

مقاله اصلی

بررسی اثر ضد میکروبی فیلم و ژل کیتوزان حاوی نانوذرات رامنولپید سودوموناس آئروژینوزا در مقایسه با سیپروفلوکساسین و جنتامایسین بر اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۰

خلاصه

مقدمه: امروزه مقاومت آنتی بیوتیکی به یک چالش جهانی تبدیل شده است و مصرف بی رویه و غیر منطقی در تجویز آنتی بیوتیک در انسان و دام موجب گسترش مقاومت دارویی میکروارگانیسم ها شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی و مقایسه دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و جنتامایسین با فیلم و ژل کیتوزان به همراه نانو ذرات رامنولپید بر روی دو باکتری اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس می باشد.

روش کار: در این مطالعه ابتدا رامنولپید از روغن آفتابگردان و باکتری سودوموناس آئروژینوزا تولید و تبدیل به نانوذرات شد سپس محلول کیتوزان ۲ درصد با استفاده از اسید استیک ۱ درصد تهیه شد. سپس گلیسرین ۷/۵ درصد به عنوان نرم کننده اضافه گردید و نانوذرات رامنولپید ۰/۱ درصد توسط سمپلر به محلول همگن به دست آمده اضافه شد. از دیسک های آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و جنتامایسین جهت مقایسه و آنتی بیوگرام استفاده شد و جهت اندازه ذرات رامنولپید از آنالیز Zeta و DLS استفاده گردید.

نتایج: تحلیل DLS و ZPS نشان داد که رامنولپید تولید شده دارای درجه پایدارتر خوبی است. اثرات آنتی باکتریال جنتامایسین + فیلم کیتوزان و نانو ذرات رامنولپید با ایجاد قطر ۲۹ میلی متر در استافیلوکوکوس اورئوس، بیشترین اثر را نسبت به اشریشیا کلی مشاهده گردید و همچنین اثر سیپروفلوکساسین + نانو ذرات رامنولپید در هردو باکتری با قطرهاله بسیار نزدیک به هم گزارش شد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب کردن آنتی بیوتیک با مواد آنتی باکتریال فیلم و ژل کیتوزان به همراه نانوذرات رامنولپید اثرات خوبی از خود نشان داد.

کلمات کلیدی

کیتوزان، رامنولپید، آنتی بیوتیک، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس
پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می باشد.

مریم کاظمیان^۱

حمید کاظمیان^۲

مهدی رضوردی نژاد^۳

جاوید تقی نژاد^{۳*}

^۱گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه

صنعتی نوشیروانی بابل، مازندران، ایران

^۲دانشجوی دکترای تغذیه دام، دانشکده علوم دامی،

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان،

ایران

^۳گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه

ارومیه، ارومیه، ایران

Email: jataghinejad@gmail.com

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت، کوکسی هوازی-بی هوازی اختیاری بوده که این باکتری تقریباً مسئول ۸۰ درصد بیماری‌هایی از قبیل؛ فولیکولیت، زرد زخم، پنومونی، اندوکاردیت حاد و مسمومیت‌های غذایی نیز می‌باشد (۱). /شریشیا کلی از اعضای مهم خانواده انتروباکتریاسه بوده که بیشترین عامل مسبب عفونت‌های ادراری در همه گروه سنی و بخصوص در زنان جوان می‌باشد. این باکتری به طور کلی موجب بیماری‌های منتزیت، سیتیسمی، عفونت‌های گوارشی-روده نیز می‌گردد (۲).

اخیراً مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های مختلف به عنوان یک تهدید جهانی برای گزینه‌های درمانی عفونت‌های باکتریایی و موضوع تحقیقات کنونی ظاهر شده است (۳). مقاومت آنتی‌بیوتیکی نه تنها یک عارضه مهم است: مقاومت ضد میکروبی (AMR)^۱ همچنین یکی از ۱۰ نگرانی مهم بهداشت عمومی جهانی است که در سراسر جهان شکوفا شده است. در توصیف آنتی‌بیوتیک‌ها اینطور بیان می‌شود که به عنوان، ضد باکتری‌ها، ضد قارچ‌ها و ضد انگلی‌ها شناخته می‌شوند. در ماه می ۲۰۱۵ سازمان بهداشت جهانی، برنامه‌ای جهت مبارزه با مقاومت دارویی تدوین کرده است (۴).

بسیاری از محققین اعتقاد دارند که تعداد کمی از باکتری‌های محیطی دارای عوامل تعیین کننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی هستند که می‌توانند به دلیل همزیستی/تکامل یا انتقال افقی ژن، به سایر میکروارگانیسم‌ها منتقل کنند (۵). بنابراین، تمامی این عوامل به همراه مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها، عامل بروز مقاومت در ایزوله‌ها هستند (۶). تهدیدات ناشی از سویه‌های باکتریایی مقاوم در گرم منفی و گرم مثبت‌ها، دانشمندان را وادار کرده است تا کلاس‌های جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌ها و رویکردهای جدید را برای مقابله با مشکل مقاومت کشف کنند (۷). AMR نه تنها مانعی برای بخش بهداشت و درمان

است، بلکه بار اقتصادی برای کشورهای توسعه یافته و همچنین برای کشورهای در حال توسعه است (۸).

کیتوزان یک پلیمر خطی با واحدهای D- و N-استیل D-گلوکز آمین به عنوان بلوک‌های سازنده آن می‌باشد (۹). کیتوزان به اشکال مختلفی همچون دانه‌ها، نانو ذرات، نانو الیاف، فیلم‌ها، میکروسفرها و هیدروژل‌ها قابل استفاده است. میکروسفرها یکی از اشکال دارویی کیتوزان بوده که بیشتر در زمینه‌های زیست پزشکی کاربرد دارد. پلیمرهای طبیعی که در حوزه پزشکی و مهندسی بافت مورد بررسی قرار گرفته‌اند عبارتند از: کیتوزان، آلژینات، کلاژن و پروتئین می‌باشد (۱۰). کیتوزان به علت ضعیف بودن در آب و حلال‌های آلی حل می‌شود زیرا یک باز ضعیف با محدوده pKa برابر با ۶/۲-۷ را دارد (۱۱).

رامنولپید یک گلیکولپید آنیونی است که از باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا به دست می‌آید. رامنولپیدها گلیکوزیدهایی هستند که عمدتاً از دو قسمت تشکیل شده است. یک بخش رامنوز و بخش دیگر گروه چربی که با پیوند بتا گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده‌اند. اگر رامنولپیدها شامل یک گروه رامنوز باشند مونورامنولپید و اگر دو گروه رامنوز داشته باشد دی رامنولپید می‌گویند. رایج‌ترین رامنولپید تولید شده از باکتری سودوموناس نوع ۱ و ۳ هستند و نوع ۲ و ۴ به مقدار کمی تولید می‌شوند (۱۲). رامنولپیدها می‌توانند برای تثبیت فرمول‌های آب/روغن یا به دلیل فعالیت ضد میکروبی آنها حتی به عنوان مواد دارویی فعال و یا برای انتقال دارو و کپسولیشن استفاده شوند. در پزشکی از رامنولپید برای بهبود زخم و درمان بیماری‌های مختلف پوستی استفاده می‌شود و در صنایع غذایی به عنوان تثبیت کننده و امولسیفایر استفاده می‌گردد (۱۳، ۱۴). هدف از مطالعه مقایسه دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و جنتامیسین با اثر ضد میکروبی فیلم و ژل کیتوزان به همراه

¹ antimicrobial resistance

جدول ۲. ترکیبات مربوط به محلول C

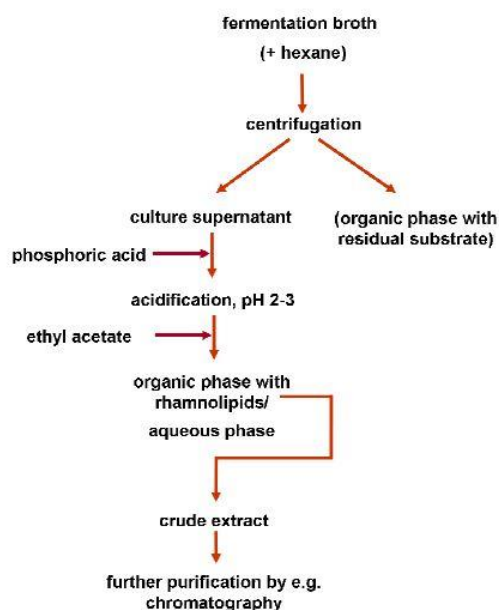
compound	Concentration g/l
trisodium citrate·2 H ₂ O	0.4
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	0.056
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0.28
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0.24
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0.24
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.16

برای تهیه ژل و فیلم از کیتوزان با وزن مولکولی بالا استفاده شد. ابتدا محلول کیتوزان ۲ درصد (W/V) با استفاده از اسید استیک ۱ درصد (V/V) تهیه شد. سپس گلیسرین ۷/۵ درصد (W/V) به عنوان نرم کننده اضافه شد و نانوذرات رامنولپید ۰/۱ درصد (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 از آن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد درون آون قرار داده شد تا خشک شود. جهت تولید ژل طبق فرمول بالا محلول کیتوزان ۳ درصد (W/V) بدون گلیسرین تهیه شد (۱۶).

آنتی باکتریال و آنتی بیوگرام

کشت تازه ای از سویه های آزمایشی در محیط LB براث (کاندلب-اسپانیا) تهیه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به صورت سریالی در LB براث با رقت ۰/۵ رقیق و 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 با استفاده از نیم مک فارلند مشاهده و حداقل غلظت مهار رشد باکتری ها و حداقل غلظت کشندگی تعیین شد. جهت آزمون قطره هاله (دیسک دیفیوژن)، برای هر نمونه یک پلٹ 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

نانو ذرات رامنولپید تولید شده از سودوموناس آئروژینوزا بر روی اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس می باشد.



شکل ۱. فرایند تولید رامنولپید

روش کار

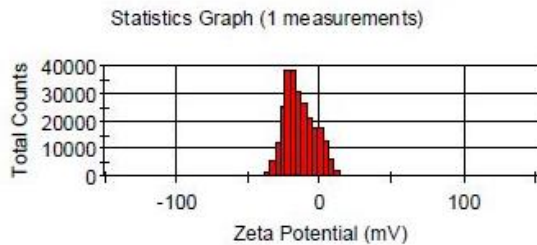
برای تهیه نانوذرات رامنولپید (شکل ۱) از باکتری سودوموناس آئروژینوزا و سه محلول استفاده شد که شامل محلول A (جدول ۱) به عنوان محیط کشت و محلول B منبع کربن (روغن آفتابگردان) و محلول C (جدول ۲) به عنوان ریز مغذی^۱ می باشد. بعد از گذر زمان یک هفته گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه، رامنولپید توسط نرمال هگزان در دور ۴۰۰۰ rpm و زمان ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و توسط اتیل استات (۱:۱) استخراج شد. سپس به همراه آب توسط دستگاه اولتراسونیک به نانوذرات تبدیل شد (۱۵).

جدول ۱. ترکیبات مربوط به محلول A

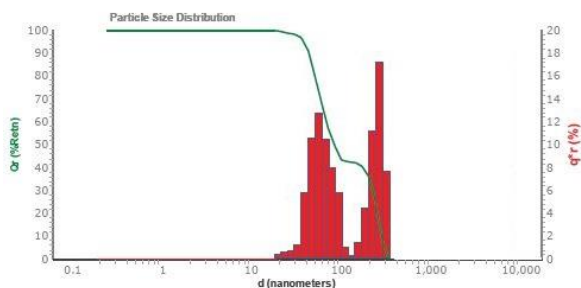
compound	Concentration g/l
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.1
KCl	0.2
NaNO ₃	3
Na ₂ HPO ₄	1.254
NaH ₂ PO ₄	2.022

¹ Trace element

به ترتیب ۲۴۱/۲ و ۱۴mv- می توان گفت که رامنولپید تولید شده دارای درجه پایدارتر خوبی است.



شکل ۲. توزیع نمودار آماری Zeta توزیع پتانسیل زتای ذرات رامنولپید تولید شده از سودوموناس آئروژینوزا



شکل ۳. نمودار آنالیز DLS پراکندگی نور پویا

نتایج آنتی باکتریال و آنتی بیوگرم

در این مطالعه از سویه های استاندارد /استافیلوکوکوس اورئوس ATCC29213 گرم مثبت و /شریشیا کلی IBRC-M 10708 گرم منفی استفاده گردید. مواد آنتی باکتریال مورد استفاده شامل ژل کیتوزان ۲ درصد، نانوذرات رامنولپید و فیلم کیتوزان و از دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و جنتامایسین جهت مقایسه استفاده شد. نتایج نشان داد که ابتدا دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین با ایجاد قطره های به ترتیب ۳۴ و ۳۷ میلی متر در /شریشیا کلی و /استافیلوکوکوس اورئوس با بیشترین حساسیت و جنتامایسین به ترتیب با ۲۲ و ۲۶ میلی متر با کمترین حساسیت در مقایسه با آنتی باکتریال ها مشاهده گردید. در ترکیب جنتامایسین با نانوذرات رامنولپید قطرهاله در /شریشیا کلی ۲۸ میلی متر بیشتر میزان حساسیت و در ترکیب جنتامایسین با فیلم کیتوزان و نانوذرات رامنولپید با قطرهاله ۲۴ میلی متر کمترین میزان نسبت به ترکیب با

نبودن محیط کشت ها، ۵۰ میکرولیتر از نمونه ژل کیتوزان ۳ درصد و فیلم ژل کیتوزان ۲ درصد و نانوذرات ۰/۱ درصد در دیسک استریل استاندارد و بر روی ماده مغذی مولر هیتون آگار (کاندلب-اسپانیا) 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 (۱۶). در مطالعه حاضر با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیک (پادتن طب-ایران) سیپروفلوکساسین (۵ میلی گرم) و جنتامایسین (۱۰ میلی گرم) مطابق با آخرین بروز رسانی CLSI سال ۲۰۲۳ انجام شد (۱۷). انتخاب آنتی بیوتیک مناسب در درمان عفونت های ناشی از باکتری ها می بایست پس از انجام تست های حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک صورت بگیرد (۱۸). سویه های استاندارد /استافیلوکوکوس اورئوس ATCC29213 گرم مثبت و /شریشیا کلی IBRC-M 10708 گرم منفی برای سنجش فعالیت ضد باکتریایی استفاده شدند. با خط کش مدرج دقیق، قطر منطقه عدم رشد در اطراف هر دیسک جداگانه اندازه گیری شد. از دیسک های آنتی بیوتیک جهت مقایسه با ترکیبات ضد باکتریایی رامنولپید استفاده گردید.

آنالیزها

جهت طیف سنجی مادون قرمز و توزیع پراکندگی نور پویا و توزیع اندازه ذرات رامنولپید از آنالیز Zeta و DLS استفاده گردید.

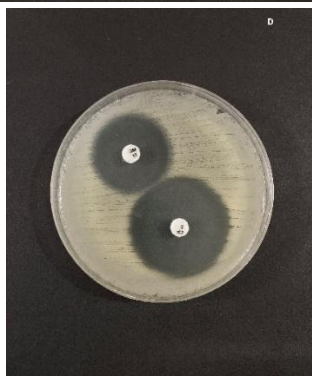
نتایج

نتایج این مطالعه نشان داد که قطر نانو ذرات رامنولپید کمتر از ۵۰ نانومتر است و به صورت کروی در آب پراکنده شده است. پراکندگی نور پویا برای ارزیابی قطر نانو ذرات رامنولپید کروی، PDI و زتا پتانسیل انجام شد. منحنی های توزیع اندازه در شکل های ۲ و ۳ نشان داد که بیش از ۲۰ درصد از نانو ذرات قطری کمتر از ۵۰ نانومتر دارند. ذرات کروی تولید شده با PDI به میزان ۰/۷ توزیع یکنواخت دارند. با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل DLS و ZPS



شکل ۴. A)

جنتامایسین و سیپروفلوکساسین با ترکیبات رامنولپید و فیلم کیتوزان در اشریشیا کلی (B) / استافیلوکوکوس اورئوس



شکل ۵. C)

کیتوزان در اشریشیا کلی (D) / استافیلوکوکوس اورئوس

رامنولپید با جنتامایسین مشاهده شد. در ترکیب سیپروفلوکساسین با نانو ذرات رامنولپید قطره‌اله در استافیلوکوکوس اورئوس با ۴۱ میلی متر بیشترین حساسیت و در ترکیب فیلم و ژل کیتوزان به همراه نانو ذرات رامنولپید در سیپروفلوکساسین در استافیلوکوکوس اورئوس با ایجاد قطر ۳۸ میلی متری بهترین میزان حساسیت را نشان داد. به طور کلی ترکیبات مورد نظر در هر دو سویه استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی نتیجه مناسب و بهتری را لحاظ کرد (جدول ۳ و شکل‌های ۴ و ۵).

جدول ۳. نتیجه قطره‌اله‌ها در استافیلوکوکوس اورئوس و

اشریشیا کلی بر حسب نوع آنتی بیوتیک و آنتی باکتریال

آنتی بیوتیک و آماده سنتر شده / باکتری‌ها	اشریشیا کلی (قطره‌اله)	استافیلوکوکوس اورئوس (قطره‌اله)
جنتامایسین	۲۲	۲۶
جنتامایسین + فیلم کیتوزان و نانو ذرات رامنولپید	۲۴	۲۹
جنتامایسین + ژل کیتوزان و نانو ذرات رامنولپید	۲۷	۲۸
جنتامایسین + نانو ذرات رامنولپید	۲۸	۲۷
سیپروفلوکساسین	۳۴	۳۷
سیپروفلوکساسین + فیلم کیتوزان و نانو ذرات رامنولپید	۳۶	۳۸
سیپروفلوکساسین + نانو ذرات رامنولپید	۴۰	۴۱
سیپروفلوکساسین + ژل کیتوزان و نانو ذرات رامنولپید	۳۶	۳۷

بحث

آنتی بیوتیک‌ها داروهای بسیار با ارزش جهت بهبود عفونت، بیماری‌های عفونی و بیماری‌های دامی هستند، اما امروزه مقاومت آنتی بیوتیکی به یک چالش جهانی تبدیل شده است و مصرف بی رویه و غیر منطقی در تجویز آنتی بیوتیک در انسان و دام موجب گسترش مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها شده است. چرا که این اثرات از طریق تغذیه از منابع دامی به انسان منتقل می‌شود. بنابراین روش‌های نوین مانند نانوفرموله کردن آن‌ها جایگزین مناسبی جهت بهبود و تسريع در روش‌های درمانی می‌باشد (۱۹).

در مطالعه حاضر افزایش میزان اثربخشی دو آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و جنتامایسین با فیلم و ژل کیتوزان همراه نانو رامنولپید علیه دو باکتری /شریشیا کلی و /استافیلوکوکوس اورئوس مشهود است. اثرات آنتی باکتریال جنتامایسین + فیلم کیتوزان و نانو ذرات رامنولپید با ایجاد قطر ۲۹ میلی متر در /استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین اثر را نسبت به /شریشیا کلی داشت و همچنین اثر سیپروفلوکساسین + نانو ذرات رامنولپید در هردو باکتری با قطرهاله بسیار نزدیک یعنی ۴۰ و ۴۱ میلی متر به هم گزارش گردید.

در سال ۲۰۱۷ سبحانی و همکاران با بارگذاری داروی سیپروفلوکساسین HCl در نانوذرات کیتوزان خاصیت آنتی باکتریالی آن را در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مقایسه کردند. در هردو سویه میکروارگانیسم حداقل غلظت بازدارنده (MIC) به طور قابل توجهی به میزان ۵۰ درصد کاهش یافت، در مقابل باکتری /استافیلوکوکوس اورئوس مقدار MIC از ۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر به ۲۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر رسید و در مقابل باکتری /شریشیا کلی از ۸۰ نانوگرم بر میلی لیتر به ۴۰ نانوگرم بر میلی لیتر رسید. و این در صورتی است که مقادیر MIC نانوذرات کیتوزان بدون هیچ دارویی در مقابل /شریشیا کلی و /استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب تقریباً ۱۷۷ و ۲۷۷ میکروگرم در میلی لیتر بود. که نتایج این تحقیق با توجه به قطرهاله به دست آمده از مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۰).

در سال ۲۰۲۰ در مطالعه دیگری باقری و همکاران طی آزمایشاتی اثر مهارکنندگی دی‌رامنولپیدهای حاصل از باکتریهای *سودوموناس آئروژینوزا* MR01 بر رشد /استافیلوکوکوس اورئوس را با استفاده از روش انتشار دیسک بررسی کردند. سپس تاثیر دی‌رامنولپیدی بر کشندگی و مورفولوژی باکتری‌ها با استفاده از روش شمارش واحدهای کلنی (CFUs) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مطالعه شده‌است و به این نتیجه رسیدند که ترکیبات دی‌رامنولپیدی دارای قدرت مهار رشد باکتری‌های /استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند همچنین در نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر مشاهده می‌شود که نانوذرات رامنولپید/کیتوزان به همراه جنتامایسین و سیپروفلوکساسین قطرهاله بزرگتری ایجاد کرده است و دارای قدرت مهارکنندگی بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک تنها را دارد (۲۱). در سال ۲۰۲۱ بتنکورت و همکاران با توجه به اهمیت یافتن جایگزین‌هایی برای کنترل عفونت‌های /استافیلوکوکوس اورئوس، پتانسیل ذرات مبتنی بر کیتوزان را به عنوان حامل‌های انتقال بیوسورفکتانت‌های گلیکولپیدی ضد میکروبی بررسی کردند. با استفاده از یک روش ساده ژل یونی نانوذرات پایدار را ساختند که اندازه متوسط $15/7 \pm$ نانومتر و $210/0 \pm$ نانومتر و $329/6 \pm$ نانومتر به ترتیب برای نانوذرات سوفورولپید/کیتوزان و نانوذرات رامنولپید/کیتوزان به دست آمده است. اختلاط گلیکولپیدها و اندازه ذرات به ترتیب با تجزیه و تحلیل FTIR و TEM تأیید شد. با توجه به گزارشات آن‌ها نانوذرات رامنولپید/کیتوزان بالاترین اثر ضد میکروبی را در مقابل /استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) نشان دادند که MIC برابر ۱۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود و توانایی مهار بیوفیلم ۹۹ درصد را نشان داد. نتایج نشان داد که نانوذرات رامنولپید/کیتوزان قادر به مهار رشد باکتریایی است که سازگاری سلولی کافی را نشان می‌دهد و می‌تواند به یک رویکرد ارزشمند برای جلوگیری از عفونت‌های مربوط به /استافیلوکوکوس اورئوس تبدیل شود. با توجه به مقایسه

اندازه نانوذرات میتوان گفت اندازه نانوذرات در مطالعه حاضر کمتر و میزان مهارکنندگی آن بیشتر است (۲۲).

در سال ۲۰۱۹ رضایی و همکاران خاصیت ضد باکتریایی نانوالیاف کیتوزان و درمنه را بر روی دو باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* و گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که نانو الیاف تولیدی حاوی عصاره درمنه برای هر دو باکتری مورد استفاده دارای خاصیت مهارکنندگی بود و گزارش کردند که در نانو الیاف حاوی ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره به طور کامل رشد باکتری کنترل شد و همچنین نانوالیاف دارای عصاره با غلظت ۲۰ و ۵۰ میلیگرم بر میلی لیتر، بر باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر مهارکنندگی بهتری داشت (۲۳). در سال ۲۰۱۹ اکبری و همکاران اثر ضدباکتریایی نانوذرات کیتوزان بارگذاری شده با آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید بر سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات کیتوزان حامل آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید در نمونه حساس ۰/۹ میکروگرم بر میلی لیتر و در نمونه مقاوم ۳/۶ میکروگرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی آن ها به ترتیب ۱/۸ و ۷/۲ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است و خاصیت مهارکنندگی و هم افزایی آموکسی سیلین و کلاولانیک اسید با کیتوزان را گزارش کردند (۲۴).

باتوجه به اینکه اثرات ضد میکروبی نانوذرات رامنولیبیدا به همراه فیلم و ژل کیتوزان بررسی شد، تکرار این آزمون با روش ها و ماده های مختلف مورد نیاز می باشد. همچنین اثرات ضد میکروبی این ماده به همراه جنتامایسین و

سیپروفلوکساسین نویدبخش مسیری جدید برای مقابله با میکروارگانیزم *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می باشد، که البته بررسی اثرات این ترکیب علیه باکتری فرصت طلب *سودوموناس آئروژینوزا* توصیه می گردد. همچنین بهتر است جهت اثربخشی بیشتر گزارشات دقیق تر MIC و MBC ملحوظ گردد.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب نانوذرات رامنولیبیدا و کیتوزان با دو آنتی بیوتیک جنتامایسین و سیپروفلوکساسین اثرات بسیار مطلوبی را در مقابل دو باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را دارد. بسیاری از مطالعات هم اثرات آنتی باکتریال این مواد را به روشنی نشان می دهد که امید هست جهت جلوگیری از گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی، مواد آنتی باکتریال جایگزین یا ترکیب با آنتی بیوتیک گردد.

تشکر و قدردانی

از تمامی همکارانی که در این مطالعه پژوهشگران را یاری نمودند سپاسگزاری می شود. از آزمایشگاه دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل که با در اختیار قرار دادن بخشی از آزمایشگاه میکروبی و آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی ایران که در تهیه نانوذرات و فیلم و ژل سازی همکاری نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچگونه تعارض منافعی نداشتند.

Reference

1. Nikbakht Z, Rafighi D, Taghinejad J. Investigation of antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from traditional cheeses in Jolfa county. *Journal of Quality and Durability of Agricultural Products and Food Stuffs*. 2024;2(4):51-9.
2. Riedel S, Morse SA, Mietzner TA, Miller S. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg*-28: McGraw Hill Brasil; 2022.
3. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*. 2015;109(7):309-18.
4. Ranjalkar J, Chandy SJ. India's National Action Plan for antimicrobial resistance - An overview of the context, status, and way ahead. *J Family Med Prim Care*. 2019;8(6):1828-34.

5. Das B, Verma J, Kumar P, Ghosh A, Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*. 2020;38 Suppl 1:A83-a92.
6. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4).
7. Baker SJ, Payne DJ, Rappuoli R, De Gregorio E. Technologies to address antimicrobial resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(51):12887-95.
8. Ayukekbong JA, Ntemgwa M, Atabe AN. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017;6:47.
9. Islam S, Bhuiyan MAR, Islam MN. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *Journal of Polymers and the Environment*. 2017;25(3):854-66.
10. Muthu M, Pushparaj SSC, Gopal J, Sivanesan I. A Review on the Antimicrobial Activity of Chitosan Microspheres: Milestones Achieved and Miles to Go. *Journal of Marine Science and Engineering*. 2023;11(8):1480.
11. Rodríguez-Vázquez M, Vega-Ruiz B, Ramos-Zúñiga R, Saldaña-Koppel DA, Quiñones-Olvera LF. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int*. 2015;2015:821279.
12. Sekhon Randhawa KK, Rahman PK. Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market. *Front Microbiol*. 2014;5:454.
13. Costa SG, Nitschke M, Lépine F, Déziel E, Contiero J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. *Process Biochemistry*. 2010;45(9):1511-6.
14. Raza ZA, Khalid ZM, Banat IM. Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2009;44(13):1367-73.
15. Walter V. New approaches for the economic production of rhamnolipid biosurfactants from renewable resources. 2009.
16. Kazemian M AH, Rastegari. A, Malek Mahmoudi. S, Aghsami, M. . Investigating the antimicrobial effect of chitosan film and gel containing rhamnolipid nanoparticles produced by *Pseudomonas aeruginosa* on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *IJIDTM Journal*. 2023;27(99):35-47.
17. Rai S, Dash D, Agarwal N. Introducing the new face of CLSI M100 in 2023: An explanatory review. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2023;46:100432.
18. Roshdi Maleki M, Fathi M, Taghinejad J, Ghaffarzadeh A. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) type's blaVEB-1 and blaCTX-M-9 in *Escherichia coli* strains isolated from clinical samples by PCR technique. *Journal of Medical Council of Iran*. 2023;40(2):96-103.
19. Ravash N, Hesari J. A review on veterinary drug residues in foods of animal origin and the effect of different processes on their stability. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*. 2021;52(1):147-68.
20. Sobhani Z, Samani SM, Montaseri H, Khezri E. Nanoparticles of chitosan loaded ciprofloxacin: Fabrication and antimicrobial activity. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2017;7(3):427.
21. Bagheri T, Rahimi K, Bagheri Lotfabad T. Effects of Cream Containing Rhamnolipid Microbial Surfactants from *Pseudomonas aeruginosa* MR01 on Growth Inhibition of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2020;30(184):14-27.
22. Bettencourt AF, Tome C, Oliveira T, Martin V, Santos C, Gonçalves L, et al. Exploring the potential of chitosan-based particles as delivery-carriers for promising antimicrobial glycolipid biosurfactants. *Carbohydrate Polymers*. 2021;254:117433.
23. REZAEI P, KASRA KR. The Antimicrobial Effect of Chitosan Nano Particles Film on Two Species of Food Bacteria. 2015.
24. Akbari N, Ashrafi F, Salehi M. Antibacterial Effects of Chitosan Nanoparticles Loaded with Amoxicillin and Clavulanic acid against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. 2019.

Original Article

Investigation of the antimicrobial effect of chitosan film and gel containing *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid nanoparticles compared to ciprofloxacin and gentamicin on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Received: 20/04/2025 - Accepted: 11/08/2025

Maryam Kazemian¹
Hamid Kazemian²
Mahdi Rezaverdinejad³
Javid Taghinejad^{3*}

¹ Department of Chemical Engineering,
Faculty of Chemical Engineering,
Babol Noshirvani University of
Technology, Mazandaran, Iran

² Department of Animal and Bird
Genetic and Breeding and Genetics,
Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources,
Gorgan, Iran

³ Department of Microbiology, Faculty
of Veterinary Medicine, Urmia
University, Urmia, Iran

Email: jataghinejad@gmail.com

Abstract

Introduction: Antibacterial resistance has become a global challenge, and the indiscriminate and irrational use of antibiotics in humans and animals has led to the spread of drug resistance in microorganisms. The present study investigated and compared two antibiotics, ciprofloxacin and gentamicin, with rhamnolipid nanoparticles (NPs) coated by chitosan film and gel on two bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Methods: In this study, first rhamnolipid was produced from sunflower oil and *Pseudomonas aeruginosa* and converted into NPS, then 2% chitosan solution was prepared using 1% acetic acid. Then 7.5% glycerin was added as a softener and 0.1% rhamnolipid NPs were added to the obtained homogeneous solution by sampler. Ciprofloxacin and Gentamicin antibiotic discs were used for comparison and antibiogram, Zeta and DLS analysis were used to size rhamnolipid particles.

Results: DLS and ZPS analysis showed that the produced rhamnolipid had a good degree of stability. The antibacterial effects of Gentamicin + chitosan film and rhamnolipid NPs were observed to be the most effective in creating inhibition diameter of 29 mm in *Staphylococcus Aureus* compared to *Escherichia coli*, and the effect of Ciprofloxacin + rhamnolipid NPs was also reported in both bacteria with very close inhibition diameters.

Conclusion: The results of this study showed that combining antibiotics with antibacterial materials such as chitosan film and gel with rhamnolipid NPs shows good effects, also new methods such as Nano formulating are a suitable alternative to improve and accelerate therapeutic methods.

Keywords: Chitosan, rhamnolipid, antibiotic, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

Acknowledgement: There is no conflict of interest