

Antibacterial Effect of Synthetized Selenium Nanoparticles and Ampicillin-Selenium Nanoparticles against Clinical Isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

Maryam Alsadat Mehrbakhsh Bandari¹, Leila Asadpour¹, Afshin Pourahmad²

1.Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

2.Department of Chemistry, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2017/08/07

Accepted: 2018/01/14

Available online: 2018/02/19

Article Subject:

Antimicrobial Substance

IJMM 2018; 11(6): 184-191

Corresponding author:

Leila Asadpour

Department of Biology, Rasht
Branch, Islamic Azad
University, Rasht, Iran

Tel: 09113383860

Email:

L.asadpour@yahoo.com



Abstract

Background and Aims: Drug resistance, particularly methicillin resistant in *Staphylococcus aureus* strain is a major worldwide public health concern. The present study aimed to synthesize selenium nanoparticles, investigate its antibacterial effect and its ability to be used as ampicillin nanocarrier.

Materials and Methods: Selenium nanoparticles were synthesized via chemical regeneration of sodium selenite by L-cysteine amino acid. Loading of ampicillin on the surface of selenium nanoparticles was done by gradual addition of antibiotic to nanoparticle solution and continuous shaking. Then this attachment was investigated by using UV-Vis spectroscopy, XRD and scanning electron microscope. Antibacterial properties of produced selenium nanoparticles and antibiotic loaded selenium nanoparticles against standard strain of *S. aureus* and 10 methicillin resistant *S. aureus* strains were tested by disc diffusion method. Minimum inhibitory concentration (MIC) of bacterial growth was determined by broth macrodilution method.

Results: The produced selenium nanoparticles showed antibacterial effect against all strains of *S. aureus*. Loading of ampicillin on the surface of selenium nanoparticles enhanced the antimicrobial activity of this drug. The mean MIC of selenium nanoparticles against *S. aureus* strains ranged between 7.8-62.5 µg/mL free form of ampicillin between 62.5- 250 and ampicillin bound to nanoparticles was 7.8-7.8 µg / mL. These values for standard strain of *Staphylococcus aureus* strains were 7.8, 31.2 and 3.9 µg / mL, respectively. Loading of ampicillin on the surface of selenium nanoparticles enhanced the MIC against methicillin resistant *S. aureus*.

Conclusions: The obtained results confirmed antibacterial activity of selenium nanoparticles. Enhancing the antibacterial activity of antibiotics loaded on the surface of nanoparticles, increases the possibility of application of these drugs especially for the elimination of hard-to-heal infective diseases.

Keywords: Selenium Nanoparticles (Se NPs), Antibacterial Activity, Methicillin Resistant *S. aureus*, Ampicillin

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Mehrbakhsh Bandari M A, Asadpour L, Pourahmad A. Antibacterial Effect of Synthetized Selenium Nanoparticles and Ampicillin- Selenium Nanoparticles against Clinical Isolates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. Iran J Med Microbiol. 2018; 11 (6) : 184 -191



اثر ضد باکتریایی نانوذرات سلنیوم و آمپی سیلین بر جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین

مریم‌السادات مهربخش بندری^۱، لیلا اسدپور^۱، افشین پوراحمد^۲

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲. گروه شیمی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۶

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM1396;11(6): 184-191

نویسنده مسئول:

لیلا اسدپور

گروه زیست‌شناسی، واحد رشت،
دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

تلفن: ۰۹۱۱۳۳۸۳۸۶۰

پست الکترونیک:

L.asadpour@yahoo.com

زمینه و هدف: مقاومت به درمان آنتی‌بیوتیکی به‌ویژه در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین یکی از نگرانی‌های عمده بهداشت عمومی در سراسر جهان است. مطالعه حاضر به سنتز نانوذرات سلنیوم، بررسی اثر ضد میکروبی و امکان استفاده از آن به‌عنوان نانوحامل آمپی‌سیلین می‌پردازد.

مواد و روش کار: نانوذرات سلنیوم به روش احیای شیمیایی سدیم سلنیت به‌وسیله اسید آمینه آل - سیستئین سنتز شد. بارگذاری اتصال آمپی‌سیلین در سطح نانوذرات سلنیوم با اضافه کردن تدریجی آنتی‌بیوتیک به محلول نانوذرات و هم‌زدن مداوم انجام شد. سپس این اتصال با استفاده از طیف‌سنجی UV-Vis، پراش اشعه X و میکروسکوپ الکترونی روبشی تحت بررسی قرار گرفت. اثر ضد باکتری نانوذره حاصل و نانوذره بارگذاری شده با آنتی‌بیوتیک در برابر سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس و ۱۰ سویه بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین به روش دیسک دیفیوژن و MIC به روش برات ماکرودایلوشن بررسی شد.

یافته‌ها: اتصال آنتی‌بیوتیک در سطح نانوذرات سبب افزایش اثر ضد میکروبی آن‌ها نسبت به حالت عادی شد. کمترین غلظت مهارکننده رشد سویه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس در نانوذره سلنیوم بین ۶۲/۵-۷/۸، فرم آزاد آمپی‌سیلین ۲۵۰-۶۲/۵ و آمپی‌سیلین متصل به نانوذرات ۶۲/۵-۷/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این مقادیر در مورد سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۷/۸، ۳/۱۲ و ۳/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. اتصال آمپی‌سیلین در سطح نانوذرات سلنیوم سبب بهبود کمترین غلظت مهارکننده رشد استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین شد.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده، تأییدکننده فعالیت ضد میکروبی نانوذرات سلنیوم است. افزایش فعالیت ضد میکروبی آنتی-بیوتیک بارگذاری شده در سطح این ذرات، امکان استفاده از این آنتی‌بیوتیک‌ها را در درمان عفونت‌های سخت‌درمان افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: نانوذرات سلنیوم، اثر ضد میکروبی، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، آمپی‌سیلین

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

بر این باکتری انجام شود. در سال‌های اخیر، استفاده از نانوذرات فلزی به‌عنوان ترکیبات ضد باکتری روند روبه‌رشدی داشته است. اختلاف بین بار منفی میکروارگانیزم و بار مثبت نانوذره باعث اتصال نانوذره به سطح سلول، در هدف قرارگرفتن ساختارهای مختلف سلول باکتری و در نتیجه باعث مرگ سلول می‌شود (۳، ۴). به‌علاوه، این نانوذرات به‌منظور دارورسانی هدفمند آنتی‌بیوتیک‌ها به محل عفونت نیز استفاده شده‌اند. استفاده ترکیبی از نانوذرات و آنتی‌بیوتیک‌ها به ما این امکان را می‌دهد که سمیت و عوارض

امروزه مقاومت میکروارگانیزم‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، به یکی از جدی‌ترین معضلات بهداشت جهانی تبدیل شده است. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین یکی از پاتوژن‌های مهم و از عوامل شایع در عفونت‌های بیمارستانی است که به‌سرعت به انواع آنتی‌بیوتیک‌های متداول مقاوم می‌شود (۱، ۲). شیوع گسترده و اهمیت بهداشتی عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس سبب شد در سراسر دنیا، تحقیقات گسترده‌ای در زمینه شناسایی ترکیبات ضد میکروبی جدید مؤثر

بارگذاری آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در سطح نانوذرات

سلنیوم

در یک بالن ۲۵ میلی‌لیتری، ۵۰ mg نانوذرات سلنیوم ریخته و به آن ۱۰ mL آب مقطر دیونیزه اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام اولتراسوند با دور متوسط قرار داده شد تا نانوذرات در آب مقطر به طور کامل پراکنده شوند. سپس قطره قطره محلول آنتی-بیوتیک آمپی‌سیلین (سیگما) با غلظت (۵۰ μg/mL) به داخل ظرف محتوای نانوذرات منتقل و به حجم ۲۵ mL رسید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵°C قرار گرفت. پس از طی این مدت، محتویات بالن با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصل جمع‌آوری شد.

به منظور تأیید بارگذاری آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در سطح نانوذرات سلنیوم، از آزمون‌های طیف‌سنجی UV-Vis، تعیین الگوی پراش پرتو X (XRD)، بررسی الگوی ریخت‌شناسی به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی، بررسی تفرق نور پویا (DLS) و طیف‌سنجی تبدیل فوری مادون قرمز (FT-IR) استفاده شد.

باکتری مطالعه‌شده

جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های بالینی بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی رشت در سال ۹۵ جمع‌آوری شد. برای خالص‌سازی باکتری‌ها کشت بر روی محیط مانیتول سالت آگار و آگار خوندار (مرک، آلمان) و تست‌های کواگولاز، کاتالاز، DNase انجام گرفت. مقاومت به متی-سیلین در جدایه‌ها طبق دستورالعمل CLSI تعیین شد. بدین ترتیب که از سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند بر روی محیط آگار مولر هینتون حاوی ۰/۴ کلرید سدیم کشت داده شد. سپس دیسک اگزاسیلین (۱ μg) بر روی کشت میکروبی قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵°C گرمخانه‌گذاری شد. همچنین میزان مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مقاوم به متی‌سیلین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین (۲۵ μg)، ونکومایسین (۳۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، آموکسی کلاو (۳۰ μg)، سفالکسین (۳۰ μg) و تتراسیکلین (۳۰ μg) (پادتن طب، ایران) بررسی شد (۱۰). سوپه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC1113 به‌عنوان شاهد استفاده شد.

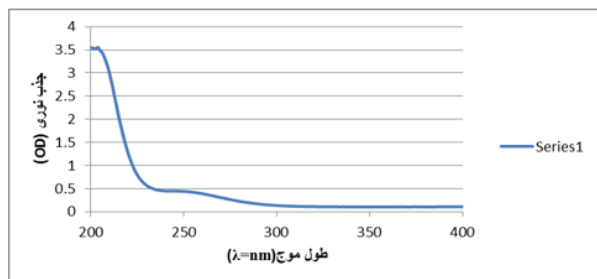
ناخواسته هر دو را بر سلول‌های انسانی کاهش دهیم؛ زیرا دو ماده در ترکیب با هم اثرات ضد میکروبی یکدیگر را افزایش داده و نیاز به استفاده از دوزهای بالای هر کدام را کاهش می‌دهند (۵). سلنیوم یکی از املاح معدنی کمیاب و ضروری برای بدن است که در قالب سلنوپروتئین‌هایی مانند سلنومتیونین و سلنوسیستین در ساختار آنزیم‌های مؤثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، سم‌زدایی و سوخت‌وساز بدن فعالیت می‌کند و دریافت روزانه کمتر از ۴۰ μg از آن سبب کاهش عملکرد سیستم ایمنی و افزایش مرگ‌ومیر می‌شود (۶،۷). در طول دهه گذشته، محققین به نانوذرات سلنیوم به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی، سمیت پایین و خواص درمانی متعدد، بیش از پیش توجه نشان داده‌اند (۸). پژوهش حاضر با هدف سنتز و بررسی امکان به‌کارگیری نانوذرات سلنیوم به‌عنوان نانوحامل به‌منظور افزایش اثربخشی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بر ضدسویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین انجام شده است.

مواد و روش‌ها

سنتز نانوذرات سلنیوم

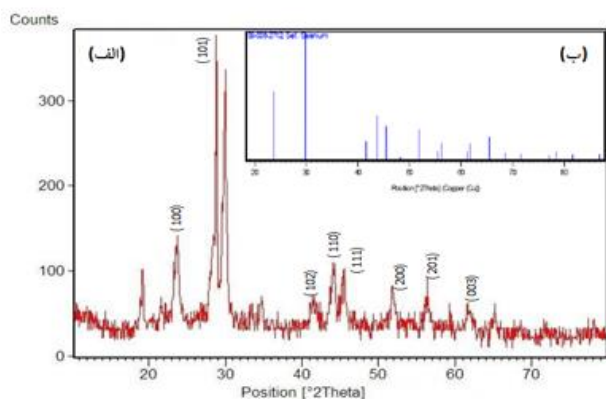
نانوذرات سلنیوم به روش احیای شیمیایی نمک سدیم سلنیت با اسید آمینه آل - سیستمین طبق روش گزارش شده از سوی Fesharaki و همکاران سنتز شد (۹). برای این کار ابتدا ۰/۱۷۳۸g از نمک سدیم سلنیت در ۵۰ mL آب مقطر حل گردید تا محلول ۰/۱ مولار آن به‌دست آید. همچنین برای تهیه محلول آل - سیستمین ۵۰ میلی‌مولار، مقدار ۰/۳۰۴۴g آن در ۵۰ mL آب مقطر حل شد. ۱۰ mL از محلول سدیم سلنیت حاصل به یک بالن حجمی (۱۰۰۰ میلی‌لیتری) منتقل شد. سپس ۴۰ mL از محلول آل - سیستمین به‌صورت قطره قطره با پیپت مدرج، به بالن محتوی محلول سدیم سلنیت اضافه شد و با افزودن آب مقطر، به حجم ۱۰۰۰ mL افزایش پیدا کرد. ترکیب فوق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵°C تحت هم‌زدن مداوم با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. بعد از طی این مدت محلول کلوئیدال نانوذرات سلنیوم به رنگ قرمز تا آجری تشکیل شد که به‌وسیله دستگاه اون در دمای ۲۵-۳۰°C خشک و پودر نانوذرات خشک به‌منظور مطالعات بعدی جمع‌آوری و نگهداری شد. برای تأیید سنتز نانوذرات سلنیوم، از آزمون‌های طیف‌سنجی UV-Vis، تعیین الگوی پراش پرتو X (XRD) و بررسی تفرق نور پویا (DLS) استفاده شد. همچنین پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی (PDI) نانوذرات سنتز شده اندازه‌گیری شدند.

در اسپکتروسکوپی UV-Vis نانوذرات سنتز شده در محدوده طول موج ۲۱۸ نانومتر، بالاترین میزان جذب نوری را داشتند که این موضوع با جذب نوری نانوذرات سلنیوم همخوانی دارد (نمودار ۱).



نمودار ۱. نتایج اسپکتروسکوپی UV-Vis مربوط به نانوذرات سلنیوم

در الگوی پراش اشعه X مربوط به ساختار کریستالی نانوذرات سنتز شده که در زوایای $2\theta = 8.0^\circ - 20.0^\circ$ انجام شد، ۲ پراش قوی در زوایای 2θ ۲۳/۷ و 2θ ۲۸/۸ مربوط به صفحات (۱۰۰) و (۱۰۱) و پراش‌های ضعیف در زوایای 2θ ۴۱/۵، 2θ ۴۴/۱، 2θ ۴۵/۴، 2θ ۵۱/۸، 2θ ۵۶/۳ و 2θ ۶۱/۸ به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۱۰۲)، (۱۱۰)، (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۰۱) و (۳۰۰) دیده می‌شود که با مطابقت با نمونه استاندارد (JCPDS card) با کد مرجع 98-006-2712 تأییدکننده سنتز صحیح نانوذرات سلنیوم است (نمودار ۲).



نمودار ۲. الگوی پراش اشعه X (الف) نانوساختار سلنیوم (ب) الگوی پراش اشعه X نمونه استاندارد (JCPDS card 98-006-2712) نانوذرات سلنیوم

نتایج حاصل از آنالیز تفرق نورپویا (DLS) نشان‌دهنده ۲ توزیع اندازه برای نانوذرات سلنیوم است. قله اول که ۸۰/۴٪ کل نانوذرات به طور متوسط قطر ۱۲۰ nm داشتند و قله دوم مربوط به میزان تراکم ۱۹/۶ درصدی ذرات با اندازه ۳۸۷/۱ nm بودند (نمودار ۳). شاخص پراکنگی (PDI) محاسبه شده برای نانوذرات سلنیوم

بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذره و نانوذره متصل به آنتی بیوتیک

به منظور بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات سلنیوم و نانوذرات سلنیوم متصل شده با آمپی‌سیلین از تعیین قطر هاله عدم رشد در روش انتشار از دیسک و تعیین کمترین غلظت مهارکننده رشد به روش برات ماکرودایلویشن استفاده شد. ابتدا از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیونی معادل با کدورت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سنجش حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به آمپی‌سیلین آزاد و نانوفرمولاسیون‌های دارویی به روش استاندارد انتشار از دیسک انجام شد. برای این کار، نانوذرات سلنیوم و نانوذرات سلنیوم بارگذاری شده با آمپی‌سیلین و آمپی‌سیلین آزاد به روش فیلتراسیون استریل شدند. یک سوآب از سوسپانسیون استاندارد میکروبی در سطح محیط آگار مولر هینتون کشت داده شد. دیسک‌های استریل به قطر ۶ mm، حاوی غلظت ۳۰ μg از نانوذرات سلنیوم، نانوذرات سلنیوم بارگذاری شده با آمپی‌سیلین و آمپی‌سیلین آزاد تهیه و بر روی سطح محیط کشت حاوی باکتری قرار داده شد. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند و هاله عدم رشد باکتری‌ها برحسب میلی‌متر تحت بررسی قرار گرفت.

برای تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC) نانوذرات سلنیوم، آنتی‌بیوتیک در فرم آزاد و فرم اتصال یافته، با رقت‌سازی متوالی ۱۱ غلظت مختلف ۵۰۰-۰/۴۸ μg/mL از مواد تحت مطالعه در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. ۱ cc از سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل با کدورت ۰/۵ استاندارد مک فارلند به هریک از سری غلظت‌ها اضافه و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C نگهداری شد. پس از سپری شدن این زمان، لوله حاوی کمترین غلظت از ماده مطالعه شده که در آن هیچ‌گونه کدورتی وجود نداشت، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. در این آزمایش لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل و سوسپانسیون استاندارد میکروبی به عنوان کنترل مثبت (رشد) و لوله حاوی سری غلظت‌های نانوذرات سلنیوم و نانوذرات بارگذاری شده با آنتی-بیوتیک و محیط کشت فاقد باکتری به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. هر کدام از آزمایشات به منظور تأیید ۲ بار تکرار شدند.

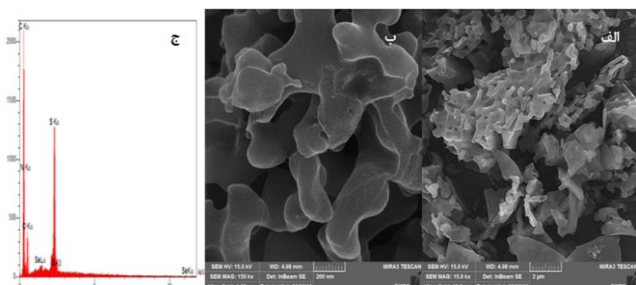
یافته‌ها

سنتز نانوذرات سلنیوم

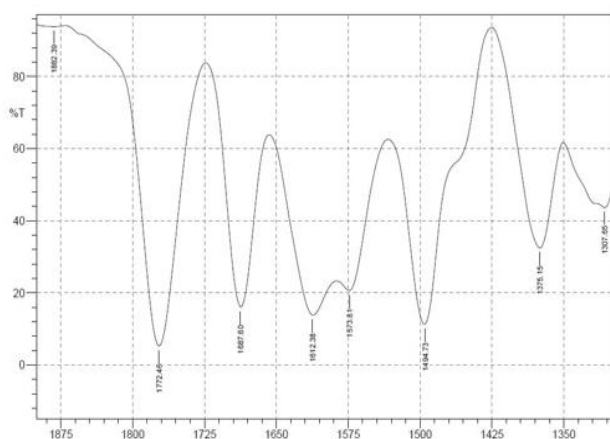
از واکنش ترسیب شیمیایی محلول نمک سدیم سلنیت با اسید آمینه آل-سیستئین رسوب قرمز-آجری نانوذرات سلنیوم حاصل شد.

مربوط به کربن - اکسیژن گروه عاملی کربوکسیل و پیک ۱۳۰۷ مربوط به ارتعاش خمشی کربن - گوگرد است.

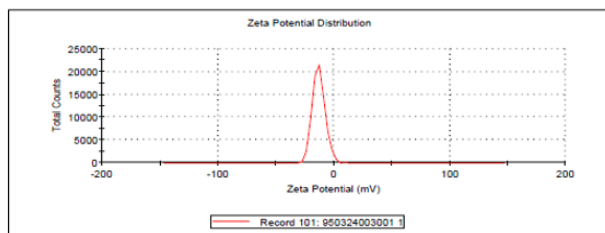
همچنین پتانسیل زتا برای نانوذرات سلنیوم پوشیده شده با آمپی‌سیلین، $12/8$ mV بود که در نمودار ۶ نشان داده شده است.



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM) (الف) با بزرگ‌نمایی 15 kx و (ب) با بزرگ‌نمایی 150 kx و (ج) (EDAX) پودر خشک (AMP/Se°)



نمودار ۵. طیف‌سنجی مادون قرمز نمونه آمپی‌سیلین بارگذاری شده در محدوده $1900-1300$

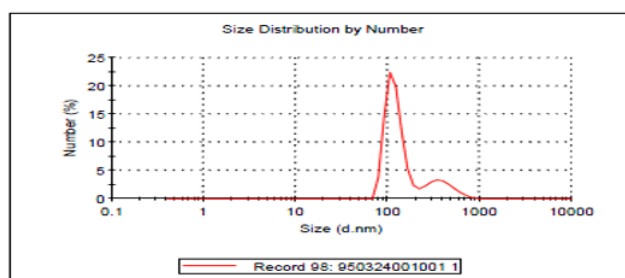


نمودار ۶. پتانسیل زتا نانوذرات سلنیوم پوشیده شده با آمپی‌سیلین (AMP/Se°)

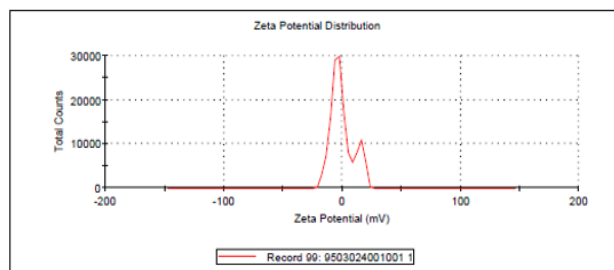
شناسایی و میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس‌های مقاوم به متی‌سیلین

در مجموع ۱۰ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های متداول بررسی شدند. میزان مقاومت این جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین 60% ؛

بود. همچنین پتانسیل زتا برای نانوذرات سلنیوم به‌طور متوسط $14/2$ mV - ثبت شد (نمودار ۴).



نمودار ۳. نمودار توزیع اندازه نانوذرات سلنیوم (Se°) حاصل از آنالیز تفرق نور پویا (DLS)



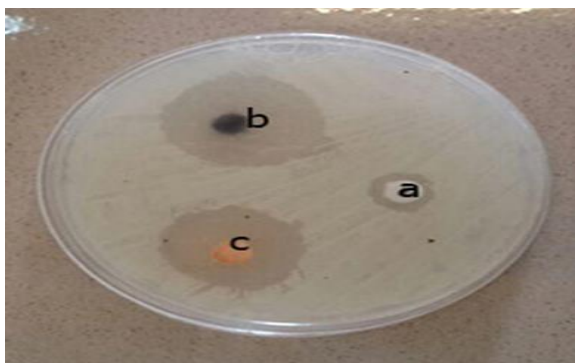
نمودار ۴. پتانسیل زتا نانوذرات سلنیوم (Se°)

بارگذاری آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در سطح نانوذرات سلنیوم

شکل ظاهری نانوذرات سلنیوم پوشش داده شده با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (AMP/Se°) با میکروسکوپ الکترونی روبشی مطالعه شد. همان‌طور که در شکل ۱ قابل مشاهده است، نانوذرات سلنیوم پوشیده شده با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به صورت میله‌ای تا بی‌شکل مشاهده شد. همچنین نتایج حاصل از طیف‌سنجی تفکیک انرژی (EDAX) نانوذرات سلنیوم بارگذاری شده با آمپی‌سیلین نشان داد که علاوه بر سلنیوم، غلظت عناصر کربن و نیتروژن نیز بسیار بالا است.

یافته‌های حاصل از طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز آمپی‌سیلین بارگذاری شده در سطح نانوذرات سلنیوم حاکی از پایداری ساختار شیمیایی آمپی‌سیلین پس از بارگذاری است (نمودار ۵). پیک‌های 1772 و 1677 به ترتیب مربوط به گروه کربونیل کربوکسیلیک اسید و گروه کربونیل آمیدی حلقه بتالاکتام هستند. پیک 1612 مربوط به ارتعاش کششی کربن - نیتروژن آمیدی، پیک 1573 مربوط به ارتعاش خمشی گروه آمینو و پیک 1494 مربوط به ارتعاش کششی کربن - نیتروژن، پیک 1375

نانوذرات سلنیوم، آمپی سیلین و نانوذرات سلنیوم بارگذاری شده با آمپی سیلین در جدایه های مطالعه شده در جدول ۱ و تصویر اثر مهارتی این ترکیبات بر یکی از سویه ها در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲. ناحیه مهارت رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، تولیدشده توسط a: (AMP) و b: (AMP/Se⁰) و c: (Se⁰)

ونکومايسين ۱۰٪، جنتاميسين ۲۰٪، سيپروفلوکساسين ۴۰٪، آموکسی کلاو ۳۰٪، سفالکسین ۳۰٪ و تتراسایکلین ۵۰٪ بود.

فعالیت ضد میکروبی نانوذره متصل به آنتی بیوتیک

نتایج اثر ضد میکروبی نانوذرات سلنیوم بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد نانوذرات سلنیوم فاقد آنتی بیوتیک، بر روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس PTCC1113 و تمام جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، قابلیت مهار رشد دارند. قطر هاله عدم رشد ایجاد شده از سوی این نانوذرات بین ۲۵-۲۰ mm متغیر بود. اتصال آمپی سیلین بر سطح این نانوذرات سبب افزایش این اثر ضد میکروبی و کاهش MIC در مقایسه با فرم آزاد آمپی سیلین شد. به گونه ای که MIC فرم آزاد آمپی سیلین بر باکتری های مطالعه شده بین ۲۵۰-۳۱/۲۵۰ μg/mL متغیر بود. در حالی که این میزان در فرم بارگذاری شده آمپی سیلین در سطح نانوذرات سلنیوم به ۹۶۲/۵-۳/۶۲ μg/mL کاهش یافت. قطر هاله رشد نیافتگی و کمترین غلظت مهار کننده رشد

جدول ۱. فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات سلنیوم و نانوذرات سلنیوم متصل به آمپی سیلین بر علیه سویه های مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس

شماره باکتری	Se NPs		Ampicillin		Se NPs/Amp	
	قطر هاله (میلی متر)	MIC (μg/mL)	قطر هاله (میلی متر)	MIC (μg/mL)	قطر هاله (میلی متر)	MIC (μg/mL)
MRSA-1	۲۵	۳۱/۲	۱۱	۱۲۵	۲۶	۱۵/۶
MRSA-2	۲۵	۳۱/۲	۱۳	۱۲۵	۲۷	۷/۸
MRSA-3	۲۲	۳۱/۲	۹	۲۵۰	۲۶	۳۱/۲
MRSA-4	۲۲	۳۱/۲	۱۱	۱۲۵	۲۵	۱۵/۶
MRSA-5	۲۴	۳۱/۲	۱۴	۶۲/۵	۲۶	۷/۸
MRSA-6	۲۴	۳۱/۲	۱۱	۱۲۵	۲۵	۱۵/۶
MRSA-7	۲۵	۷/۸	۱۵	۶۲/۵	۲۸	۷/۸
MRSA-8	۲۴	۱۵/۶	۱۳	۱۲۵	۲۸	۷/۸
MRSA-9	۲۰	۱۵/۶	۸	۱۲۵	۲۲	۱۵/۶
MRSA-10	۲۰	۶۲/۵	۸	۲۵۰	۲۲	۶۲/۵
PTCC1113	۲۵	۷/۸	۱۷	۳۱/۲	۲۸	۳/۹

اندازه کوچک، امکان تعامل بیشتری با ساختارهای سلولی دارند و نیز امکان اتصال آن ها به مولکول های فعالی مثل داروهای ضد میکروبی و ضد سرطان بیشتر است. از بین نانوذرات متعددی که سنتز و مطالعه شده اند فقط تعداد کمی قادر بودند رشد باکتری های مقاوم به دارو مثل استافیلوکوکوس اورئوس را به طور

بحث

امروزه گسترش مقاومت های دارویی در باکتری ها سبب شده تا مطالعه بر روی اثرات ضد میکروبی و کاربردهای درمانی نانوذرات افزایش یافته و به یکی از موضوعات جالب و قابل توجه در پزشکی تبدیل شود. نانوذرات به دلیل داشتن نسبت سطح به حجم بالا و

مؤثری مهار کنند (۱۱). به‌علاوه سمیت پایین برای سلول‌های پستانداران و اختصاصیت بالا برای باکتری‌ها، ویژگی مهم دیگری است که در انتخاب نانوذره مناسب به آن توجه می‌شود. در غلظت ۱۲۸ ppm از نانوذرات سلنیوم بیش از ۷۰ درصد سلول‌های فیروپلاست زنده باقی ماندند (۱۲). همچنین نانوذرات سلنیوم از جمله ذراتی هستند که سمیت انتخابی بالایی برای باکتری‌ها دارند. و اثر مهاری قوی آن‌ها بر *استافیلوکوکوس اورئوس* نخستین بار از سوی Webster و Tran (۲۰۱۱) گزارش شد (۱۱).

در مطالعه حاضر، نانوذرات سلنیوم به روش ساده ترسیب شیمیایی سنتز شدند و اثرات ضدباکتریایی نانوذرات سلنیوم (Se^0) سنتز شده و فرم متصل شده آن‌ها با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بر روی ۱۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین تحت بررسی قرار گرفتند. نانوذرات سلنیوم اثر ضد میکروبی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند و در غلظت $62/5 \mu g/mL$ - $3/9$ رشد باکتری‌ها را مهار کردند. از ۱۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین در ۶ جدایه کمترین غلظت مهارکننده رشد $31/2 \mu g/mL$ بود. این مقادیر با مقادیر گزارش شده در مطالعات سایر محققین همخوانی دارند. از جمله Hariharan و همکاران در سال ۲۰۱۲، کمترین غلظت مهارکننده رشد نانوذرات سلنیوم بر ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* بیماری‌زا را $31/2 \mu g/mL$ گزارش کردند (۱۳). این مقدار در مطالعه Tran و Webster در سال ۲۰۱۱، بین $7/8-31 \mu g/mL$ و در مطالعه Chudobova و همکاران بین $5-23/7 \mu g/mL$ متغیر بود (۱۴، ۱۱). در واقع با کاهش اندازه این نانوذرات، قدرت ضد میکروبی آن‌ها افزایش می‌یابد (۱۲). مطالعه دیگری که اثر مهاری نانوذرات سلنیوم بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را تأیید می‌کند، مطالعه Shakibaie و همکارانش (۲۰۱۴) است که نانوذرات سلنیوم سنتز شده با باکتری *باسیلوس*، تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* را در مقایسه با نمونه‌های شاهد $12/42\%$ کاهش داد. در مطالعه Wang و Webster در سال ۲۰۱۳، نیز اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات سلنیوم بر *استافیلوکوکوس اورئوس* تأیید شده است (۱۵). البته در مطالعه حاضر اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات بررسی نشده و فقط تأثیر آن بر فرم منفرد جدایه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شد.

همچنین در مطالعه حاضر نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات سلنیوم بارگذاری شده با آنتی‌بیوتیک نشان داد که این بارگذاری باعث افزایش اثر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بر

استافیلوکوکوس اورئوس شده و به‌عبارتی اثر هم‌افزایی در نانوفرمولاسیون جدید حاوی نانوذره و دارو بر علیه این باکتری مشاهده شد؛ به‌گونه‌ای که غلظت مؤثر آمپی‌سیلین در تمام جدایه‌های مطالعه شده را کاهش داد. تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر بارگذاری آنتی‌بیوتیک در سطح نانوذرات سلنیوم گزارش نشده است و مطالعه حاضر از این نقطه نظر نوآوری دارد، ولی El-Batal و همکاران در مطالعه‌ای (۲۰۱۴) گزارش کردند که افزودن نانوذرات سلنیوم به پماد ضد میکروبی حاوی فوزیدیک اسید سبب افزایش ۲۸/۵ درصدی اثر آن بر *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود ولی این افزایش اثر در پمادهای حاوی جنتامایسین سولفات مشاهده نشده است (۱۶). در مطالعات گذشته اغلب افزایش اثر ضد میکروبی آمپی‌سیلین همراه با نانوذرات طلا و نقره گزارش شده که این همراهی همواره اثر ضد میکروبی آمپی‌سیلین را افزایش داده است. از جمله Bhattcharya و همکاران (۲۰۱۲) در حین سنتز نانوذرات طلا، آن را با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کنژوگه کردند. نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی این نانوذرات کنژوگه با آمپی‌سیلین بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیانگر افزایش اثر ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک و کاهش MIC آن از $42 \mu g/mL$ به $30 \mu g/mL$ در مقایسه با فرم آزاد آن بود (۱۷). همچنین در مطالعه دیگری با پوشش دادن نانوذرات نقره با آمپی‌سیلین، افزایش اثر ضد میکروبی این آنتی‌بیوتیک بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* مشاهده شد (۱۸). در مطالعه Brown و همکاران (۲۰۱۲) نیز آمپی‌سیلین بارگذاری شده در سطح نانوذرات نقره و نانوذرات طلا اثر ضد میکروبی قوی‌ای بر جدایه‌های *سودوموناس ائروژینوزا* با مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین نشان داد (۱۹).

بارگذاری آمپی‌سیلین بر سطح نانوذرات مغناطیسی هم علاوه بر افزایش اثر ضد میکروبی آن بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، سبب افزایش اثرات ضدقارچی نیز شد (۲۰).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر بیانگر خاصیت ضد میکروبی نانوذرات سلنیوم و کاهش غلظت مؤثر آنتی‌بیوتیک بارگذاری شده در سطح نانوذرات مطالعه شده است. بنابراین پس از تأیید اختصاصی بودن سمیت آن‌ها، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های بارگذاری شده در سطح این نانوذرات می‌تواند به‌عنوان یکی از

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارضی در منافع گزارش نشده است.

راهکارهای مواجهه با مشکل مقاومت‌های دارویی روزافزون
موردتوجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت نهایت

تشکر را دارند.

References

1. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1008-15.
2. Huang YC, Su LH, Wu TL, Lin TY. Changing molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from a teaching hospital in Northern Taiwan. *J Clin Microbiol*. 2006;44(6):2268-70.
3. Luo J, Chan W-B, Wang L, Zhong C-J. Probing interfacial interactions of bacteria on metal nanoparticles and substrates with different surface properties. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36(6):549-56.
4. Li W-R, Xie X-B, Shi Q-S, Zeng H-Y, You-Sheng O-Y, Chen Y-B. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;85(4):1115-22.
5. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(2):133-149.
6. Wang Q, Webster TJ. Nanostructured selenium for preventing biofilm formation on polycarbonate medical devices. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(12):3205-10.
7. Shakibaie M, Forootanfar H, Golkari Y, Mohammadi-Khorsand T, Shakibaie MR. Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. *J Trace Elem Med Biol*. 2015;29:235-41.
8. Yu B, Zhang Y, Zheng W, Fan C, Chen T. Positive surface charge enhances selective cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Inorg Chem*. 2012;51(16):8956-63.
9. Fesharaki PJ, Nazari P, Shakibaie M, Rezaie S, Banoee M, Abdollahi M, et al. Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Klebsiella pneumoniae* and their recovery by a simple sterilization process. *Braz J Microbiol*. 2010;41(2):461-6.
10. Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fourth informational supplement, M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2014;34(1).
11. Tran PA, Webster TJ. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1553-8.
12. Tran PA, O'Brien-Simpson N, Reynolds EC, Pantarat N, Biswas DP, O'Connor AJ. Low cytotoxic trace element selenium nanoparticles and their differential antimicrobial properties against *S. aureus* and *E. coli*. *Nanotechnology*. 2015;27(4):045101.
13. Hariharan H, Al-Harbi N, Karuppiah P, Rajaram S. Microbial synthesis of selenium nanocomposite using *Saccharomyces cerevisiae* and its antimicrobial activity against pathogens causing nosocomial infection. *Chalcogenide Lett*. 2012;9(12):509-15.
14. Chudobova D, Cihalova K, Dostalova S, Ruttkay-Nedecky B, Merlos Rodrigo MA, Tmejova K, et al. Comparison of the effects of silver phosphate and selenium nanoparticles on *Staphylococcus aureus* growth reveals potential for selenium particles to prevent infection. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;351(2):195-201.
15. Wang Q, Webster TJ. Inhibiting biofilm formation on paper towels through the use of selenium nanoparticles coatings. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:407.
16. El-Batal A, Essam TM, El-Zahaby DA, Amin MA. Synthesis of Selenium Nanoparticles by *Bacillus laterosporus* Using Gamma Radiation. *Br J Pharm Res*. 2014;4(11):1364-86.
17. Bhattacharya D, Saha B, Mukherjee A, Santra CR, Karmakar P. Gold nanoparticles conjugated antibiotics: stability and functional evaluation. *J Nanosci Nanotechnol*. 2012;2(2):14-21.
18. Kora AJ, Rastogi L. Enhancement of antibacterial activity of capped silver nanoparticles in combination with antibiotics, on model gram-negative and gram-positive bacteria. *Bioinorg Chem Appl*. 2013;2013.
19. Brown AN, Smith K, Samuels TA, Lu J, Obare SO, Scott ME. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(8):2768-74.
20. Hussein-Al-Ali SH, El Zowalaty ME, Hussein MZ, Geilich BM, Webster TJ. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of an ampicillin-conjugated magnetic nanoantibiotic for medical applications. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:3801-14.