

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی عامل دار بر کلبسیلا پنومونیه

مریم مهدی زاده^۱، مژگان شیخ پور^{۲*}، ایمان سلحشوری فر^۱، سید داور سیادت^۳، پروانه صفاریان^۱

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- بخش سل و تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات میکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: m_sheikhpour@pasteur.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۲

چکیده:

کلبسیلا پنومونیه، باسیل گرم منفی از اعضای خانواده *انتروباکتریاسه* می باشد و علی رغم اینکه جزئی از میکروفلور طبیعی بدن می باشد، یک پاتوژن فرصت طلب و از عوامل اصلی عفونت های بیمارستانی است. افزایش ظهور مقاومت به چند دارو در کلبسیلا پنومونیه گزینه های درمانی را برای این باکتری محدود کرده است. نانولوله های کربنی می توانند با بهبود پایداری و حلالیت دارو، اثربخشی داروها را افزایش دهند. هدف این تحقیق، تهیه و ارزیابی اثر آنتی باکتریال نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی عامل دار بر کلبسیلا پنومونیه جدا شده از نمونه های بالینی می باشد. برای تأیید سویه تست های بیوشیمیایی IMViC، کیت API20E و تست های افتراقی تکمیلی انجام شد. مقاومت آنتی بیوتیکی با روش انتشار دیسک تعیین شد. سویه مورد مطالعه، نسبت به تمامی آنتی بیوتیک های مورد بررسی از جمله سفپیم، مقاومت نشان داد. کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) با استفاده از روش میکرو رقت آنتی بیوتیک تعیین شد. MIC در ۵ حالت اثردهی شامل آنتی بیوتیک، نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی چند جداره عامل دار، نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی چند جداره بدون عامل، آنتی بیوتیک به همراه نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی چند جداره بدون عامل و آنتی بیوتیک به همراه نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی چند جداره عامل دار، تعیین شد. علی رغم اینکه اثردهی $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ سفپیم و $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ آنتی بیوتیک به همراه نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی چند جداره عامل دار در پلیت های جداگانه، قادر به مهار رشد باکتری نشد اما اثردهی همزمان $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ سفپیم به همراه $800 \mu\text{g ml}^{-1}$ نانولوله های کربنی چند جداره عامل دار، رشد باکتری را به طور کامل مهار کرد.

کلیدواژگان: سفپیم، نانولوله های کربنی چند جداره عاملدار، کلبسیلا پنومونیه، نانوسیال، دارورسانی، کمترین دوز مهارکنندگی

کلبسیلا پنومونیه ایجاد می‌شوند، به سراسر جهان گسترش یافته است^[۱۷]. کاهش حساسیت این باکتری به آنتی بیوتیک‌ها از جمله سفپیم، منجر به شکست درمانی دارو با این آنتی بیوتیک شده است، نیاز به روش‌های نوین دارو رسانی را تقویت می‌کند^[۴۲]. کاربرد نانوتکنولوژی در درمان، به طور گسترده در بسیاری از جنبه‌های پزشکی مخصوصاً در دارورسانی بررسی شده است^[۱۸،۴۱]. تعدادی از نانو ذرات از قبیل لیپوزوم‌ها، نانو ذرات پلیمریک، نانو ذرات بر پایه لیپید و نانو ذرات سیلیکا، به منظور ورود تسهیل شده به درون سلول میزبان، تولید شده‌اند تا باکتری‌های درون سلولی را ریشه کن کنند^[۴،۲۹،۴۰]. با همراه کردن دارو‌ها با نانوذرات، ایندکس در مانی دارو‌ها به طور چشمگیری در مقایسه با داروهای آزاد، بهبود پیدا کرد. مواد زیستی با ساختار نانو به ویژه نانوذرات، به دلیل ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی منحصر به فردی که دارند از قبیل اندازه کوچک، نسبت سطح به جرم بزرگ، واکنش گری بالا، می‌توانند دارورسانی داروهای ضد میکروبی را تسهیل کنند و در نتیجه بر برخی از محدودیت‌های درمانی های آنتی بیوتیکی قدیمی، غلبه کنند^[۱۸،۲۹،۴۰،۴۱]. سه مدل نانولوله کربنی ۲ (CNT) سنتز شده‌اند: نانولوله های کربنی تک لایه ۳ (SWCNTs)، نانولوله های کربنی دو لایه ۴ (DWCNTs) و نانولوله‌های کربنی چند لایه ۵ (MWCNTs)^[۱۹-۲۳،۳۳]. از رول شدن یک صفحه گرافن، SWCNTs، از رول شدن دو صفحه گرافن DWCNTs و از رول شدن چند صفحه گرافن MWCNTs ایجاد می‌شود^[۳۹،۴۳] (شکل ۱).

محلول همگن و سوپانسیون پایدار از مواد افزودنی، مانند نانومواد در یک سیال پایه که به عنوان

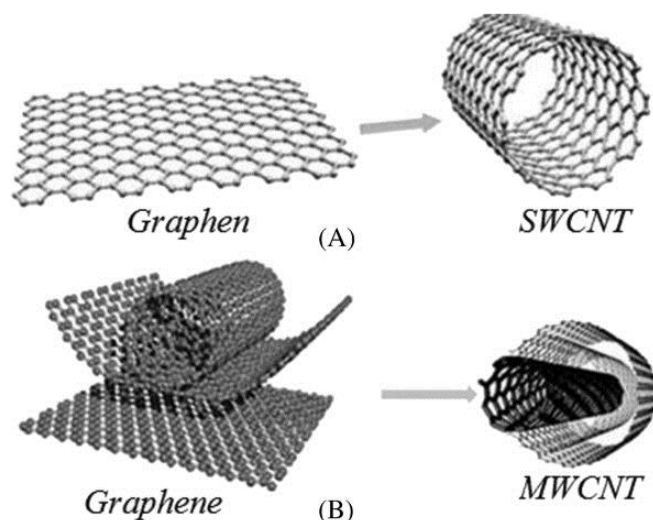
۱- مقدمه

اهمیت عمده کلبسیلا پنومونیه به‌عنوان یک پاتوژن فرصت طلب در انسان، به خاطر ایجاد عفونت در بیماران بستری در بیمارستان و مقاومت رو به افزایش به آنتی بیوتیک‌ها است^[۱-۵]. سالانه حدوداً ۲ میلیون عفونت بیمارستانی در ایالات متحده رخ می‌دهد و از این تعداد، ۱۰۰۰۰۰ نفر جان خود را ازدست می‌دهند^[۶،۳۶،۴۵]. براساس آخرین گزارش مرکز مدیریت بیماری‌ها در ایران، میزان بروز عفونت‌های بیمارستانی، ۱/۲۳ درصد بوده است که این رقم، بسیار پایین‌تر از میزان بروز مورد انتظار (۸٪) است و اطلاع از کم شماری موارد می‌دهد^[۳۸]. این برآورد کم احتمالاً به دلیل ضعف سیستم نظارت در پیگیری بیماران پس از ترخیص می‌باشد^[۳۷]. در صد موارد مرگ ناشی از عفونت‌های بیمارستانی در ایران، از ۱۷/۶٪ در سال ۱۳۸۵، به ۷/۲٪ در سال ۱۳۹۵ کاهش یافته است^[۳۸]. گونه‌های جنس کلبسیلا، مسبب ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌ها شامل سپتی سمی، پنومونی، عفونت‌های زخم جراحی، عفونت مجاری ادراری (UTI) و آبسه‌های کبدی پایورژنیک هستند^[۱۱-۱۷]. کلبسیلا پنومونیه تعدادی فاکتور ویروالانس تولید می‌کند که مرتبط با بیماری‌زایی می‌باشند. این فاکتورها، شامل آنتی ژن‌های O و آنتی ژن‌های کپسولی، لیپوپلی ساکارید، ادھزین‌های فیمبریه و سیدروفورهای شلاته کننده آهن می‌باشند^[۱۰،۱۲]. ادھزین‌های فیمبریه که باعث چسبندگی به سطح سلول‌های اپی تلیال میزبان می‌شوند با مشارکت کپسول، باعث تشکیل بیوفیلم باکتری می‌شود^[۴،۱۳،۱۴]. سویه‌های مقاوم به انواع آنتی بیوتیک‌ها، یکی از مشکلات اصلی در درمان پنومونی ناشی از کلبسیلا پنومونیه است^[۱۰،۱۶]. گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO) حاکی از آن است که مقاومت به درمان عفونت‌های تهدید کننده حیات که توسط باکتری روده‌ای

4. Double Wall Carbon Nanotubes
5. Multi Wall Carbon Nanotubes

1. World Health Organization
2. Carbon Nanotube
3. Single Wall Carbon Nanotubes

نانوسیال^۶ (NF) شناخته می شود، اولین بار توسط چوی^۷ در سال ۱۹۹۵ پیشنهاد شد [۴۸].



شکل ۱- ساختار SWCNTs و MWCNTs. (A) نانولوله های کربنی تک لایه (SWCNTs)، گرافن رول شده طویل هستند (B) نانولوله کربنی چند لایه (MWCNTs)، از روی هم قرار گرفتن چند لایه گرافن رول شده حاصل می شود [۳۹].

نشان می دهند و با توجه به عامل دار بودن، با راندمان بالاتری به دیواره باکتری نفوذ کرده و آثار تخریبی خود را اعمال می کنند. عامل دار کردن نانولوله های کربنی، باعث بهبود فعالیت آنتی باکتریال و میانکنش با دیواره باکتری ها و تخریب آن می شود (شکل ۲).

بنابراین به منظور بهبود کارایی و کاهش سمیت، نانولوله های کربنی، با عامل اسیدی، عامل دار شدند. هدف از این تحقیق، تهیه نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی چند لایه عامل دار^{۱۰} (f-MWCNTs) و بررسی اثر آن بر کلبسیلا پنومونیه در شرایط invitro می باشد. مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری قبل و بعد از اثردهی f-MWCNTs در ترکیب با آنتی بیوتیک سفپیم با استفاده از تست های MBC و MIC^{۱۱} مقایسه شد. تاکنون دارورسانی با استفاده از نانوسیال حاوی نانولوله کربنی برای این باکتری به روش در حال مطالعه، انجام نشده است و این پژوهش می تواند

نانوسیالات، امولسیون یا سوسپانسیون نانو ساختارها در مایع هستند که به نانو ساختارها امکان پراکندگی پایدار و همگن می دهند. دستیابی به یک نانو سیال پایدار، طی چندین مرحله حاصل می شود که شامل سنتز نانومواد، هم زدن فیزیکی، همگن سازی بوسیله فراصوت، مهندسی سطح و استفاده از سورفکتانت و سایر مواد افزودنی شیمیایی است [۱۶،۲۳،۲۴،۴۸]. مطالعه عملکرد آنتی باکتریال نانو ذرات نشان داد با اثردهی همزمان سفپیم و نانوذرات^۸ (NPs) بر کلبسیلا پنومونیه، کمترین دوز کشندگی^۹ (MBC) سفپیم کاهش پیدا می کند [۴].

از آنجا که MWCNTs در مقایسه با SWCNTs از سمیت کمتری برخوردار است، بنابراین در مطالعه حاضر از MWCNTs استفاده شد [۴۴]. آثار آنتی باکتریال خوبی بر سویه های باکتری مقاوم به چند دارو

9. Minimum Bactericidal Concentration

10. Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes

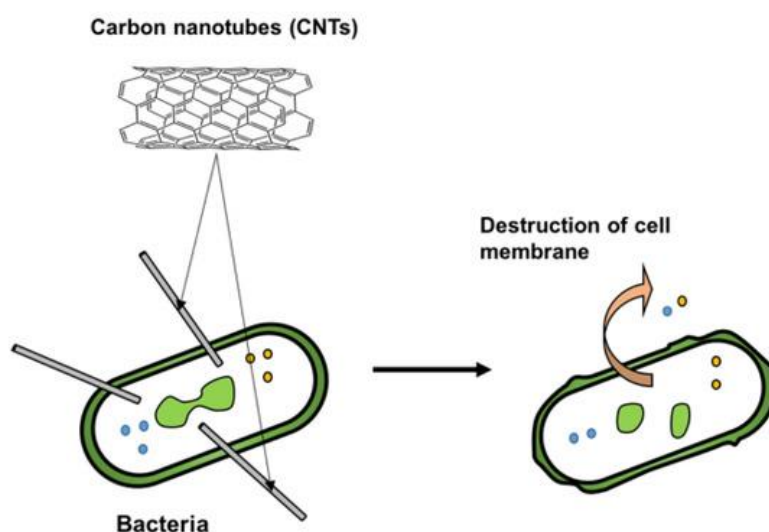
11. Minimum Inhibitory Concentration

6. Nanofluid

7. Choi

8. Nano Particles

در جهت مدیریت عفونت بیمارستانی ناشی از این پاتوژن، مؤثر واقع شد.



شکل ۲- مکانیسم عمل نانو لوله های کربنی. تخریب دیواره، اصلی ترین مکانیسم اثر CNTs بر باکتری است که از این طریق باعث مرگ باکتری می شوند [۳۵].

الکترونی SEM^{۱۶} و TEM انجام شد. ساختار کریستالوگرافی MWCNT های عملکردی توسط XRD تأیید شد [۲۸ و ۲۷، ۲۵]. همچنین از آنالیز EDX برای اندازه گیری افزایش اتم های اکسیژن با افزایش زمان تیمار اسیدی استفاده شد [۳۶]. گواهی آنالیز شرکت US Research در جدول ۲ آمده است.

۲-۳ تهیه نانوسیال^{۱۷}

در این مرحله، ۰/۲ گرم پودر نانو، ۶ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ و ۰/۰۶ گرم صمغ عربی^{۱۸} به ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد و مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه به وسیله همزن، هم زده شد. در مرحله بعدی، محلول در یک ظرف یخ قرار داده شد و پس از آن، فراصوت به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰۰ وات انجام شد [۴۹، ۱۶].

۲- مواد و روش ها

۲-۱ تهیه نانو لوله های عامل دار (f-MWCNT)

نانو لوله های عامل دار شده با عامل اسیدی (MWCNT-COOH) از شرکت US Research (USA) خریداری شد که با روش رسوب بخار شیمیایی^{۱۲} (CVD) تهیه شده است. طول نانولوله های کربنی 10-30 μm ، قطر خارجی آنها < 8 nm و قطر داخلی آنها 2-5 nm است (جدول ۱).

۲-۲ تعیین مشخصات نانو لوله های عامل دار

مشاهدات میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM اصلاح سطح و مورفولوژی MWCNT ها را پس از عامل دار شدن تأیید کرد (شکل A, B-۳). تجزیه و تحلیل MWCNTs عامل دار با آنالیزگر حرارت سنجی^{۱۳} (TGA) (شکل ۴)، پراش اشعه ایکس^{۱۴} (XRD)، (شکل ۵) آنالیز پراکندگی انرژی اشعه ایکس^{۱۵} (EDX) و میکروسکوپ

16. Scanning Electron Microscope
17. Nanofluid
18. Arabic gum

12. Chemical Vapor Deposition
13. Thermogravimetric Analyzer
14. X-Ray Diffraction
15. Energy Dispersive X-Ray

۴-۲ آزمایش های بیوشیمیایی

سویه پاتوژن کلبسیلا پنومونیه از بانک میکروبی بخش سل و رویی ازستیتو پاستور ایران تهیه شد. پس از کشت بر روی محیط افتراقی مک کانکی آگار^{۱۹}، براساس نتایج تست های بیوشیمیایی موجود در سیستم API20E، تأیید شد. همچنین تست های IMViC شامل تست اندول^{۲۰}، متیل رد^{۲۱}، ووگس- پروسکائر^{۲۲}، هیدرولیز سترات^{۲۳} و تست های افتراقی تکمیلی اوره آز، تخمیر قندها^{۲۴} (TSI)، اکسیداز و تحرک^{۲۵}، به منظور تأیید سویه ها انجام گردید (شکل ۶).

۴-۵ سنجش حساسیت دارویی^{۲۶}

تست مقاومت به آنتی بیوتیک ها با روش انتشار دیسک^{۲۷} روی محیط کشت مولر آگار، انجام شد. به این منظور، در لوله دربیچ دار، 2 ml سرم فیزیولوژی ریخته و چند کلونی از باکتری سویه پاتوژن داخل هر لوله وارد و ورتکس شد و کدورت آن با ۰/۵ مک فارلند (1.5×10^8 CFU.mL⁻¹) مطابقت داده شد. سپس 1 ml از سوسپانسیون تهیه شده روی محیط مولر آگار ریخته و با سواب استریل پخش شد. سپس دیسک های آنتی بیوتیک با فاصله از هم روی محیط مولر آگار، چیده و به مدت ۱۶-۱۸ ساعت، داخل انکوباتور^{۲۸} 37°C قرار داده شد. در نهایت هاله عدم رشد، اندازه گیری و برای تعیین مقاومت یا حساسیت، با راهنمای CLSI^{۲۸} 2020، مقایسه شد^[۳۱].

۶-۲ تست های میکروبی

MIC^{۲-۶-۱}

MBC^{۲-۶-۲}

به منظور تعیین MIC آنتی بیوتیک، ابتدا 95 µl مولر هیتون برات^{۲۹} (MHB)، داخل چاهک های میکرو پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. سپس 1µl، از هر یک از رقت های سریالی آنتی بیوتیک و در نهایت 5µl، از سوسپانسیون باکتری کلبسیلا پنومونیه (مطابق با رقت ۰/۵ مک فارلند) اضافه شد. در چاهک کنترل، فقط 95 µl MHB و 5µl از سوسپانسیون باکتری اضافه شد و میکروپلیت، در دمای 37°C به مدت ۱۶-۱۸ ساعت، انکوبه گردید. برای تعیین MIC نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی چند لایه عامل دار، پس از افزودن 95 µl MHB داخل چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه، مقادیر مختلف نانوسیال (5, 10, 20, 30, 40, 50 µL)، به هر چاهک افزوده و در نهایت 5µl، از سوسپانسیون باکتری کلبسیلا پنومونیه (مطابق با رقت ۰/۵ مک فارلند) اضافه شد. برای تعیین MIC نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی چند لایه عامل دار به همراه آنتی بیوتیک، ۱µl MHB + ۹۵ میکرولیتر از رقت سریالی آنتی بیوتیک + ۱µl ۵۰ و ۴۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰، ۵ نانوسیال، به ترتیب حاوی ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ نانولوله های کربنی چند لایه عامل دار و ۵ µl از سوسپانسیون باکتری کلبسیلا پنومونیه با رقت معادل ۰/۵ مک فارلند به هر چاهک افزوده شد. کنترل مثبت و منفی، به ترتیب بدون عامل ضد میکروبی و باکتری نیز لود^{۳۰} شد. برای جلوگیری از خشک شدن چاهک ها در اثر تبخیر، میکروپلیت درون فویل آلومینیوم پیچیده و سپس به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

25. Mobility
26. Drug Susceptibility
27. Disc Diffusion
28. Clinical and Laboratory Standards Institute
29. Mueller Hinton Broth
30. Load

19. MacConkey Agar
20. Indole
21. Methyl Red
22. Voges-Proskauer
23. Citrate Utilization
24. Three Sugar Iron Agar

برای انجام MBC، ابتدا میکروپلیت MIC، از نظر کدورت و شفافیت (رشد یا عدم رشد باکتری) با دقت بررسی شد. سپس با توجه به اینکه MIC سفیم، $10 \mu\text{g/mL}$ تعیین گردید، برای یافتن MBC، رقت پایین تر سفیم، یعنی $5 \mu\text{g/mL}$ نیز کشت داده شد. همچنین دوزهای $50 \mu\text{l}$ و 40 ، 30 ، 20 ، 10 ، 5 نانوسیال حاوی *f*-MWCNTs و نانوسیال حاوی *f*-MWCNTs در ترکیب با $5 \mu\text{g/mL}$ و $10 \mu\text{g/mL}$ سفیم نیز کشت شد. به این منظور، از چاهک‌های مورد نظر، با فیلدوپلاتین استریل برداشته و روی محیط کشت مولر آگار، کشت خطی انجام شد. سپس به مدت $16-18$ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردید و روز بعد، رشد یا عدم رشد کلونی باکتری، مورد بررسی قرار گرفت.

تازه به قالب‌ها افزوده و داخل فر 70°C قرار گرفت تا در اثر حرارت، پلیمریزه و قابل برش شد. در نهایت با دستگاه اولترا میکروتوم به ابعاد $60-70 \text{ nm}$ برش داده شد و به وسیله پنس روی یک توری مسی به نام Grid قرار گرفت.

۲-۷-۲ رنگ آمیزی برای مشاهده با TEM

یک قطره اسنات اورانیوم، روی پارافیلیم در کف پتری دیش، ریخته شد. Grid، با پنس روی قطره قرار گرفت و 20 دقیقه شناور ماند. Grid، به مدت 5 دقیقه، روی یک قطره سترات سرب، داخل پتری دیش، شناور شد. پس از شستشو با آب مقطر کاملاً خشک شد و در نهایت با میکروسکوپ الکترونی عبوری مشاهده شد.

۳- نتایج

۳-۱ مشخصات نانولوله های کربنی عامل دار

در مطالعه حاضر نانولوله های کربنی عامل دار مورد استفاده، لوله‌هایی چند لایه به طول $300-500 \mu\text{m}$ قطر داخلی $2-5 \text{ nm}$ و قطر خارجی 8 nm می باشند. مشخصات کامل نانولوله های کربنی عامل دار در جدول ۱ آمده است.

تصویر سطح MWCNTs عامل دار با میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد (شکل ۳). برای تأیید میزان پیوند گروه کربوکسیل ($-\text{COOH}$) در سطوح MWCNTs و بررسی پایداری حرارتی نانولوله ها، آنالیز وزن-دما (TGA) بر روی *f*-MWCNT انجام شد. TGA نشان داد که درصد عامل دار شدن سطح MWCNTs، بستگی به از دست دادن وزن دارد. دمای تجزیه در منحنی TGA، ثبات حرارتی گروه‌های عامل را منعکس می کند (شکل ۴).

EDX، ترکیب شیمیایی *f*-MWCNT را نشان داد. ساختار کریستالوگرافی *f*-MWCNT توسط پراش اشعه ایکس تعیین شد (شکل ۵). همچنین، اجزاء تشکیل دهنده

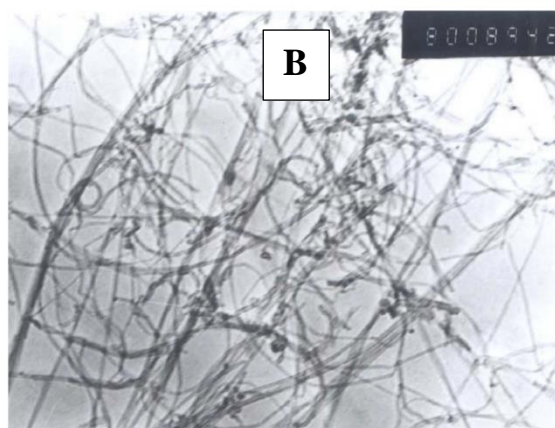
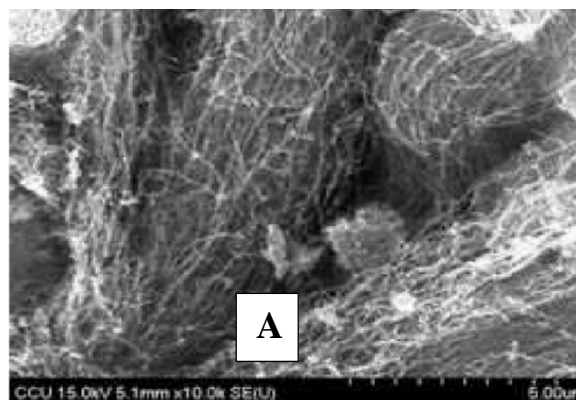
۲-۷ آماده سازی نمونه برای میکروسکوپ الکترونی گذاره TEM^{۳۱}

۲-۷-۱ تهیه برش برای TEM

ابتدا نمونه داخل محلول فیکساتور گلوتار آلدهید به مدت $3-4$ ساعت قرار داده شد و 3 مرتبه به مدت 20 دقیقه با بافر فسفات تروکساید 1% در بافر فسفات 0.1 مولار $\text{pH } 7.2$ به عنوان فیکساتور دوم به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس 3 مرحله شستشو با بافر فسفات هر بار 10 دقیقه انجام شد و آگیری با اتانول 25 درجه، 50 درجه، 70 درجه هر کدام به مدت 10 دقیقه انجام شد. در مرحله بعد، آگیری مجدد با اتانول 96 و 100 درجه هر کدام دو بار 15 دقیقه انجام شد. 2 مرتبه هر بار 10 دقیقه استون افزوده شد. یک تا دو ساعت، داخل رزین و استون که با نسبت 1 به 1 تهیه شد قرار گرفت. و سپس یک شب درون رزین خالص، باقی ماند و روز بعد یک تا دو بار دیگر رزین افزوده و تعویض شد. در مرحله بعد، داخل قالب مخصوص ریخته شد. رزین

f-MWCNT و درصد محتوای هر یک از عناصر، تعیین

گردید (جدول ۲).

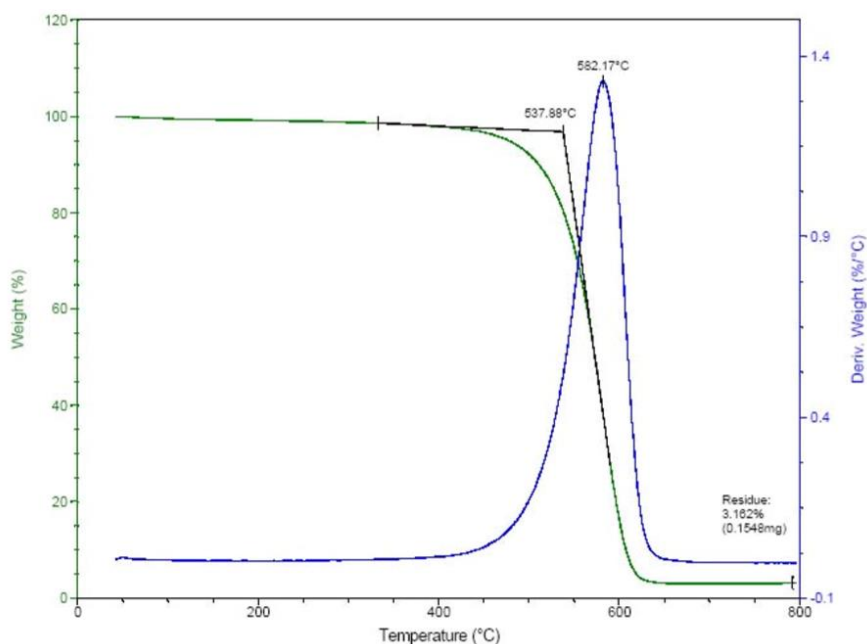


شکل ۳- A) تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM از نانولوله های کربنی چند لایه عامل دار (*f*-MWCNT) (B) تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM از *f*-MWCNT

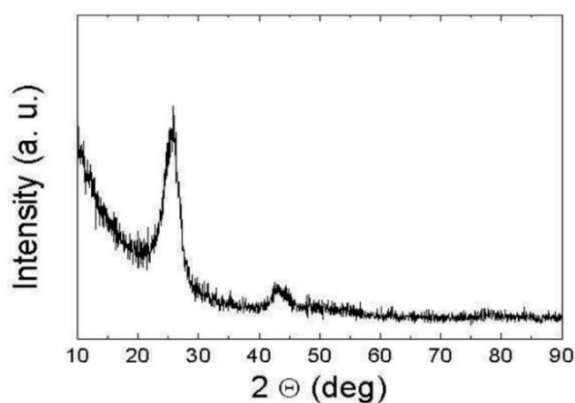
جدول ۱- مشخصات نانولوله های کربنی عامل دار (*f*-MWCNT)

درصد خلوص	۹۵٪
محتوای -COOH	۳٪/۸ وزن مولکولی
مساحت ویژه (SSA)	>500 m ² /g
قطر داخلی	2-5 nm
قطر خارجی	<8 nm
طول نانولوله ها	10-30 μm

SSA: Special Surface Area



شکل ۴- آنالیز حرارت سنجی (TGA: Thermogravimetric Analyzer) نانولوله های کربنی چند لایه عامل دار



شکل ۵- الگوی پراش اشعه ایکس (XRD: X-Ray Diffraction Pattern) مربوط به f-MWCNT

جدول ۲- گواهی آنالیز f-MWCNT

اجزاء تشکیل دهنده	مقدار محتوا (%)
کربن	۹۷/۴۶
کلر	۱/۰۲
آلومینیوم	۰/۱۹
کیالت	۱/۰۹
گوگرد	۰/۲۴

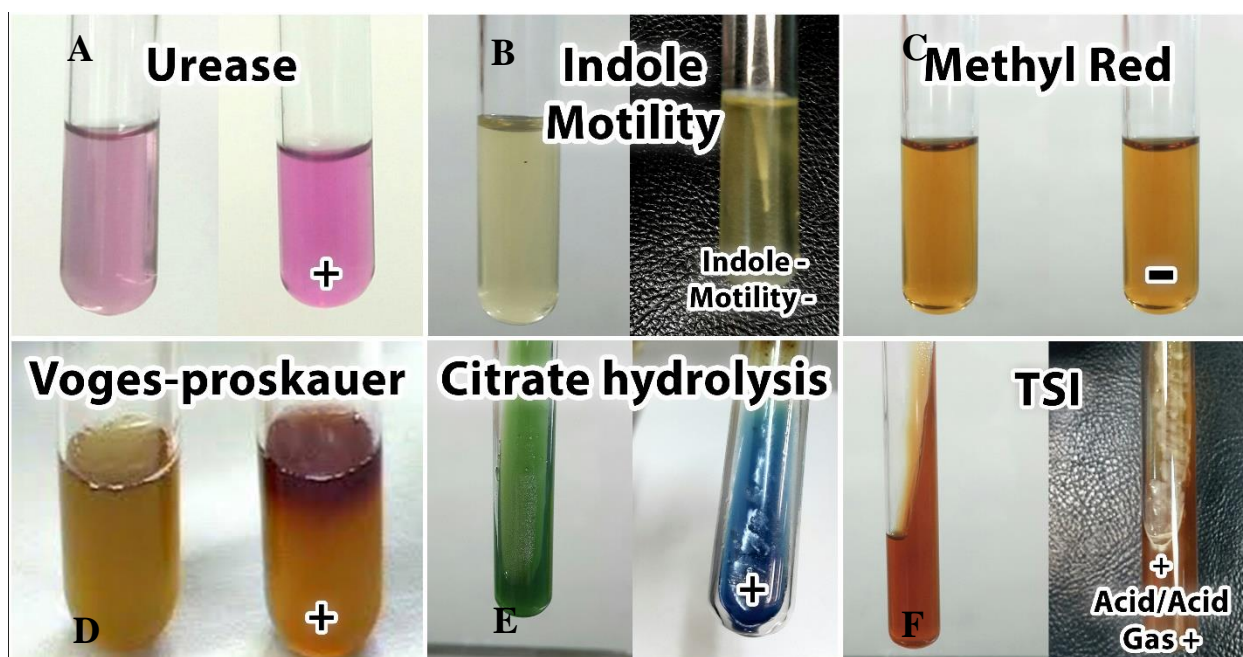
نتایج تست های بیوشیمیایی پس از انکوباسیون و افزودن معرف، مشاهده شد که در جدول ۳ آمده است و تصاویر

۲-۳ تست های بیوشیمیایی

بعد از تلقیح باکتری و انکوباسیون، در شکل ۶ قابل مشاهده است.

جدول ۳- نتایج تست های بیوشیمیایی افتراقی سویه پاتوژن ES133 کلبسیلا پنومونیه

آزمایش بیوشیمیایی	ایندول (I)	متیل رد (M)	وگس پروسکائر (V)	سیترات (C)	حرکت	اوره آز	TSI (تخمیر قندها)	اکسیداز
نتایج	-	-	+	+	-	+	+	-



شکل ۶- نتایج تست های بیوشیمیایی افتراقی سویه پاتوژن ES133 کلبسیلا پنومونیه. (A) تست اوره آز: تغییر رنگ با تاخیر از صورتی به ارغوانی مشاهده شد (مثبت)؛ (B) تست ایندول: پس از افزودن معرف کوآکس، حلقه قرمز مشاهده نشد (منفی) تست حرکت: پس از تلقیح باکتری با نیدل، رد نیدل پخش نشد و تست حرکت، منفی شد؛ (C) تست متیل رد: پس از افزودن معرف و انکوباسیون عدم تغییر رنگ مشاهده گردید (منفی)؛ (D) تست وگس-پروسکائر: پس از افزودن معرف و انکوباسیون حلقه قرمز رنگ تشکیل و مشاهده شد؛ (E) تست هیدرولیز سیترات: تغییر رنگ از سبز، به آب مشاهده شد که علامت هیدرولیز سیترات است (مثبت) و (F) تست تخمیر قندها (TSI) رویت رنگ زرد، هم در سطح و عمق محیط کشت به دلیل ایجاد اسید در اثر هیدرولیز قند می باشد (مثبت). همچنین حباب های گاز نیز در سطح محیط مشاهده شد.

شامل سفیم، سیپروفلوکساسین، سفوکسیتین، سفنازیدیم، سفالوتین، ایمی پنم، مروپنم، ارتاپنم، دوری پنم، آزترونام،

۳-۳ تست حساسیت دارویی (آنتی بیوگرام)

با مقایسه بین اندازه هاله عدم رشد باکتری و راهنمای CLSI سال ۲۰۲۰^[۳۱]، سویه پاتوژن کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه، نسبت به تمامی آنتی بیوتیک های مورد بررسی

مقاومت نشان داد و نسبت به جتتامایسین و کلرامفنیکل،

حساسیت بینابینی ۳۲ نشان داد (جدول ۴).

جدول ۴- نتایج آنتی بیوگرام با روش انتشار دیسک برای سویه پاتوژن 133 کلبسیلا پنومونیه طبق راهنمای CLSI 2020 [۳۱]

آنتی بیوتیک	نام اختصاری آنتی بیوتیک	دوز (µg)	قطر هاله عدم رشد (mm)	CLSI			نتایج (R/ I/ S)
				حساس (mm)	حد واسط (mm)	مقاوم (mm)	
سفوکسیتین	CFX	30	0	>18	15-17	<14	R
سفتازیدیم	CAZ	30	0	>21	1-20	<17	R
سپیم	CPM	30	0	>25	19-24	<18	R
سیپروفلوکساسین	CIP	5	0	>21	16-20	<15	R
ایمی پنم	IMI	10	8	>23	20-22	<19	R
ارتاپنم	ETP	10	0	>22	19-21	<18	R
مروپنم	MEM	10	0	>23	20-22	<19	R
دوری پنم	DOR	10	8	>23	20-22	<19	R
آزترونام	ATM	۳۰	۰	>۲۱	18-20	<17	R
جتتامایسین	GM	10	14	>15	13-14	<12	I
کلرامفنیکل	C	30	13	>18	13-17	<12	I
کلیستین	CO	25	11	ND	ND	ND	ND

R: Resistant, I: Intermediate, S: Sensitive, ND: Not determined

۲-۴-۳ MBC

اثردهی $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ سفیم، صرفاً باعث کاهش رشد کلبسیلا پنومونیه شد، در حالی که اثردهی همزمان $10 \mu\text{g/ml}$ سفیم در ترکیب با $800 \mu\text{g ml}^{-1}$ از f MWCNT، باعث کشتن سویه پاتوژن کلبسیلا پنومونیه شد (شکل C-۸ و C-۹). نتایج کلی MBC با اثردهی رقت های مختلف f -MWCNT و سفیم در جدول ۵ آمده است.

۴-۳-۳ تست های میکروبی

۱-۴-۳ MIC

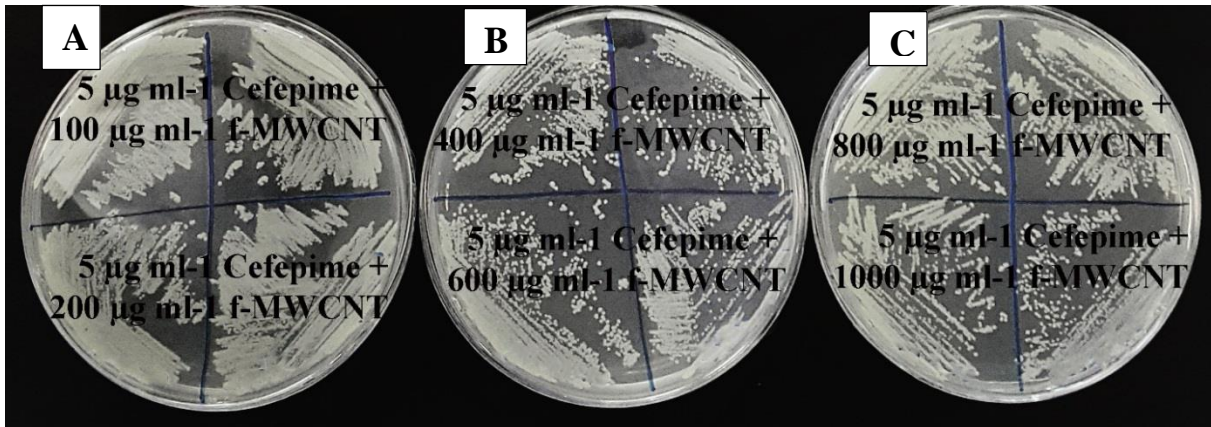
بررسی نتایج MIC، بصورت مشاهده کدورت (رشد باکتری) یا شفافیت (عدم رشد باکتری) چاهک ها، با دقت و با چشم غیر مسلح انجام شد. در اثردهی رقت های سریالی ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$ - 0.062) سفیم بر باکتری کلبسیلا پنومونیه، $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ از آنتی بیوتیک، صرفاً باعث کاهش کدورت (کاهش رشد باکتری) شد و رشد باکتری را به طور کامل مهار نکرد. با اثردهی سایر رقت های آنتی بیوتیک، تغییری در کدورت مشاهده نگردید.

جدول ۵- نتایج MBC اثردهی دوزهای سفیم و نانوسیال بر کلبسیلا پنومونیه

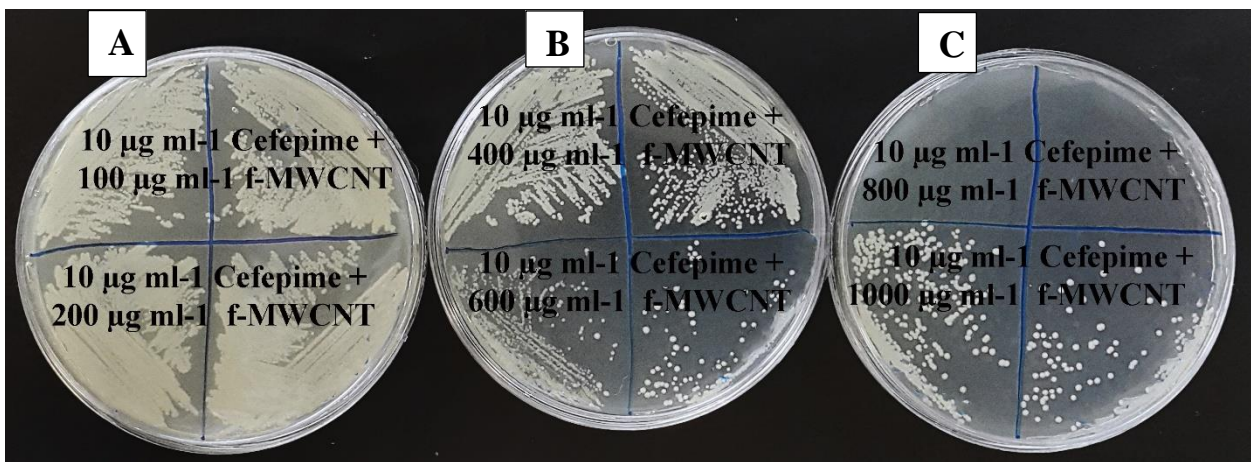
دوز آنتی بیوتیک ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	دوز f -MWCNTs ($\mu\text{g ml}^{-1}$)					
	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۶۰۰	۸۰۰	۱۰۰۰
۵						

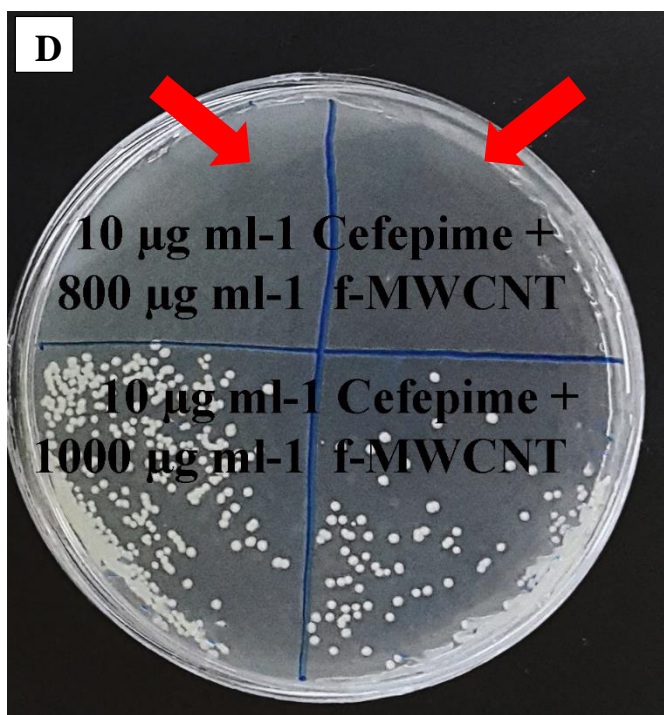
۵						
۱۰						
۱۰						

رشد زیاد ■ کاهش رشد ■ کاهش شدید رشد ■ عدم رشد

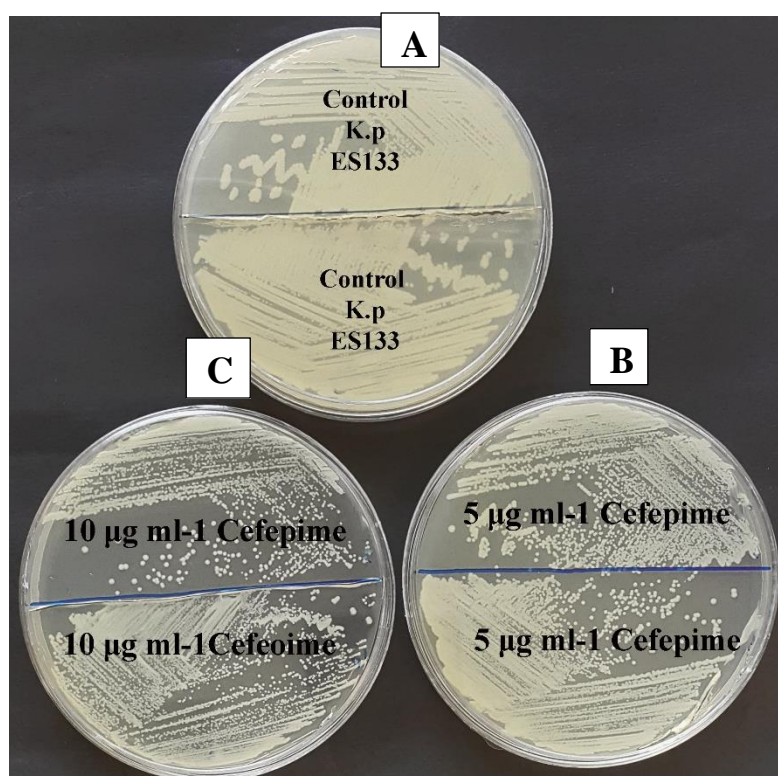


شکل ۷- نتایج دو بار تکرار MBC پس از اثر دهی $5 \mu\text{gml}^{-1}$ آنتی بیوتیک سفپیم به همراه نانوسیال حاوی نانولوله کربنی چند جداره عامل دار (100, 200, 400, 600, 800, 1000 μgml^{-1}) بر کلیسیلا پنومونیه. (A) در تکرارهای $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ سفپیم به همراه 100 و $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ نانولوله کربنی چند جداره عامل دار تغییری در رشد باکتری در مقایسه با کنترل (شکل B-9) مشاهده نشد (B,C) باکتری با اثر دهی تمام دوزهای نانوسیال حاوی نانولوله کربنی چند جداره عامل دار، رشد کرد. ولی در تکرارهای $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ آنتی بیوتیک سفپیم به همراه $400, 600, 800, 1000 \mu\text{gml}^{-1}$ f-MWCNT رشد باکتری کاهش نشان داد.



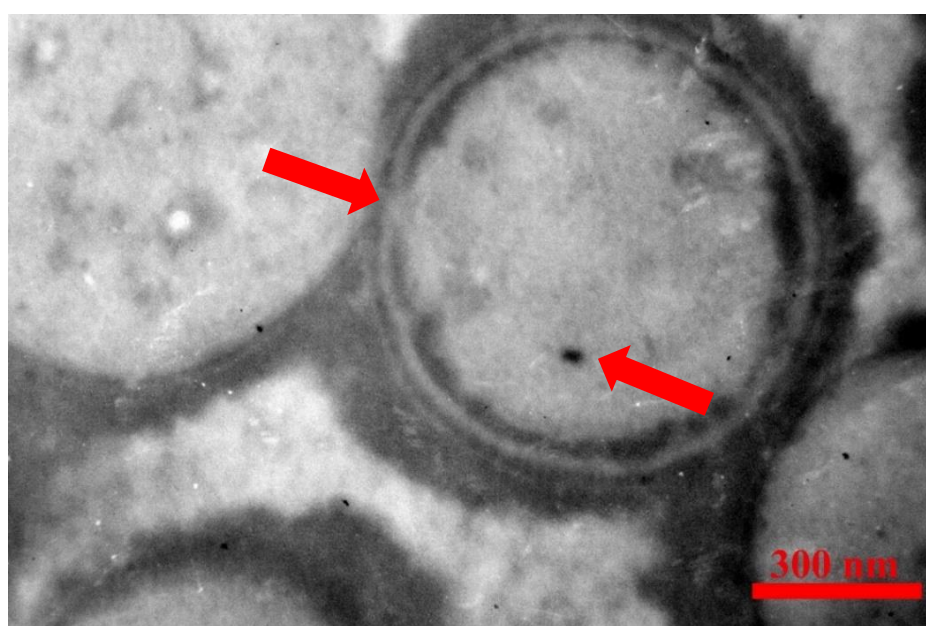


شکل ۸- نتایج دوبار تکرار MBC با اثر دهی $10 \mu\text{g}$ آنتی بیوتیک سفپیم به همراه دوزهای $100, 200, 400, 600, 800, 1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ نانولوله کربنی چند جداره عامل دار بر کلبسیلا پنومونیه. (A) در تکرارهای $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ سفپیم به همراه $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ و $2000 \mu\text{g ml}^{-1}$ f-MWCNT تغییر در رشد باکتری در مقایسه با کنترل (شکل C - ۹) مشاهده نشد (B) در تکرارهای $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ سفپیم به همراه $600 \mu\text{g ml}^{-1}$ و $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ نانولوله کربنی چند لایه عامل دار، کاهش رشد باکتری مشاهده شد (C) فقط دوز $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ سفپیم به همراه $800 \mu\text{g ml}^{-1}$ نانولوله کربنی چند لایه عامل دار موجب مهار کامل رشد باکتری شد (D) برای وضوح بیشتر، تصویر (C) با بزرگنمایی بیشتر نمایش داده شده است.



شکل ۹- نتایج MBC حاصل از اثر دهی $5, 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ سفپیم بر کلبسیلا پنومونیه. (A) کنترل: باکتری بدون اثر دهی آنتی بیوتیک (B) اثر دهی $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ سفپیم بر سویه مقاوم *ES133* کلبسیلا پنومونیه در مقایسه با کنترل، موجب کاهش رشد باکتری شد (C) اثر دهی $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ سفپیم، اثر مهار کنندگی بیشتری بر رشد باکتری نشان داد.

۶-۳- مشاهدات میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)



شکل ۱۰- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM). میکروگراف کلبسیلا پنومونیه سویه پاتوژن *ES133* تیمار شده با $10 \mu\text{g}$ سفپیم به همراه $800 \mu\text{g ml}^{-1}$ نانو لوله حاوی نانو لوله کربنی عامل دار. در برش عرضی کلبسیلا پنومونیه، ذرات سیاه

رنگ، نانولوله کربنی هستند که وارد باکتری شده اند. محل تخریب دیواره و ورود MWCNT عامل دار به باکتری و همچنین لایه ضخیم ناشی از تجمع MWCNT عامل دار بر روی دیواره کلبسیلا، مشاهده می شود.

۴- بحث و نتیجه گیری

در دهه اخیر، برای مقابله با معضل رو به رشد مقاومت آنتی بیوتیکی، مطالعات متعددی بر روی نانو مواد مختلف انجام شده است و آثار سینرژیک آنها با آنتی بیوتیک، در مقابله با پاتوژنهای MDR، به اثبات رسیده است. خصوصیات بیولوژیکی نانوذرات با ماهیت و ساختار آنها همبستگی قابل توجهی دارد. ایجاد تغییراتی در آنها مانند اصلاح سطح و کنترل اندازه و شکل، سمیت آنها را کاهش می دهد و سازگاری زیستی آنها را بهبود می بخشد. برای دستیابی به یک نانو سیال پایدار، چندین روش به کار گرفته شده است که شامل سنتز نانومواد، هم زدن فیزیکی، همگن سازی با مافوق صوت، مهندسی سطح و استفاده از سورفکتانت و سایر مواد افزودنی شیمیایی است. [23,33,40,46]. اگرچه اولین مطالعه کنگ ۳۳ و همکاران (2007) بر روی خواص آنتی باکتریال SWCNTs نشان داد که SWCNTs بدون عامل می توانند آسیب غشایی شدیدی بر روی *E. coli* ایجاد کنند و موجب مرگ آنها شوند [45]، مطالعات متعدد، حاکی از آن است که SWCNT هایی که سطحشان با گروه های کربوکسیل (-COOH) و هیدروکسیل (-OH)، عامل دار شده بود، در مقایسه با SWCNT های بدون عامل، فعالیت آنتی باکتریال بهتری بر روی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت نشان دادند [16]. نتایج یک مطالعه نشان می دهد که SWCNT هایی که برای بهبود پراکندگی در محلول های سورفکتانت مانند سدیم دو سیل سولفات ۳۴ (SDS) پراکنده شده بودند، اثر سمی جزئی بر روی سلول های آستروسیت انسانی 1321N1 نشان دادند و بنابراین می توانند برای کاربردهای پزشکی-زیستی، به ویژه برای بالا بردن حساسیت دارویی میکروارگانیسم های مقاوم به دارو استفاده شوند [32].

طبق مطالعات قبلی، MWCNTs بدون عامل، بلافاصله پس از پایان فراصوت ۳۰ جمع پیدا می کند، در حالی که محلول آبی MWCNT (نانوسیال حاوی نانولوله کربنی دارای عامل COOH-) مدت زمان بیشتری پایدار و پراکنده باقی می ماند [24]. در مطالعه حاضر، از MWCNT دارای عامل COOH- استفاده شد که سمیت کمتری نسبت به SWCNTs دارند و به منظور افزایش پایداری و پراکندگی در محلول آبی حاوی اتانول و صمغ عربی، به صورت سوسپانسیون همگن درآمد و به این ترتیب، پراکندگی MWCNT در نانو سیال، تا مدت ۶ ماه حفظ شد. SWCNT هایی که با گروه های کربوکسیل (-COOH) و هیدروکسیل (-OH) عامل دار شده بود، در مقایسه با SWCNT بدون عامل، فعالیت آنتی باکتریال بهتری بر روی باکتری های گرم منفی و گرم مثبت نشان دادند. بنابراین افزودن عامل به سطح CNTs، علاوه بر افزایش پایداری و کاهش سمیت، موجب افزایش فعالیت آنتی باکتریال نیز می شود [31]. طبق تحقیقی که توسط همین تیم، بر روی اثر MWCNT عامل دار بر دارورسانی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*M.tb*) انجام شد، ایزونیازید کانژوگه با MWCNT عامل دار در مقایسه با زمانی که ایزونیازید به تنهایی استفاده شد، موجب افزایش دارورسانی در دوزهای پایین تر ایزونیازید شد که با یافته های مطالعه حاضر، مطابقت دارد [16]. گروهی از محققان در تگزاس دریافتند دارو رسانی متی سیلین کونژوگه با SWCNT در سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۳۶ مقاوم به متی سیلین، در مقایسه با درمان آنتی بیوتیک به تنهایی، ۴۰ برابر کارایی درمان را ارتقا بخشید [50]. واپیج ۳۷ و همکاران (2018) فعالیت ضد میکروبی AgNPs به تنهایی و در ترکیب با آنتی بیوتیک بر روی کلبسیلا پنومونیه را

33 Kang

34 Sodium dodecyl sulfate

35 Sonication

36 Staphylococcus epidermidis

37 Wypij

مورد ارزیابی قرار دادند. MIC آنتی‌بیوتیک در ترکیب با $256 \mu\text{g ml}^{-1}$ AgNP گزارش شد. اگرچه یافته‌های مطالعه آنها، حاکی از این بود که ترکیب AgNPs و آنتی‌بیوتیک، منجر به کاهش MIC می‌شود اما MIC ترکیب مورد مطالعه، چند برابر بیشتر از MIC حاصل از تحقیق حاضر می‌باشد. طبق نتایج تحقیق نکوی^{۳۸} و همکاران (2013) اثردهی همزمان AgNPs و آمپی‌سیلین در برابر گونه‌های انتروباکتر^{۳۹}، سودوموناس آئروجینوزا^{۴۰}، کلبسیلا پنومونیه و اشریشیاکلی^{۴۱} مقاوم به آمپی‌سیلین، فعالیت آمپی‌سیلین را در غلظت $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ افزایش می‌دهد^[۵۱]. بنابراین با در نظر گرفتن یافته‌های مطالعات دیگر، *f-MWCNT* به همراه سفپیم، در دوز پایین تر آنتی‌بیوتیک قادر به مهار کامل کلبسیلا پنومونیه شد^[۴۷]! علاوه بر این، بنابر برخی مطالعات، مقاومت باکتریایی در برابر NP های نقره گزارش شده است، اما گزارشی مبنی بر مقاومت در برابر نانولوله های کربنی مشاهده نشد^[۳۴]. $10 \mu\text{gml}^{-1}$ سفپیم به همراه کمترین غلظت آنتی‌بیوتیک بود که باعث از بین بردن سویه پاتوژن ۱۳۳ کلبسیلا پنومونیه شد، در حالی که این سویه، نسبت به غلظت $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ سفپیم بدون *f-MWCNT* مقاومت نشان داده بود و تست حساسیت دارویی (آنتی‌بیوگرام) نیز مقاومت به سفپیم را تأیید کرده بود. نتایج یافته‌های مطالعه قبلی ما نیز همسو با تحقیق حاضر نشان داد که نانوسیال حاوی *f-MWCNT* منجر به کاهش دوز مؤثر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، در صورت استفاده ترکیبی می‌شود^[۵۲]. همچنین *f-MWCNT* کونژوگه با ایزونیاژید، از طریق تخریب دیواره سخت *M.tb*، موجب دارو رسانی بهینه شد^[۱۶]. بنابراین، به منظور بهینه کردن دارو رسانی و غلبه بیشتر بر مقاومت کلبسیلا پنومونیه، کونژوگه کردن سفپیم، با نانولوله های کربنی چند لایه عامل دار شده با عامل اسیدی، پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان، از بخش سل و تحقیقات ریوی انسیتو پاستور ایران، برای در اختیار گذاشتن تجهیزات، کمال تشکر و قدردانی را قـــدردانـــی را دارنـــد.
تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

- Jiang, A.M, Liu N, Said, R.A, Ren, M.D, Gao, H, Zheng, X.Q, Fu, X, Liang, X, Ruan, Z.P, Yao, Y, and Tian T. (2020) Nosocomial Infections in Gastrointestinal Cancer Patients: Bacterial Profile, Antibiotic Resistance Pattern, and Prognostic Factors. *Cancer Management and Research*. 12, 4969–4979.
- Jean, Sh-Sh, Chang, Y-Ch, Lin, W-Ch, Lee, W-S, Hsueh, P-R, and Hsu Ch-W. (2020) Epidemiology, Treatment, and Prevention of Nosocomial Bacterial Pneumoniae. *J. Clin. Med*. 9, 275.
- Fischer Walker, Ch. L, Rudan, I, Liu, L, Nair, H, Theodoratou, E, Bhutta, Z.A, O'Brien, K. L, Campbell, H, and, Black, R.E. (2013) Global burden of childhood pneumonia and diarrhea. *Lancet*, 381, 1405–16.
- Yeh, Y-Ch, Huang, T-H, Yang, Sh-Ch, Chen, Ch-Ch and, Fang, J-Y. (2020) Nano-Based Drug Delivery or Targeting to Eradicate Bacteria for Infection Mitigation: A Review of Recent Advances. *Frontiers in Chemistry*. 8, 286.
- Kramer, A, Schwebke, I, and, Kampf, G. (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surface? A systemic Review. *BMC Infectious Diseases*. 6, 130.
- Zhou, Q, Fan, L, Lai, X, Tan, L, and Zhang, X. (2019) Estimating extra length of stay and risk factors of mortality attributable to healthcare-associated infection at a Chinese university hospital: a multi-state model. *BMC Infectious Diseases*. 19, 975.
- Jain, K, Radsak, K, and, Mannheim, W. (1974) Differentiation of the Oxytocum Group from Klebsiella by Deoxyribonucleic Acid-Deoxyribonucleic Acid Hybridization. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*. 24, 402-407.
- Marcoleta, A.E, Varas, M. A, Ortiz-Severín, J, Vásquez, L, Berríos-Pastén, C, Sabag, A.V, P. Chávez, F, L. Allende, M, Santiviago, C.A, Monasterio, O, and, Lagos, R. (2018) Evaluating Different Virulence Traits of

38 Naqvi
39 Enterobacter
40 P. aeruginosa
41 E. coli

Klebsiella pneumoniae Using *Dictyostelium discoideum* and Zebrafish Larvae as Host Models. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 30.

9. Murray, P.R, Holmes, B, Aucken. H.M. (2005) citrobacter, klebsiella, Enterobacter, serratia, and other Enterobacteriaceae, in: Boriello. *Int J Pharm Pharm Sci*, 7, 1, 252-254.

10. Holden, V.I, Wright, M. S, Houle, S ,Collingwood, A, Dozois, Ch.M, Adams, M. D, and, Bachmand, M. A. (2018) Iron Acquisition and Siderophore Release by Carbapenem- Resistant Sequence Type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *American society for Microbiology. mSphere*3:e00125-18.

11. Effah,C. Y, Sun, T, Sh Liu, and Wu,Y. (2020) *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 19,1.

12. Doorduijn, D.J, Rooijakkers, S.H.M, Schaik, W.v, Bardoel, B.W. Complement resistance

13. Catalán-Nájera, J.C, Garza-Ramos, U,and, Barrios- Camacho, H. (2017) Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. *Phenotypes Virulence*.8:7, 1111-1123.

14. Gerlach, G-F, Clegg, S, and, Allen, B.L. Identification and Characterization of the Genes Encoding the Type 3 and Type 1 Fimbrial Adhesins of *Klebsiella pneumoniae* *Journal of Bacteriology*, 1989, 171,3, 1262-1270.

15. Aldred K, Kerns R. J, and, Osheroff, N. (2014) Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*, 53, 1565–1574.

16. Zomorodbakhsh, Sh, Abbasian, Y, Naghinejad, M, Sheikhpour, M. (2020) The Effects Study of Isoniazid Conjugated Multi-Wall Carbon Nanotubes Nanofluid on Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Nanomedicine.* 15, 5901–5909.

17. Pitout, J.D.D, Nordmann, P, and, Poirel, L. (2015) Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ,a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 5873–5884.

18. Zhang, L. (2010) Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Current Medical Chemistry.*

19. González-Lavado1,E,Valdivia, L, García-Castaño, A, González, F, Pesquera, C, Valiente, R, and, Fanarraga, M. L. (2019) Multi-walled carbon nanotubes complement the anti-tumoral effect of 5-Fluorouracil. *Oncotarget*, 10, 21, 2022-2029.

20. García-Hevia, L,Villegas, J. C, Fernández, F, Casafont, I, González, J, Valiente, R, and, Fanarraga, M. L. (2016) Multiwalled Carbon Nanotubes Inhibit Tumor Progression in a Mouse Model. *Advanced Healthcare Materials.* 5, 1080–1087.

21. Jawed, A, Saxenab, V, and, Pandeya, L.M. (2020) Engineered nanomaterials and their surface functionalization for the removal of heavy metals: A review. *Journal of Water Process Engineering* 33, 101009.

22. Vasilios, G, Kordatos, K, Prato, M, Guldi,D. M, Holzinger, M, and, Hirsch, A. (2002) Organic Functionalization of Carbon Nanotubes. *American Chemical Society.* 124, 5, 760-61.

23. Sheikhpour, M, Arabi, M, Kasaeian, A, Rokn Rabei, A, and, Taherian, Z. (2020) Role of Nanofluids in Drug Delivery and Biomedical Technology: Methods and Applications. *Nanotechnology, Science and Applications.* 13, 47–59.

24. Le, V. T, Ngo, C. L, Le, Q. T, Ngo, T. T, Nguyen, D. N, and, Vu, M.T. (2013) Surface modification and functionalization of carbon nanotube with some organic compounds. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.* 4, 035017.

25. Ahmed, D. S, A. J. Haider, and, Mohammad, M. R. (2013) Comparison of Functionalization of multi walled carbon nanotubes treated by oil olive and nitric acid and their characterization. *Energy Procedia.* 36, 1111–1118.

26. Hoa, L. T. M. (2018) Characterization of multi-walled carbon nanotubes functionalized by a mixture of HNO₃/ H₂SO₄. *Diamond & Related Materials.* doi:10.1016/ j.diamond.2018.08.008.

27. Kizildag, N, and, Ucar, N. (2016) Investigation of the properties of PAN/f-MWCNTs/AgNPs composite nanofibers. *Journal of Industrial Textiles* 0(00).

28. Seo, Y, Hwang, J, Kim, J, Jeong, Y, Hwang, M. P, and, Choi, J.(2014) Antibacterial activity and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes decorated with silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine.* 9, 4621–4629.

29. Sheikhpour, M, Barani, L, and, Kasaeian, A. (2017) Biomimetics in drug delivery systems: A critical review. *Journal of Controlled Release.* 76, ۱۲۸–۱۳۰۴

30. Bhattacharyya, A, Seth, G.S, Kumar, R, And, Chamkha, A. J. (2019) Simulation of Cattaneo–Christov heat flux on the flow of single and multi-walled carbon nanotubes between two stretchable coaxial rotating disks. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08644-4>.

31. M100, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition, 2020; 69-76.

32. Maleki Dizaj, S, Mennati, A, Jafari, S, Khezri, Kh, and, Adibkia, Kh. (2015) Antimicrobial Activity of Carbon-Based Nanoparticles. *Adv Pharm Bull.* 5(1), 19-23.
33. Saleemi, M A, Hosseini Fouladi, M, Chen Yong, PV, and Wong, EH. (2020) Elucidation of Antimicrobial Activity of Non-Covalently Dispersed Carbon Nanotubes. *Materials.* 13, 1676.
34. Baptista, PV, McCusker, MP, Carvalho, A, Ferreira, DA, Mohan, NM, Martins, M, and Fernandes AR . (2018) Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria—"A Battle of the Titans". *Front Microbiol.* 9,1441.
35. Yañez-Macías, R, Muñoz-Bonilla, A, De Jesús-Tellez, M.A, Maldonado-Textle, H, Guerrero-Sánchez, C, Schubert, U. S, and, Guerrero-Santos, R. (2019) Combinations of Antimicrobial Polymers with Nanomaterials and Bioactives to Improve Biocidal Therapies. *Polymers.* 11, 1789.
36. Shakoor, S, K.M. Zaidi, A. (2020) *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (Tenth Edition). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978032355512800020X>.
37. Zahraei , S.M, Eshrati, B, Masoumi Asl, H,and, Pezeshki, Z. (2012) Epidemiology of Four Main Nosocomial Infections in Iran. *Archives of Iranian Medicine.*15, 764-766.
38. Structures, Processes and Achievements. *Iranian Journal of Epidemiology.*15 (1), 105-115.
39. Taufiq Musa, M, Shaari, N, and, Kamarudin, S.K. (2020) Carbon nanotube, graphene oxide and montmorillonite as conductive fillers in polymer electrolyte membrane for fuel cell: an overview. *Int J Energy Res.*1–38.
40. Mitchell, M.J, M, Billingsley, M, Haley, R. M, Wechsler, M. E., Peppas, N. A, and Langer, R. (2021) Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Drug Discovery.* 20,103: 101-124.
41. Patra, J. K, Das, G, Fraceto, L. F, Ramos Campos, E. V, Rodriguez- Torres, M. P, Acosta- Torres, L. S, Diaz- Torres, L. A, Grillo, R, Swamy, M. K, Sharma, Sh, Habtemariam, S, and, Shin, H. S. (2018) Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology.* 16:71.
42. Song, W, Moland, E. S, Hanson, N.D, Lewis, J. S, Jorgensen, J. H, and Thomson, K. S. (2005) Failure of Cefepime Therapy in Treatment of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,* 43, 9, 4891–4894.
43. Francis, A. P, and Devasena,T. (2017) Toxicity of carbon nanotubes: A review. *Toxicology and Industrial Health.* <https://doi.org/10.1177/0748233717747472>.
44. Kavosi, A, Hosseini Ghale Noei, S, Madani, S, Khalighfard, S, Khodayari, S, Khodayari, H, Mirzaei, M, Kalhori, M.R, Yavarian, M, Mohammad Alizadeh, A, and, Falahati, M. (2018) The toxicity and therapeutic effects of single-and multi-wall carbon nanotubes on mice breast cancer. *Scientific Reports.* 8:8375.
45. Mocan, T, Matea, C. T, Pop, T, Mosteanu, B, Buzoianu, A. D, Suci, S, Puia, C, Zdrehus, Iancu, C, Mocan, C. (2017) Carbon nanotubes as anti-bacterial agents. *Cell. Mol. Life Sci.* 74:3467–3479.
46. Saleemi, M A, Hosseini Fouladi, M, Chen Yong, PV, and Wong, EH. (2020) Elucidation of Antimicrobial Activity of Non-Covalently Dispersed Carbon Nanotubes. *Materials.* 13, 1676.
47. Wypij, M, Czarnecka, J, Świecimska, M, Dahm, H, Rai, M, Golinska, P. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of biogenic silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2018, 34:23.
48. Tam, N.T, Phuong, N.V, Khoi, P.H, Minh, P. N, Afrand, M, Trinh, P. V, Thang, B. H, Zyla, G, and Estellé, P. (2020) Carbon Nanomaterial-Based Nanofluids for Direct Thermal Solar Absorption. *Nanomaterials.* 10, 1199.
49. Sadri, R, Ahmadi, G, Togun, H, Dahari, M, Newaz Kazi, S, Sadeghinezhad, E, Zubir, N. (2014) An experimental study on thermal conductivity and viscosity of nanofluids containing carbon nanotubes. *Nanoscale Research Letters.* 9:151.
50. Khazi-Syed, A, Hasan, Md. T, Campbell, E, Gonzalez-Rodriguez, R, and Naumov, A. V. (2019) Single-Walled Carbon Nanotube-Assisted Antibiotic Delivery and Imaging in *S. epidermidis* Strains Addressing Antibiotic Resistance. *Nanomaterials.* 9, 1685.
51. Kon, K, and, Rai, M. *Antibiotic Resistance Mechanisms and New Antimicrobial Approaches.* (2016) Chapter 6 (Antibiotic Resistance). Elsevier, 130-134.
52. Mehdizadeh M, Sheikhpour M, Salahshourifar I, Siadat S.D, Saffarian P. An in vitro study of molecular effects of a combination treatment with antibiotics and nanofluid containing carbon nanotubes on *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Public Health.* 2021;50 (1), 2292-2301. <http://dx.doi.org/10.18502/ijph.v50i11.758>

Investigating the Effect of Functionalized Carbon Nanotube Nanofluid on *klebsiella pneumoniae*

Maryam Mehdizadeh ^a, Mojgan Sheikhpour ^{b,c*}, Iman Salahshourifar ^a, Seyed Davar Siadat ^{b,c}, Parvaneh Saffarian^a

^aDepartment of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

^bDepartment of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

^cMicrobiology Research Center (MRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Corresponding Author:

m_sheikhpour@pasteur.ac.ir, Tel: +98-9122969712, +98 21 64112285, Fax: +98 21 64112313

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative bacillus of the *Enterobacteriaceae* family. Despite being part of the natural human microflora, this is an opportunistic pathogen and a major cause of nosocomial infections. The increased emergence of multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* has limited the treatment options for this bacterium. Carbon nanotubes, by improving the stability and solubility of drugs, could increase the effectiveness of drugs for treatment. The aim of this study is to investigate the antibacterial effect of nanofluid containing functionalized multi wall carbon nanotubes on *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical specimens. For the strain confirmation, biochemical tests by API20E kit, and additional differential tests were performed and antibiotic susceptibility test was performed by the disk diffusion method. The studied strain showed resistance to all antibiotics such as cefepime. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the antibiotic micro dilution method in five effect modes including antibiotic, nanofluid containing functionalized multi-walled carbon nanotubes (*f*-MWCNTs), multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), cefepime in combination with *f*-MWCNTs and cefepime in combination with MWCNTs. Nevertheless, the effects of 10 µg ml⁻¹ cefepime or 800 µg ml⁻¹ of *f*-MWCNTs did not inhibit the growth of the bacteria individually, but the co-administration of 10 µg ml⁻¹ cefepime with 800 µg ml⁻¹ of *f*-MWCNTs in the nanofluid could inhibit the bacteria's growth.

Keywords: Cefepime; functionalized multi-walled carbon nanotube; *Klebsiella pneumoniae*; nanofluid; drug delivery; minimum inhibitory concentration; MWCNT.