زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره ۱۲، شماره ۲، بهار ۱۴۰۰

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوسیال حاوی نانو لوله های کربنی عامل‌دار بر *کلبسیلا پنومونیه*

مریم مهدی زاده[۱]، مژگان شیخ پور*[۲و۳]، ایمان سلحشوری فر[۱]، سید داور سیادت[۲و۳]، 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 دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۲۹

چکیده:

کلبسیلا پنومونیه، باسیل گرم منفی از اعضای خانواده *انتروباکتریاسه* می باشد و علی‌رغم اینکه جزئی از میکروفلور طبیعی بدن می با شد، یک پاتوژن فر صت طلب و از عوامل ا صلی عفونت‌های بیمار ستانی اســت. افزایش ظهور مقاومت به چند دارو در *کلبســیلا پنومونیه* گزینه‌های درمانی را برای این باکتری محدود کرده اســت. نانولوله‌های کربنی می‌توانند با بهبود پایداری و حلالیت دارو، اثربخشــی داروها را افزایش دهند. هدف این تحقیق، تهیه و ارزیابی اثر آنتی باکتریال نانوســیال حاوی نانو لوله‌های کربنی عامل‌دار بر *کلبســیلا پنومونیه* جدا شــده از نمونه های بالینی می‌باشــد. برای تأیید ســویه تســت‌های بیو شیمیایی IMViC ، کیت API20E و ت ست های افتراقی تکمیلی انجام شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش انت شار دی سک تعیین شد. سویه مورد مطالعه، ن سبت به تمامی آنتی بیوتیک‌های مورد برر سی از جمله ســفپیم، مقاومت نشــان داد. کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) با اســتفاده از روش میکرو رقت آنتی‌بیوتیک تعیین شد. MIC در ۵ حالت اثردهی شامل آنتی‌بیوتیک، نانوسیال حاوی نانو لوله‌های کربنی چند جداره عامل‌دار، نانو سیال حاوی نانو لوله‌های کربنی چند جداره بدون عامل، آنتی‌بیوتیک به همراه نانوسیال حاوی نانو لوله‌های کربنی چند جداره بدون عامل و آنتی‌بیوتیک به همراه نانوسیال حاوی نانو لوله‌های کربنی چند جداره عامل‌دار، تعیین شــد. علی‌رغم اینکه اثر دهی $\mu g\ ml^{-1}$۱۰ســفپیم و $\mu g\ ml^{-1}$ ۸۰۰ نانو لوله‌های کربنی چند جداره عامل‌دار در پلیت های جداگانه، قادر به مهار ر شد باکتری ن شد اما اثردهی همزمان $\mu g\ ml^{-1}$ ۱۰ ســفپیم به همراه $\mu g\ ml^{-1}$ ۸۰۰ نانو لوله‌های کربنی چند جداره عامل‌دار، رشد باکتری را به‌طور کامل مهار کرد.

کلیدواژگان: سفپیم، نانولوله های کربنی چند جداره عاملدار، *کلبسیلا پنومونیه*، نانو سیال، دارور سانی، کمترین دوز مهارکنندگی

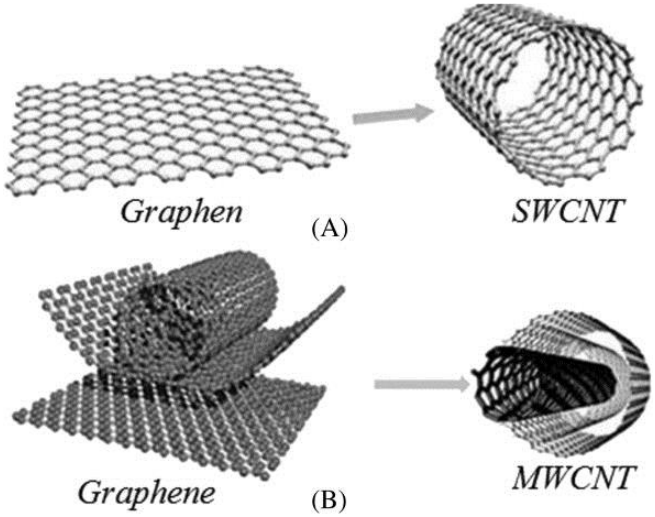
۱- مقدمه

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 می دهد و از این تعداد، ۱۰۰۰۰۰ نفر جان خود را ازدست می‌دهند[۶،۳۶،۴۵]. براساس آخرین گزارش مرکز مدیریت بیماری ها در ایران، میزان بروز عفونت‌های بیمارستانی، ۱/۲۳درصد بوده است که این رقم، بسیار پایین‌تر از میزان بروز مورد انتظار (۸٪) است و اطلاع از کم شماری موارد می‌دهد[۳۸]. این براورد کم احتمالاً به دلیل ضعف سیستم نظارت در پیگیری بیماران پس از ترخیص می باشد[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 عفونت ها شامل سپتی سمی، پنومونی، عفونت‌های زخم جراحی، عفونت مجاری ادراری (UTI) و آبسه‌های کبدی پایوژنیک هستند[۱-۷-۱۱]. *کلبسیلا پنومونیه* تعدادی فاکتور ویرولانس تولید می‌کند که مرتبط با بیماری‌زایی می باشند. این فاکتورها، شامل آنتی ژن‌های O و آنتی ژن‌های کپسولی، لیپوپلی ساکارید، ادهزین های فیمبریه و سیدروفورهای شلاته کننده آهن می‌باشند[۱،۱۲]. ادهزین‌های فیمبریه که باعث چسبندگی به سطح سلول‌های اپی تلیال میزبان می شوند با مشارکت کپسول، باعث تشکیل بیوفیلم باکتری می شود[۴،۱۳،۱۴]. سویه های مقاوم به انواع آنتی بیوتیک‌ها، یکی از مشکلات اصلی در درمان پنومونی ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* است[۱،۱۵،۱۶]. گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO[1]) حاکی از آن است که مقاومت به درمان عفونت های تهدید کننده حیات که توسط باکتری روده‌ای *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 درمان با این آنتی بیوتیک شده است، نیاز به روش‌های نوین دارو رسانی را تقویت می کند[۴۲]. کاربرد نانوتکنولوژی در درمان، به طور گسترده در بسیاری از جنبه‌های پزشکی مخصوصا 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 باکتری های درون سلولی را ریشه کن کنند[۴،۲۹،۴۰]. با همراه کردن دارو ها با نانوذرات، ایندکس درمانی دارو ها به طور چشمگیری در مقایسه با داروهای آزاد، بهبود پیدا کرد. مواد زیستی با ساختار نانو به ویژه نانوذرات، به دلیل ویژگی های فیزیکو 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 درمان های آنتی بیوتیکی قدیمی، غلبه کنند[۱۸،۲۹،۴۰،۴۱]. سه مدل نانولوله کربنی[2] (CNT) سنتز شده‌اند: نانولوله های کربنی تک لایه[3] (SWCNTs)، نانولوله های کربنی دو لایه[4](DWCNTs) و نانولوله‌های کربنی چند لایه[5](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 سوسپانسیون پایدار از مواد افزودنی، مانند نانومواد در یک سیال پایه که به عنوان

1. World Health Organization
2. Carbon Nanotube
3. Single Wall Carbon Nanotubes
4. Double Wall Carbon Nanotubes
5. Multi Wall Carbon Nanotubes

نانوسیال ٦(NF) شناخته می شود، اولین بار توسط چوی٧ در سال ۱۹۹۵ پیشنهاد شد [٤٨].



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 می‌شود [۳۹].

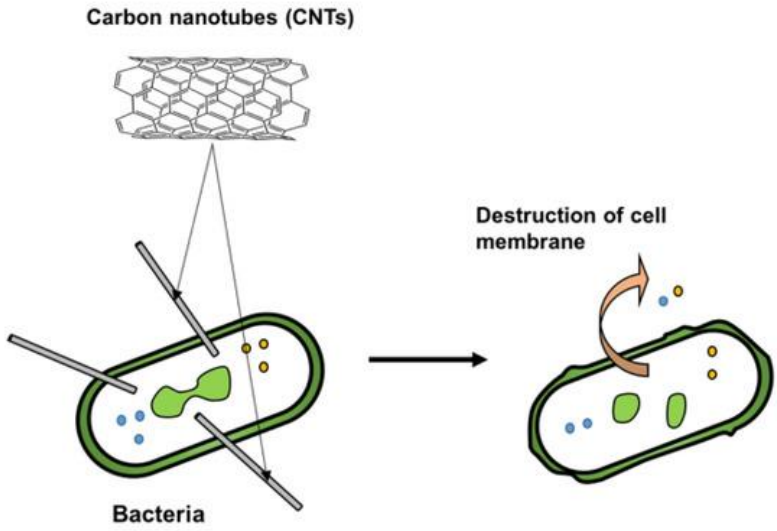
نانوسیالات، امولسیون یا سوسپانسیون نانوساختارها در مایع هستند که به نانوساختارها امکان پراکندگی پایدار و همگن می‌دهند. دستیابی به یک نانو سیال پایدار، طی چندین مرحله حاصل می‌شود که شامل سنتز نانومواد، هم زدن فیزیکی، همگن‌سازی بوسیله فرا صوت، مهند سی سطح و ا ستفاده از سورفکتانت و سایر مواد افزودنی شیمیایی است [١٦،٢٣،٢٤،٤٨]. مطالعه عملکرد آنتی باکتریال نانو ذرات نشان داد با اثردهی همزمان سفپیم و نانوذرات ٨(NPs) بر *کلبسیلا پنومونیه*، کمترین دوز کشندگی ٩(MBC) سفپیم کاهش پیدا می کند [٤].

از آنجا که MWCNTs در مقایسه با SWCNTs از سمیت کمتری برخوردار ا ست، بنابراین در مطالعه حا ضر از MWCNTs استفاده شد[٤٤]. MWCNTs آثار آنتی‌باکتریال خوبی بر سویه‌های باکتری مقاوم به چند دارو نشان می‌دهند و با توجه به عامل‌دار بودن، با راندمان بالاتری به دیواره باکتری نفوذ کرده و آثار تخریبی خود را اعمال می‌کنند. عامل‌دار کردن نانو لوله های کربنی، باعث بهبود فعالیت آنتی باکتریال و میانکنش با دیواره باکتری‌ها و تخریب آن می شود (شکل ۲).

بنابراین به منظور بهبود کارایی و کاهش سمیت، نانو لوله‌های کربنی، با عامل ا سیدی، عامل‌دار شدند. هدف از این تحقیق، تهیه نانوسیال حاوی نانو لوله‌های کربنی چند لایه عامل‌دار١٠(*f*-MWCNTs) و بررسی اثر آن بر *کلبسیلا پنومونیه* در شرایط invitro می‌باشد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری قبل و بعد از اثردهی *f*-MWCNTs در ترکیب با آنتی بیوتیک سفپیم با استفاده از تست‌های MBC و MIC١١ مقایسه شد. تاکنون دارورسانی با استفاده از نانوسیال حاوی نانولوله کربنی برای این باکتری به روش در حال مطالعه، انجام نشده ا ست و این پژوهش می‌تواند

6. Nanofluid
7. Choi
8. Nano Particles
9. Minimum Bactericidal Concentration
10. Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes
11. Minimum Inhibitory Concentration

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].

۲- مواد و روش ها

۲-۱تهیه نانو لوله های عامل‌دار (*f*-MWCNT)

نانو لوله‌های عامل‌دار 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 عامل‌دار

مشاهدات میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM اصلاح سطح و مورفولوژی MWCNT ها را پس از عامل‌دار شدن تأیید کرد (شکل A,B -۳). تجزیه و تحلیل MWCNTs عامل‌دار با آنالیزگر حرارت سنجی ۱۳(TGA) (شکل ٤)، پراش اشعه ایکس ۱٤(XRD)، (شکل ٥) آنالیز پراکندگی انرژی اشعه ایکس ۱٥(EDX) و میکروسکوپ الکترونی ۱٦SEM و TEM انجام شد. ساختار کریستالوگرافی MWCNT های عملکردی توسط XRD تأیید شد [۲۸ و۲۷، ۲٥]. همچنین از آنالیز EDX برای اندازه گیری افزایش اتم های اکسیژن با افزایش زمان تیمار اسیدی استفاده شد [۲٦]. گواهی آنالیز شرکت US Research در جدول ۲ آمده است.

۲-۳ تهیه نانوسیال۱۷

در این مرحله، ۰/۲ گرم پودر نانو، ٦ میلی لیتر اتانول ۹٦٪ و ۰/۰٦ گرم صمغ عربی۱۸ به ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد و مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه به‌وسیله 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 [۱٦،٤۹].

12. Chemical Vapor Deposition
13. Thermogravimetric Analyzer
14. X-Ray Diffraction
15. Energy Dispersive X-Ray
16. Scanning Electron Microscope
17. Nanofluid
18. Arabic gum

۲-٤ آزمایش های بیوشیمیایی

سویه پاتوژن *کلبسیلا پنومونیه* از بانک میکروبی بخش سل و ریوی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. پس از کشت بر روی محیط افتراقی مک کانکی آگار[19]، براساس نتایج تست‌های بیوشیمیایی موجود در سیستم API20E، تأیید شد. همچنین تست های IMViC[20] شامل تست اندول[21]، متیل رد، ووگس- پروسکائر[22]، هیدرولیز سیترات[23] و تست های افتراقی تکمیلی اوره آز، تخمیر قندها (TSI)[24]، اکسیداز و تحرک[25]، به منظور تائید سویه ها انجام گردید (شکل ٦).

۲-٥ سنجش حساسیت دارویی[26]

تست مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها با روش انتشار دیسک[27] روی محیط کشت مولر آگار، انجام شد. به این منظور، در لوله درپیچ 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 دیسک‌های آنتی بیوتیک با فاصله از هم روی محیط مولر آگار، چیده و به مدت ۱۸-۱٦ ساعت، داخل انکوباتور $37^{\circ}C$ قرار داده شد. درنهایت هاله عدم رشد، اندازه‌گیری و برای تعیین مقاومت یا حساسیت، با راهنمای CLSI[28] 2020، مقایسه شد[۳۱].

۲-٦ تست های میکروبی

MIC ۲-٦-۱

به منظور تعیین MIC آنتی بیوتیک، ابتدا 95 µl مولرهینتون براث[29] (MHB)، داخل چاهک های میکرو پلیت ۹٦ خانه ریخته شد. سپس 1µl، از هر یک از رقت های سریالی آنتی‌بیوتیک و درنهایت 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 $37^{\circ}C$ به مدت ۱۸-۱٦ ساعت، انکوبه گردید. برای تعیین MIC نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی چند لایه عامل‌دار، پس از افزودن 95 µl MHB داخل چاهک‌های میکروپلیت ۹٦ خانه، مقادیر مختلف نانو سیال (5, 10, 20, 30, 40, 50 µL)، به هر چاهک افزوده و درنهایت 5µl، از سوسپانسیون باکتری *کلبسیلا پنومونیه* (مطابق با رقت ۰/۵ مک فارلند) اضافه شد. برای تمام رقت‌ها دوبار تکرار گذاشته شد. برای تعیین MIC نانوسیال حاوی نانولوله های کربنی چند لایه عامل‌دار به همراه آنتی بیوتیک، µl ۹۵ MHB + ۱میکرولیتر از رقت سریالی آنتی‌بیوتیک+ µl ۵۰ و ٤۰ ، ۳۰ ، ۲۰ ، ۱۰ ، ۵ نانوسیال، به ترتیب حاوی ۱۰۰۰µgml^{-1}، ۸۰۰، ٦۰۰، ٤۰۰، ۲۰۰،۱۰۰ نانولوله های کربنی چند لایه عامل‌دار و µl ۵ 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[30] 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 سانتی‌گراد انکوبه شد.

MBC ۲-٦-۲

19. MacConkey Agar
20. Indole
21. Methyl Red
22. Voges-Proskauer
23. Citrate Utilization
24. Three Sugar Iron Agar
25. Mobility
26. Drug Susceptibility
27. Disc Diffusion
28. Clinical and Laboratory Standards Institute
29. Mueller Hinton Broth
30. Load

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 سفپیم، 10 µg/mL تعیین گردید، برای یافتن MBC، رقت پایین تر سفپیم، یعنی 5 µg/mL نیز کشت داده شد. همچنین دوزهای ۵۰ µl و ۴۰ ، ۳۰ ، ۲۰ ، ۱۰ ، ۵ نانوسیال حاوی *f*-MWCNTs و نانوسیال حاوی *f*-MWCNTs در ترکیب با 5 µg/mL و 10 µg/mL سفپیم 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 ۱۸–۱۶ ساعت در دمای 37^{oC} انکوبه گردید و روز بعد، رشد یا عدم رشد کلونی باکتری، مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۷ آماده سازی نمونه برای میکروسکوپ الکترونی گذاره ۳۱(TEM)

۱-۷-۲تهیه برش برای TEM

ابتدا نمونه داخل محلول فیکساتور گلوتار آلدئید به مدت 3-4 ساعت قرار داده شد و ۳ مرتبه به مدت ۲۰ دقیقه با بافر فسفات شستشو داده شد. در اوسمیوم تتروکساید 1% در بافر فسفات ۰,۱ مولار PH 7.2 به عنوان فیکساتور دوم به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس ۳ مرحله شستشو با بافر فسفات هر بار ۱۰ دقیقه انجام شد و آبگیری با اتانول ۲۵ درجه ، ۵۰ درجه، ۷۰ درجه هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در مرحله بعد، آبگیری مجدد با اتانول ۹۶ و ۱۰۰ درجه هر کدام دو بار ۱۵ دقیقه انجام شد. ۲ مرتبه هر بار ۱۰ دقیقه استون افزوده شد. یک تا دو ساعت، داخل رزین و استون که با نسبت ۱ به ۱ 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 تازه به قالب‌ها افزوده و داخل فر 70^{oC} قرار گرفت تا در اثر حرارت، پلیمریزه و قابل برش شد. درنهایت با دستگاه اولترا میکروتوم به ابعاد 60-70 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 استات اورانیوم، روی پارافیلم در کف پتری دیش، ریخته شد. Grid، با پنس روی قطره قرار گرفت و ۲۰ دقیقه شناور ماند. Grid، به مدت ۵ دقیقه، روی یک قطره سیترات سرب، داخل پتری دیش ، شناور شد. پس از شستشو با آب مقطر کاملاً خشک شد و درنهایت با میکروسکوپ الکترونی عبوری مشاهده شد.

۳- نتایج

۱-۳ مشخصات نانولوله های کربنی عامل‌دار

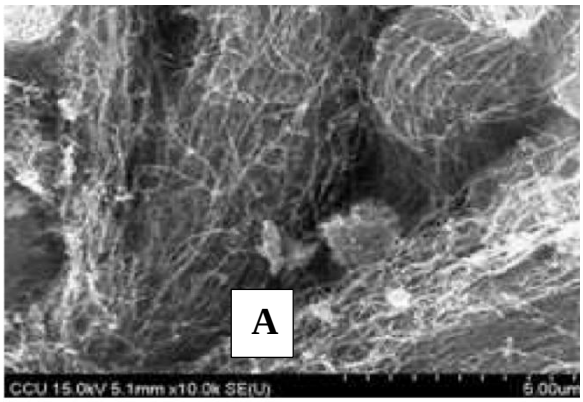
در مطالعه حاضر نانولوله های کربنی عامل‌دار مورد استفاده ، لوله‌هایی چند لایه به طول µm ۵۰–۳۰، قطر داخلی nm ۵–۲ و قطر خارجی nm ۸ > می باشند. مشخصات کامل نانولوله های کربنی عامل‌دار در جدول ۱ آمده است.

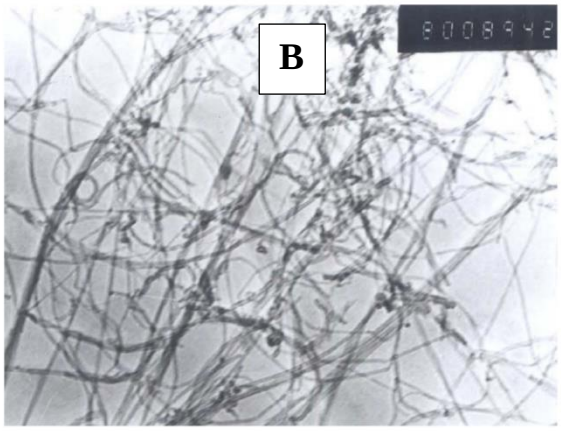
تصویر سطح MWCNTs عامل‌دار با میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد (شکل ۳). برای تأیید میزان پیوند گروه کربوکسیل (–COOH) در سطوح MWCNTs و بررسی پایداری حرارتی نانولوله ها، آنالیز وزن– دما (TGA) بر روی *f*-MWCNT انجام شد. TGA نشان داد که درصد عامل‌دار شدن سطح MWCNTs ، بستگی به از دست دادن وزن دارد. دمای تجزیه در منحنی TGA، ثبات حرارتی گروه‌های عامل را منعکس می کند (شکل ٤).

EDX، ترکیب شیمیایی *f*-MWCNT را نشان داد. ساختار کریستالوگرافی *f*-MWCNT توسط پراش اشعه ایکس تعیین شد (شکل۵). همچنین، اجزاء تشکیل دهنده

31. Transmission Electron Microscopy

f-MWCNT و درصـد محتوای هر یک از عناصـر، تعیین گردید (جدول ۲).



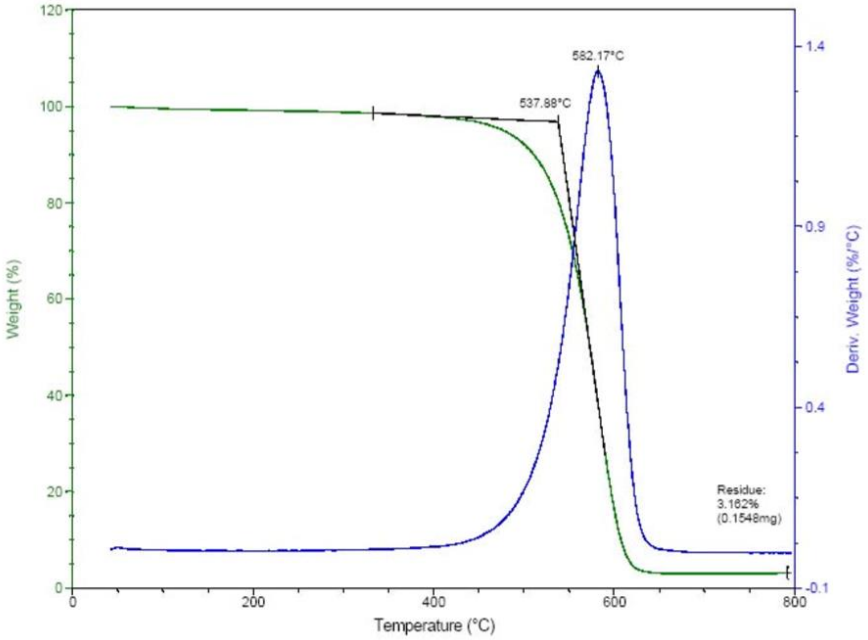


شکل ۳– A) تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM از نانولوله های کربنی چند لایه عامل‌دار (*f*-MWCNT) B) تصویر میکروسکوپ الکترونی TEM از *f*-MWCNT

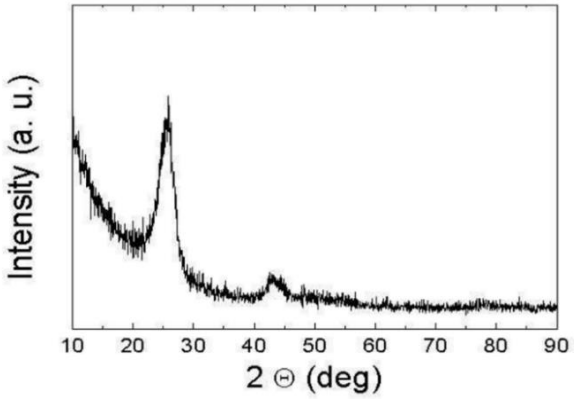
جدول ۱– مشخصات نانولوله های کربنی عامل‌دار (*f*-MWCNT)

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

SSA: Special Surface Area



شکل ٤- آنالیز حرارت سنجی(TGA: Thermogravimetric Analyzer)
نانولوله های کربنی چند لایه عامل‌دار



شکل۵- الگوی پراش اشعه ایکس (XRD: X-Ray Diffraction Pattern) مربوط به *f*-MWCNT

جدول ۲- گواهی آنالیز *f*-MWCNT

مقدار محتوا (%)	اجزاء تشکیل دهنده
۹۷/٤٦	کربن
۱/۰۲	کلر
۰/۱۹	آلومینیوم
۱/۰۹	کبالت
۰/۲٤	گوگرد

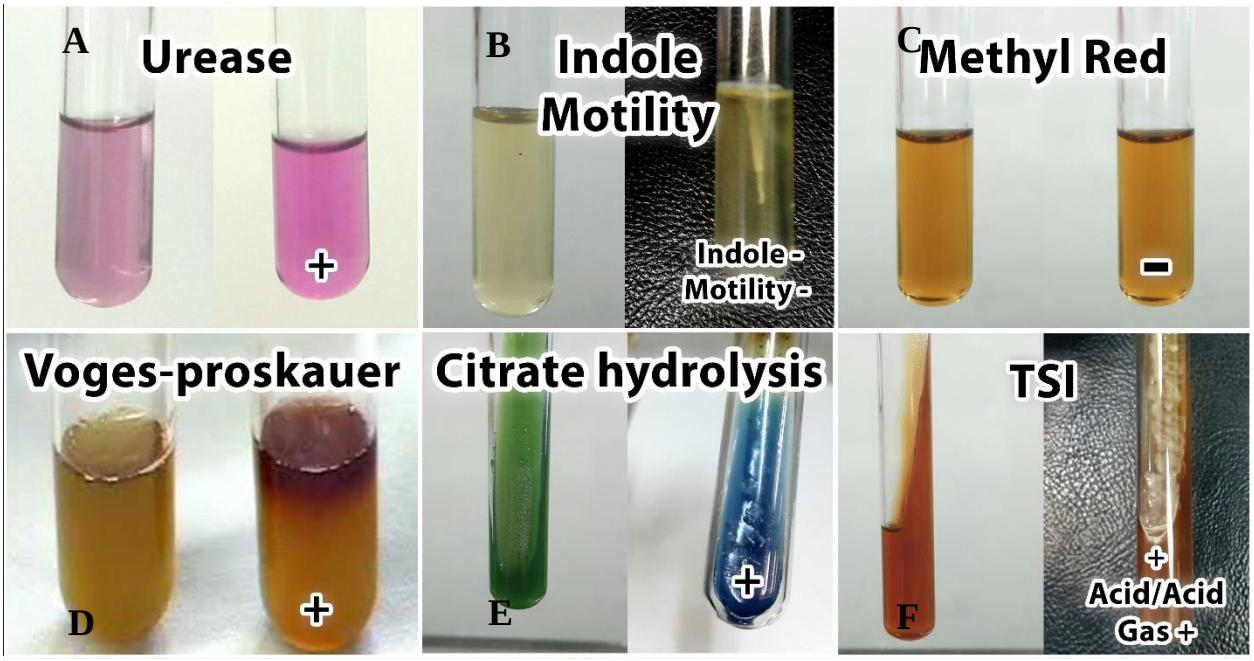
۲-۳تست های بیوشیمیایی

نتایج تست‌های بیو شیمیایی پس از انکوبا سیون و افزودن معرف، مشاهده شد که در جدول ۳ آمده است و تصاویر

بعد از تلقیح باکتری و انکوباســـیون، در شـــکل ٦ قابل مشاهده است.

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

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



شکل ٦- 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 کواکس، 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 ووگس-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 هیرولیز 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.

۳-۳ تست حساسیت دارویی (آنتی بیوگرام)

با مقایســـه بین اندازه هاله عدم رشـــد باکتری و راهنمای CLSI سال ۲۰۲۰[۳۱]، سویه پاتوژن *کلبسیلا* پنومونیه مورد مطالعه، نســـبت به تمامی آنتی بیوتیک‌های مورد بررســـی شامل سفپیم، سیپروفلوکساسین، سفوکسیتین، سفتازیدیم، سفالوتین، ایمی پنم، مروپنم، ارتاپنم، دوری پنم، آزترونام،

مقاومت نشان داد و نسبت به جنتامایسین و کلرامفنیکل، حساسیت بینابینی[۳۲] نشان داد (جدول ٤).

جدول ٤- 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
سفپیم	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
جنتامایسین	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

٤-۳تست های میکروبی

MIC ۳-٤-۱

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

MBC ۳-٤-۲

اثردهی $10\ \mu g\ ml^{-1}$ سفپیم، صرفاً باعث کاهش رشد *کلبسیلا پنومونیه* شد، در حالی که اثر دهی همزمان ۱۰µg/mL سفپیم در ترکیب با $800\ \mu g\ ml^{-1}$ 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 سفپیم در جدول ۵ آمده است.

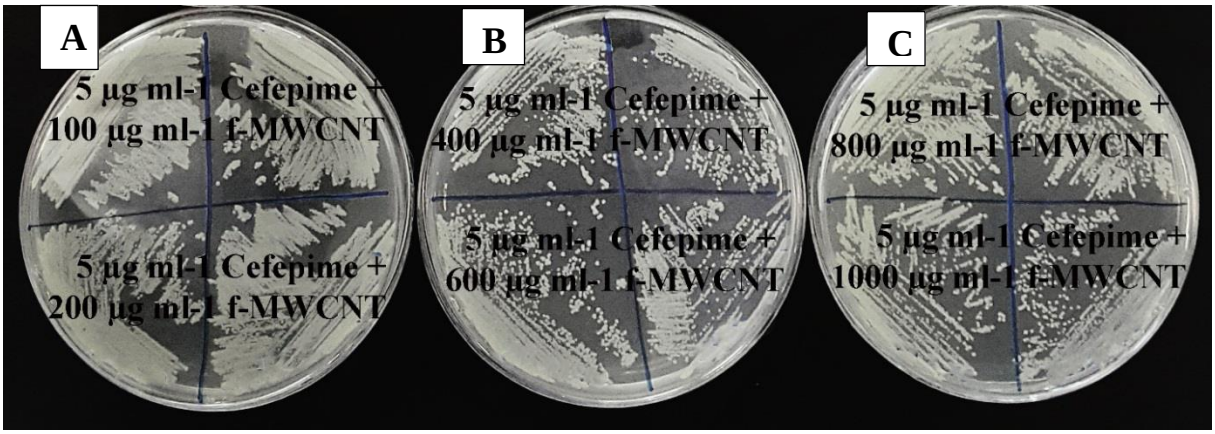
جدول۵- نتایج MBC اثر دهی دوزهای سفپیم و نانوسیال بر *کلبسیلا پنومونیه*

دوز آنتی بیوتیک ($\mu g\ ml^{-1}$)	دوز ***f*-MWCNTs** ($\mu g\ ml^{-1}$)					
	۱۰۰	۲۰۰	٤۰۰	٦۰۰	۸۰۰	۱۰۰۰
۵						

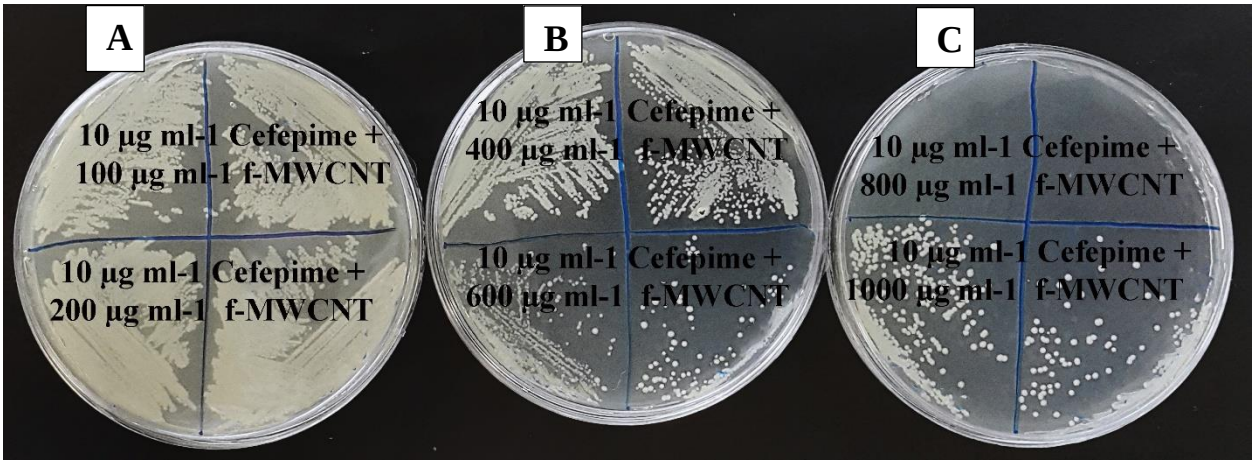
32. Intermediate

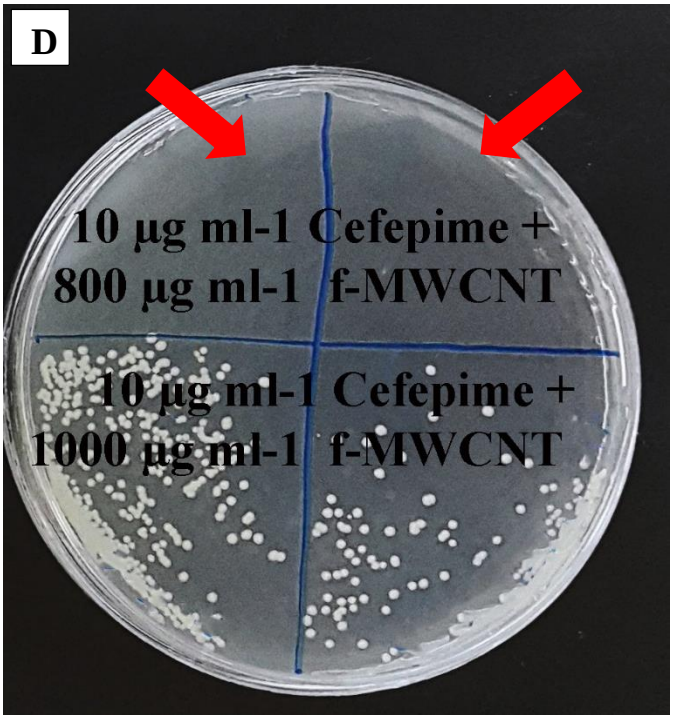
۵						
۱۰						
۱۰						

رشد زیاد کاهش رشد کاهش شدید رشد عدم رشد

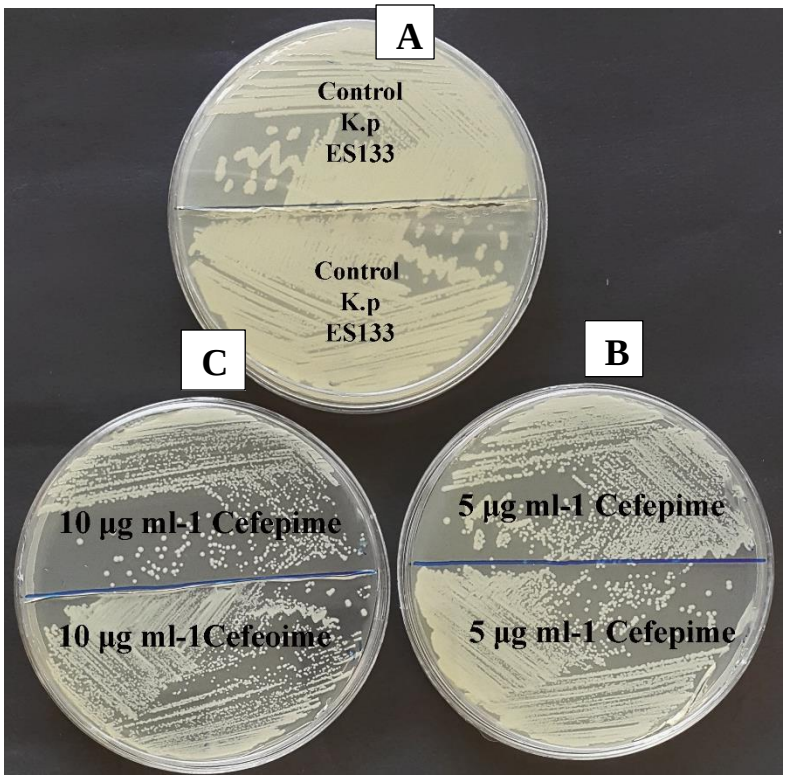


شکل۷– نتایج دو بار تکرار MBC پس از اثر دهی μgml^{-1} ۵ آنتی بیوتیک سفپیم به همراه نانوسیال حاوی نانولوله کربنی چند جداره عامل‌دار ($100, 200, 400, 600,800, 1000\ \mu gml^{-1}$) بر *کلبسیلا پنومونیه*. (A) در تکرارهای $\mu g\ ml^{-1}$ ۵ سفپیم به همراه $\mu g\ ml^{-1}$ ۲۰۰و۱۰۰ نانو لوله کربنی چند جداره عامل‌دار تغییری در رشد باکتری در مقایسه با کنترل (شکل B– ۹) مشاهده نشد (B,C) باکتری با اثر دهی تمام دوزهای نانوسیال حاوی نانو لوله کربنی چند جداره عامل‌دار، رشد کرد. ولی در تکرارهای $\mu g\ ml^{-1}$ ۵ آنتی بیوتیک سفپیم به همراه *f*-MWCNT ٤٠٠, ٦٠٠ , ٨٠٠ , ١٠٠٠μgml^{-1} رشد باکتری کاهش نشان داد.



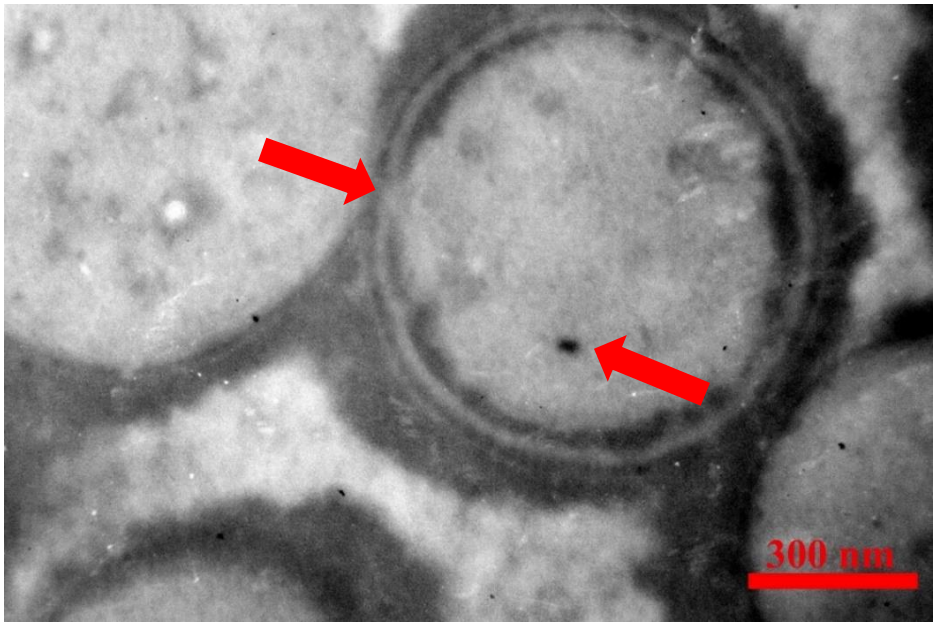


شـــکل۸– نتایج دوبار تکرار MBC با اثر دهی µg ۱۰ آنتی بیوتیک ســـفپیم به همراه دوزهای 100, 200, 400, 600,800, µgml^{-1} 1000 نانولوله کربنی چند جداره عامل‌دار بر *کلبسیلا پنومونیه*. A) در تکرارهای µg ml^{-1} ۱۰ سفپیم به همراه µg ml^{-1} ۱۰۰ و ۲۰۰ *f*-MWCNT تغییری در رشد باکتری در مقایسه با کنترل (شکل C – ۹) مشاهده نشد (B) در تکرارهای µg ml^{-1} ۱۰ سفپیم به همراه µgml^{-1} ۶۰۰ و ٤۰۰ نانو لوله کربنی چند لایه عامل‌دار، کاهش ر شد باکتری م شاهده شد (C) فقط دوز µg ml^{-1} ۱۰ ســفپیم به همراه µgml^{-1} ۸۰۰ نانو لوله کربنی چند لایه عامل‌دار موجب مهار کامل رشــد باکتری شــد (D)برای وضوح بیشتر، تصویر (C) با بزرگنمایی بیشتر نمایش داده شده است.



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

٦-۳- مشاهدات میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)



شکل ۱۰- تصویر میکرو سکوپ الکترونی عبوری (TEM). میکروگراف *کلبسیلا پنومونیه سویه پاتوژن ES133* تیمار شده با μg ۱۰ سفپیم به همراه ۸۰۰ $\mu g ml^{-1}$ نانو لوله حاوی نانو لوله کربنی عامل‌دار. در برش عرضی *کلبسیلا پنومونیه*، ذرات سیاه

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

٤- بحث و نتیجه گیری

در دهه اخیر، برای مقابله با معضل رو به رشد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مطالعات متعددی بر روی نانو مواد مختلف انجام شده است و آثار سینرژیک آنها با آنتی‌بیوتیک، 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 می‌دهد و سازگاری زیستی آنها را بهبود می‌بخشد. برای دستیابی به یک نانوسیال پایدار، چندین روش به کار گرفته شده است که شامل سنتز نانومواد، هم زدن فیزیکی، همگن‌سازی با مافوق صوت، مهندسی سطح و استفاده از سورفاکتانت و سایر مواد افزودنی شیمیایی است.[23,33,40,46]. اگرچه اولین مطالعه کنگ[٣٣] 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[٤٥]، مطالعات متعدد، حاکی از آن است که SWCNT هایی که سطح‌شان با گروه های کربوکسیل (-COOH) و هیدروکسیل (-OH)، عامل‌دار شده بود، در مقایسه با SWCNT های بدون عامل، فعالیت آنتی باکتریال بهتری بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نشان دادند[١٦]. نتایج یک مطالعه نشان می دهد کهSWCNT هایی که برای بهبود پراکندگی در محلول های سورفکتانت مانند سدیم دو دسیل سولفات[٣٤](SDS) پراکنده شده بودند، اثر سمی جزئی بر روی سلول‌های آستروسیت انسانی 1321N1 نشان دادند و بنابراین می‌توانند برای کاربردهای پزشکی-زیستی، به ویژه برای بالا بردن حساسیت دارویی میکروارگانیسم های مقاوم به دارو استفاده شوند[٣٢].

طبق مطالعات قبلی، MWCNTs بدون عامل، بلافاصله پس از پایان فراصوت[٣٥] تجمع پیدا می‌کند، درحالی‌که محلول آبی MWCNT (نانوسیال حاوی نانولوله کربنی دارای عامل COOH -) مدت زمان بیشتری پایدار و پراکنده باقی‌می ماند[٢٤]. 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 ٦ ماه حفظ شد. SWCNT هایی که با گروه های کربوکسیل (-COOH) و هیدروکسیل (-OH) عامل‌دار شده بود، در مقایسه با SWCNT بدون عامل، فعالیت آنتی باکتریال بهتری بر روی باکتری‌های 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 [٣١]. طبق تحقیقی که توسط همین تیم، بر روی اثر MWCNT عامل‌دار بر دارورسانی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (*M.tb*) انجام شد، ایزونیازید کانژوگه با MWCNT عامل‌دار در مقایسه با زمانی که ایزونیازید به تنهایی استفاده شد، موجب افزایش دارورسانی در دوزهای پایین تر ایزونیازید شد که با یافته‌های مطالعه حاضر، مطابقت دارد [١٦]. گروهی از محققان در تگزاس دریافتند دارو رسانی متی سیلین کونژوگه با SWCNT در سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس[٣٦] مقاوم به متی سیلین، در مقایسه با درمان آنتی بیوتیک به تنهایی، ٤٠ برابر کارایی درمان را ارتقا بخشید [٥٠]. وایپیج[٣٧] 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 AgNP 256 µg ml^{-1}گزارش شد. اگرچه یافته‌های مطالعه آنها، حاکی از این بود که ترکیب AgNPs و آنتی‌بیوتیک، منجر به کاهش MIC می شود 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 آمپی سیلین در برابر گونه‌های انتروباکتر[۳۹]، *سودوموناس آئروجینوزا*[۴۰]، *کلبسیلا پنومونیه* و اشریشیاکلی[۴۱] مقاوم به آمپی‌سیلین، فعالیت آمپی سیلین را در غلظت 20 µg ml^{-1} افزایش می دهد[۵۱]. بنابراین با در نظر گرفتن یافته های مطالعات دیگر، *f*-MWCNT به همراه سفپیم، در دوز پایین تر آنتی بیوتیک 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]. ۱۰ µgml^{-1} سفپیم به همراه کمترین غلظت آنتی بیوتیک بود که باعث از بین بردن سویه پاتوژن ۱۳۳ *کلبسیلا پنومونیه* شد، در حالی‌که این سویه، نسبت به غلظت ۱۰ µg mL^{-1}سفپیم بدون *f*-MWCNT، مقاومت نشان داده بود و تست حساسیت دارویی (آنتی بیوگرام) نیز مقاومت به سفپیم را تأیید کرده بود. نتایج یافته های مطالعه قبلی ما نیز همسو با تحقیق حاضر نشان داد که نانو سیال حاوی *f*-MWCNT، منجر به کاهش دوز مؤثر آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، در صورت استفاده ترکیبی می شود[۵۲]. همچنین *f*-MWCNT کونژوگه با ایزونیازید، از طریق تخریب دیواره سخت *M.tb*، موجب دارو رسانی بهینه شد[۱۶]. بنابراین، به منظور بهینه کردن دارورسانی و غلبه بیشتر بر مقاومت *کلبسیلا پنومونیه*، کونژوگه کردن سفپیم، با نانولوله های کربنی چند لایه عامل‌دار شده با عامل اسیدی، پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان، از بخش سل وتحقیقات ریوی انستیتو پاستور ایران، برای در اختیار گذاشتن تجهیزات، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

منابع

1. 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, ΛΛΛAntibiotic Resistance Pattern, and Prognostic Factors. Cancer Management and Research. 12, 4969–4979.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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. mSphere3: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) Comparesion 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, ١٢٨–١٣٠٤

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, Suciu, 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, Zyła, 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

Maryam Mehdizadeh [a], Mojgan Sheikhpour [b,c*], Iman Salahshourifar [a], Seyed Davar Siadat [b,c], Parvaneh Saffarian[a]

[a] Department of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[b] Department of Mycobacteriology and Pulmonary Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[c] Microbiology 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.