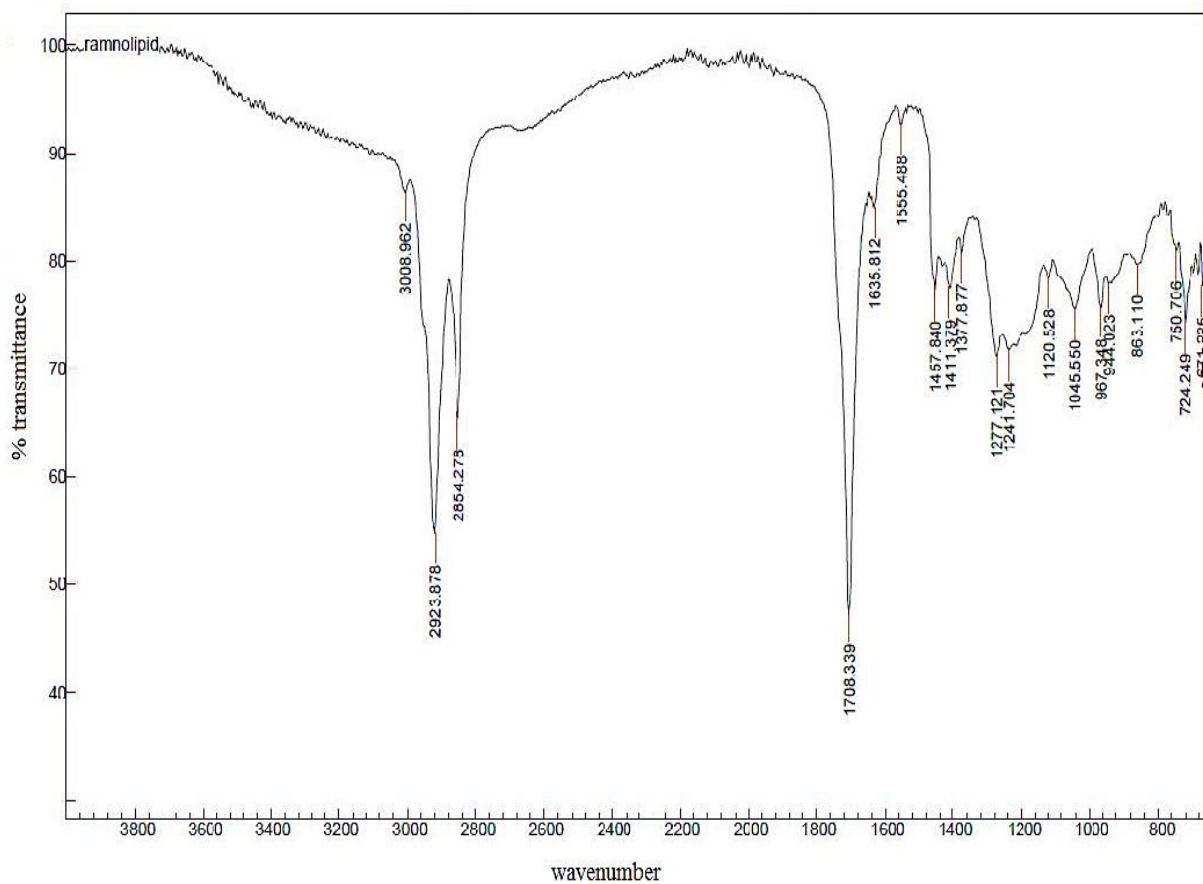
یافته ها

دادند. نتایج به دست آمده نشان می دهد که هر دو نوع رامنولیپید تولید شده است. مورفولوژی نانوذرات رامنولیپید تولید شده با استفاده از FESEM مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از این آنالیز در شکل (۳) نشان دهنده این است که قطر نانوذرات رامنولیپید کمتر از ۵۰ نانومتر است و به صورت کروی در آب پراکنده شده اند. پراکنندگی نور پویا برای ارزیابی قطر نانوذرات رامنولیپید کروی، PDI و زتا پتانسیل انجام شد. منحنی های توزیع اندازه شکل (۴،۵) نشان داد که بیش از ۲۰ درصد از نانوذرات قطری کمتر از ۵۰ نانومتر دارند. ذرات کروی تولید شده با PDI ۰/۷ توزیع یکنواخت دارند. و با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل مقدار Z-average و ZPs به ترتیب ۲۴۱/۲ و -۱۴ mv می توان گفت که رامنولیپید تولید شده دارای درجه پایداری خوبی است.

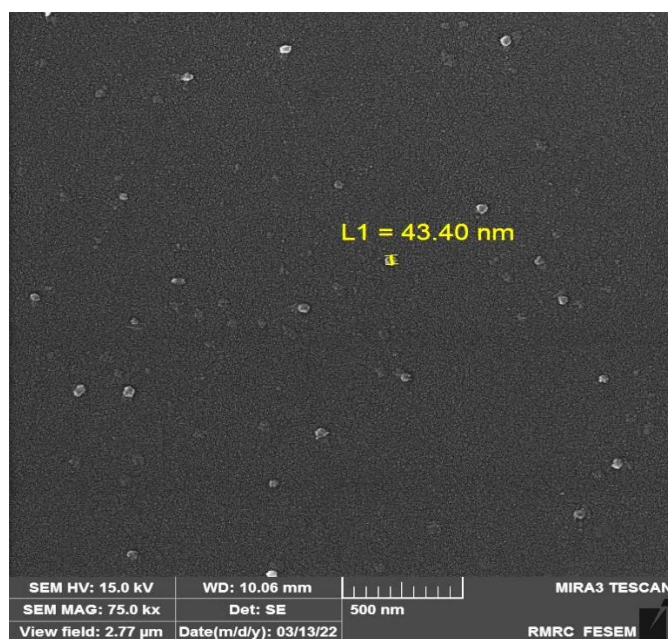
در این مطالعه بعد از قرار گرفتن کاغذ TLC در فاز متحرک، با حرکت حلال های مختلف مانند کلروفرم یا متانول لکه های زرد رنگی روی کاغذ به جای می ماند. نتایج این آنالیز در شکل (۱) نشان داده شده است. فاکتورهای تاخیر بدست آمده در آنالیز TLC برابر ۰/۶۵ و ۰/۳۸ می باشند. برای تایید بیشتر تولید رامنولیپید، آنالیز FTIR نیز انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل FTIR در شکل (۲) نشان داده شده است. جذب در $2923,878 \text{ cm}^{-1}$ و $2854,278 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب مربوط به پیوند C-H در CH_2 و CH_3 است. جذب در $3008,962 \text{ cm}^{-1}$ توسط پیوند O-H گروه هیدروکسیل ایجاد شده و جذب در $1708,339 \text{ cm}^{-1}$ و $1457,840 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده نشان دهنده پیوندهای C=O و C=C است. همچنین پیوندهای مربوط به O-C-O جذب $1277,121 \text{ cm}^{-1}$ را نشان



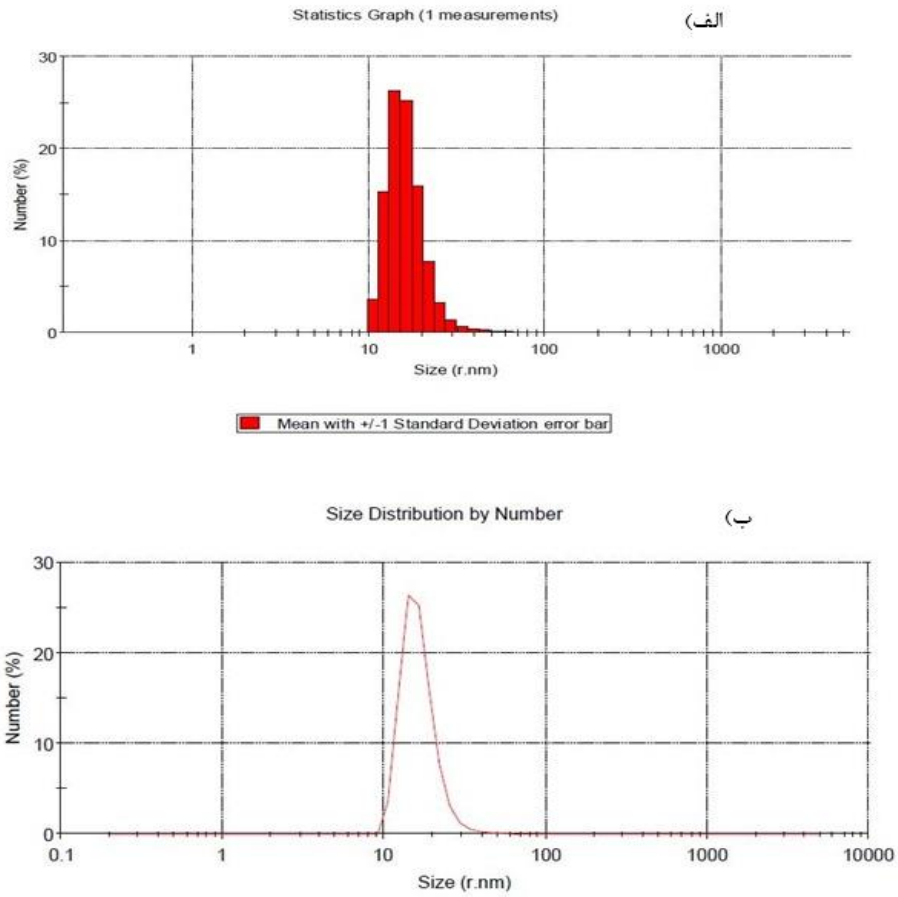
شکل ۱- نتیجه آنالیز TLC که نشان دهنده تولید رامنولیپیدهای نوع ۱ و ۳ از باکتری سودوموناس آئروژینوزا می باشند.



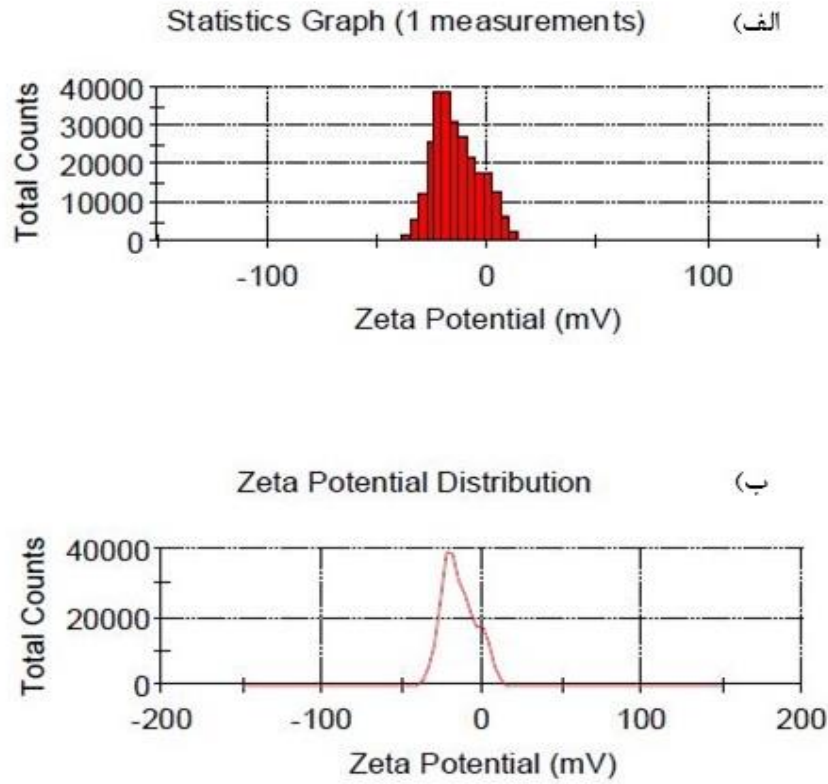
شکل ۲- طیف جذبی آنالیز FTIR رامنولیپید تولید شده از باکتری سودوموناس آئروژینوزا



شکل ۳- نتیجه آنالیز FESEM نانوذرات رامنولیپید با قطری کمتر از ۵۰ نانومتر



شکل ۴ - نتیجه آنالیز DLS پراکندگی نور پویا الف) نمودار آماری و ب) منحنی توزیع اندازه ذرات رامنولپید تولید شده از باکتری سودوموناس آئروژینوزا



شکل ۵ - نتیجه آنالیز Zeta (الف) نمودار آماری و (ب) توزیع پتانسیل زتای ذرات رامنولیپید تولید شده از باکتری سودوموناس آئروژینوزا

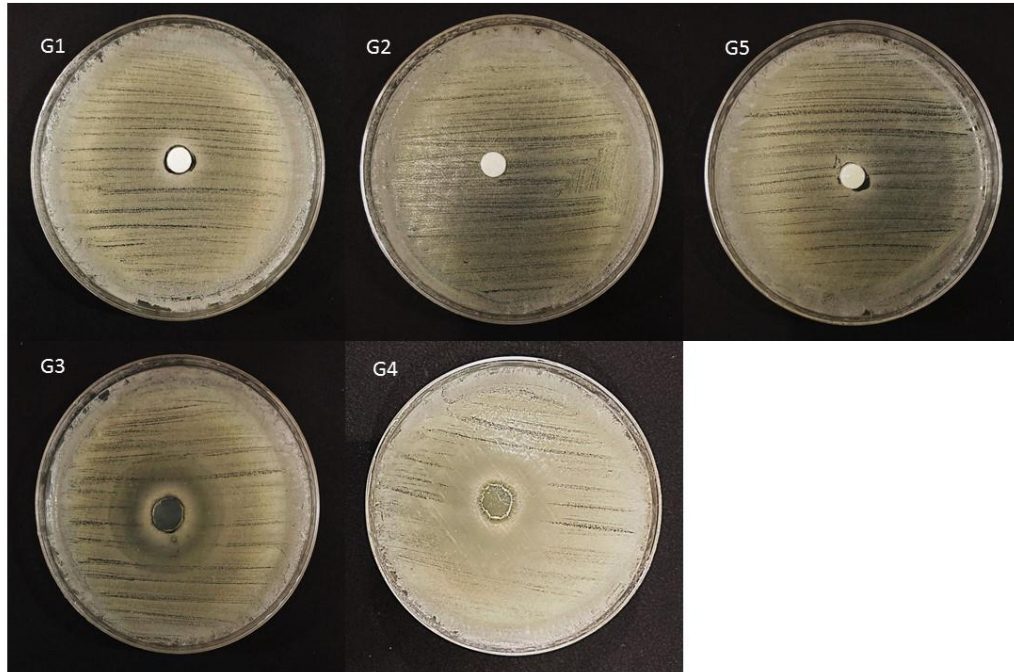
خاصیت ضد میکروبی

میکروگرم در میلی لیتر است، اثر آنتی باکتریال همین ماده در *اشریشیا کلی* با قطر هاله ۲۷ میلی متر، MIC برابر با ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر و MBC برابر با ۲۵ میکرولیتر مشاهده شد. به طور کلی ماده های تولید شده در مقابل باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* نتایج بهتری نسبت به باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* داشتند. نتایج در جدول ۱ و شکل (۶،۷) گزارش شده است.

در این مطالعه از دو سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 29213) و *اشریشیا کلی* (IBRC-M 10708) جهت تعیین مقدار MIC و MBC استفاده شد. بیشترین اثر آنتی باکتریال در ماده فیلم کیتوزان ۲٪ با نانوذرات رامنولپید بر روی دو میکروارگانسیم مشاهده گردید که قطر هاله ایجاد شده در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۳۸ میلی متر و MIC برابر با ۶/۲۵ میکرولیتر و در MBC برابر با ۱۲/۵

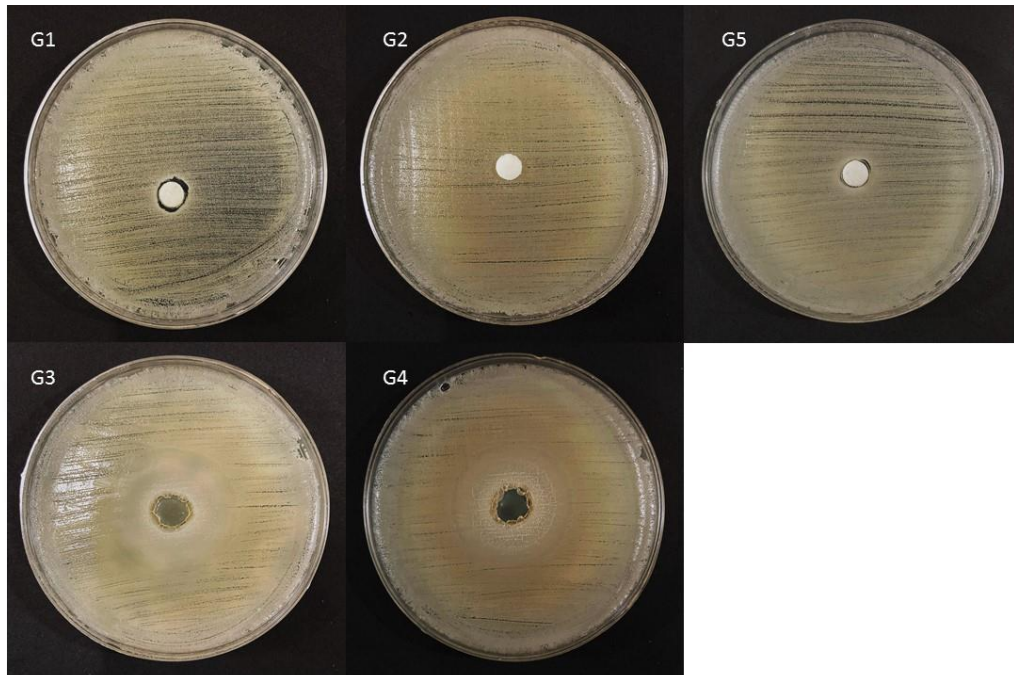
جدول ۱ - نتیجه آنالیزهای قطر هاله (دیسک دیفیوژن)، حداقل غلظت مهار رشد و حداقل غلظت کشندگی باکتری نمونه ها در مقابل باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

قطر هاله (میلی متر)	حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم در میلی لیتر)	حداقل غلظت مهار رشد (میکروگرم در میلی لیتر)	باکتری	
			<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	<i>اشریشیا کلی</i>
۱۳	۲۵	۱۲/۵	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	<i>اشریشیا کلی</i>
۱۱	۵۰	۲۵	<i>اشریشیا کلی</i>	<i>اشریشیا کلی</i>
۰	۵۰	۲۵	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	<i>اشریشیا کلی</i>
۰	۰	۰	<i>اشریشیا کلی</i>	<i>اشریشیا کلی</i>
۳۸	۱۲/۵	۶/۲۵	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	<i>اشریشیا کلی</i>
۲۷	۲۵	۱۲/۵	<i>اشریشیا کلی</i>	<i>اشریشیا کلی</i>
۳۰	۰	۰	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	<i>اشریشیا کلی</i>
۱۸	۰	۰	<i>اشریشیا کلی</i>	<i>اشریشیا کلی</i>
۱۱	۲۵	۱۲/۵	<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	<i>اشریشیا کلی</i>
۹	۵۰	۲۵	<i>اشریشیا کلی</i>	<i>اشریشیا کلی</i>



شکل ۶- قطر هاله نمونه های G1 ژل کیتوزان ۳٪ با نانوذرات، G2 ژل کیتوزان ۳٪ بدون نانوذرات، G3 فیلم کیتوزان ۲٪ با نانوذرات، G4 فیلم کیتوزان ۲٪ بدون

نانوذرات، G5 نانوذرات رامنولپید در مقابل باکتری *E. coli*



شکل ۷- قطر هاله نمونه های G1 ژل کیتوزان ۳٪ با نانوذرات، G2 ژل کیتوزان ۳٪ بدون نانوذرات، G3 فیلم کیتوزان ۲٪ با نانوذرات، G4 فیلم کیتوزان ۲٪ بدون نانوذرات، G5 نانوذرات رامنولپید در مقابل باکتری *S. aureus*

بحث

عفونت در زخم ها باعث افزایش طول درمان می شود، همچنین بر کیفیت زندگی بیماران و افزایش هزینه های درمان موثر است و *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از باکتری های شایع در ایجاد عفونت زخم های بیمارستانی می باشد (۱۹).

باتوجه به موثر بودن متابولیت های ثانویه تولید شده از علم بیوتکنولوژی، بیوسورفکتانت رامنولپید در ابعاد نانو تولید شد. در مطالعه دیبیکا کی وی و همکاران در سال ۲۰۱۵ رامنولپید نوع ۱ و ۳ تولید شد که نوع ۱ آن مونو رامنولپید و نوع ۳ آن دی رامنولپید می باشد و R_f برای هر کدام به ترتیب ۰/۷۱ و ۰/۳۱ تعریف شده است. باتوجه به آنالیز TLC در این گزارش رامنولپید های تولید شده دارای R_f به ترتیب ۰/۶۵ و ۰/۳۸ می باشند که نوع ۱ و ۳ رامنولپید با توجه به مطالعه آنها تایید شد (۲۰).

در بررسی ذوالفقار و همکاران در سال ۲۰۱۴ مورفولوژی و پیوند های درونی رامنولپید با طیف جذبی آنالیز FTIR مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاضر در این مطالعه نشان می دهد پیوند های موجود در مونورامنولپید و دی رامنولپید تولید شده از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* تشکیل شده و ماده مورد نظر تولید شده و دارای درجه پایداری خوبی است (۲۱). کیتوزان یک بیوپلیمر است که در مطالعات متعددی خاصیت ضدباکتری بودن آن تایید شده اما در برخی مطالعات اشاره شده که کیتوزان به تنهایی تاثیرات کافی را نداشته و نیاز است از ترکیبات دیگری استفاده شود (۱۳).

در مطالعه ای توسط باقری و همکاران در سال ۲۰۲۰ طی آزمایشاتی اثر مهارکنندگی رامنولپیدهای حاصل از باکتریهای *سودوموناس آئروژینوزا* MR01 بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* را با استفاده از روش انتشار دیسک بررسی کردند. سپس تاثیر ترکیبات دی رامنولپیدی بر کشندگی و مورفولوژی باکتری ها با استفاده از روش شمارش واحدهای کلنی (CFUs) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مطالعه شده است. در ادامه، کرم حاوی ترکیبات دی رامنولپیدی تهیه و تاثیر آن بر مهار رشد باکتری ها در شرایط آزمایشگاهی و نیز در مدل حیوانی سنجش کردند. و به این نتیجه رسیدند که محلول آبی دی رامنولپیدها از غلظت ۲۰ mg/ml موجب کشندگی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شد. ویژگی قدرت مهار رشد باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* با مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۲).

مطالعه کریستین مارنگون و همکاران در سال ۲۰۲۰ با ترکیب نانوذرات رامنولپید و نانوذرات کیتوزان خاصیت ضدباکتریایی

آن را در برابر سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* DSM 1104 با استفاده از آنالیز حداقل غلظت مهار رشد و حداقل غلظت کشندگی باکتری مورد بررسی قرار دادند و مقادیر آن به ترتیب ۱۴/۱۹ میکروگرم در میلی لیتر و ۲۹/۳۷ میکروگرم در میلی لیتر مشاهده کردند و به این نتیجه رسیدند که نانوذرات کیتوزان و کیتوزان باکتری های موجود در قسمت های بالایی بیوفیلم ها را از بین می برند، در حالی که نانوذرات رامنولپید/کیتوزان مؤثرتر بوده و اکثر باکتری های بی حرکت را ریشه کن می کردند و اثر ضد باکتریایی نانوذرات رامنولپید/کیتوزان در مقابل باکتری های گرم مثبت بهتر بود. خاصیت ضد میکروبی آنها کمتر از گزارش حاضر است اما همسو با مطالعه حاضر می باشد، در گزارش حاضر مقادیر حداقل غلظت مهار رشد ۶/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی باکتری ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر مشاهده شد (۲۳). همچنین در مطالعه حاضر ژل کیتوزان ۳٪ بدون قطرهاله در هردو باکتری و مقدار حداقل غلظت مهار رشد و حداقل غلظت کشندگی باکتری برابر با صفر گزارش گردید، که این نتیجه ممکن است به دلیل ویسکوز بودن ماده باشد که نیاز به زمان بیشتری برای انتشار دارد.

نتیجه گیری

علی رغم پیشرفت آنتی بیوتیک ها امروزه مقاومت باکتری ها یکی از مهم ترین چالش های علم پزشکی است. *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از باکتری های شناخته شده مسبب عفونت در زخم ها و جراحات است. پژوهش حاضر نشان دهنده این است که کیتوزان همراه با نانوذرات رامنولپید تولید شده از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در مقابل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و اشریشیاکلی خاصیت ضدباکتری داشته همچنین نتایج نشان داد که فیلم کیتوزان ۲٪ با نانوذرات رامنولپید نتیجه بهتری نسبت به ژل کیتوزان ۳٪ با نانوذرات رامنولپید داشته است. بنابراین ترکیب کیتوزان و نانوذرات رامنولپید یک استراتژی امیدوارکننده برای طراحی نانوذرات جدید با خاصیت ضدباکتری ارائه می کند که می تواند در صنایع دارویی و غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از پایان نامه مریم کاظمیان می باشد که تمام مراحل پایان نامه با هزینه شخصی انجام شده است. از جناب آقای جاوید تقی نژاد که در مراحل نگارش مقاله کمک های بی دریغی کردند تشکر و قدردانی می شود.

REFERENCE

- 1) S. Sana, S. Datta. Excision wound healing activity of a common biosurfactant produced by *Pseudomonas sp.* 2018; 5-11.
- 2) H. Tawisarkani, F. Sedaghat. Chitin and chitosan: structure, properties and applications. 2012; 2(3): 26-40.
- 3) Y. Gordon, C. Cheung, S. Justin. O. Michael. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. 2021; 547-569.
- 4) S. Dibah, M. Arzanlou, E. Jannati, R. Shapouri. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens in Ardabil, Iran. Iranian journal of microbiology, 2014; 6(3): 163.
- 5) Harris, L. G., Foster, S. J., & Richards, R. G. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. Eur Cell Mater, 2020; 4(3): 100-20.
- 6) H. Mirsepasi, B. Andrew Vallance, K. Angeliki, A. Munk Petersen. *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. 2019; 32(2): 124-131.
- 7) Wolfram T, MS, RDN, LDN. Most common food borne pathogens. Eat right. Academy of nutrition and dietetics food safety. 2017.
- 8) Frederic, H. Chen, H. Jung, C. Tsuei, C. Liao Converting *Escherichia coli* to a Synthetic Methyloph growing solely on Methanol, 2020; 933-946.
- 9) D. Bonamonte¹, A. De Marco, R. Giuffrida, C. Conforti, Ch. Barlusconi¹, C. Foti¹, P. Romita¹. Topical antibiotics in the dermatological clinical practice: indications, efficacy and adverse effects. 2020; 33(6).
- 10) E. Galindo, A. Hebert. A comparative review of current topical antibiotics for impetigo, 2021; 20(6):677-683.
- 11) Jabbari, K. Parivar, N. Hayati Roodbari. Effect of Chitosan Nanoparticles in the treatment of burns. 2015; 3-9.
- 12) H. Liu, C. Wang, C. Li, Ch. Qin, W. Yanguo, Zh. Yang, F. Li, Z. Wang, J. Cheng. a functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing, 2018; 8(14): 7533-7549.
- 13) Y. Gao, Y. Wu. Recent advances of chitosan-based nanoparticles for biomedical and biotechnological applications. 2022; 203: 379-388.
- 14) C. Shen, L. Jiang, H. Shao, C. You, G. Zhang, S. Ding, T. Bian, C. Han, Q. Meng. Targeted killing of myofibroblasts by biosurfactant di-rhamnolipid suggests a therapy against scar formation. 2016; 6: 1-10.
- 15) T. Stipcevic, A. Piljac, G. Piljac. Enhanced healing of full-thickness burns wounds using di-rhamnolipid. 2006; 32(1): 24-34.
- 16) P. Sacco. S. Pedroso, Y. Kumar, N. Joly, P. Martin, P. Bocchetta. Iontropic Gelation of Chitosan Flat Structures and Potential Applications, 2021; 26(3): 660.
- 17) V. Thomas, M. Yallapu, B. Sreedhar. Fabrication, Characterization of Chitosan / Nanosilver Film and Its Potential Antibacterial Application. 2012; 37-41.
- 18) E. Khare, N. Arora. Biosurfactant based formulation of *Pseudomonas guariconensis* LE3 with multifarious plant growth promoting traits controls charcoal rot disease in *Helianthus annuus*. 2021; 37(4): 1-14.
- 19) J. Ward, J. Holden, M. Grob. Management of wounds in the community: five principles Lead Nurse for Plastic Surgery 1 Mark Soldin. 2019; 20-23.
- 20) K. Deepika, P. Ramu Sridhar, P. Bramhachari. Characterization and antifungal properties of rhamnolipids produced by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain KVD-HM52. 2015; 4(4): 608-615.

- 21) Z. Raza, Z. Khalid, I. Banat. Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. 2014; 44(13): 1367–1373.
- 22) T. Bagheri, K. Rahimi, T. Lotfabad. Effects of cream containing rhamnolipid microbial surfactants from *pseudomonas aeruginosa* mr01 on growth inhibition of *staphylococcus aureus*. 2020; 30(184): 14–27.
- 23) C. Marangon, V. Martins, M. Ling, C. Melo, A. Plepis, R. Meyer, M. Nitschke. Combination of Rhamnolipid and Chitosan in Nanoparticles Boosts Their Antimicrobial Efficacy. 2020; 12(5): 5488–5499.

