



Original Paper

The Impact of Bacterial Nanocellulose Containing Natamycin and Amphotericin B on *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in an in Vitro Environment

Mohammad Abbaszadeh (M.Sc)¹ , Vahid Tanhaie Marand (Ph.D)^{*2}  , Hassan Malekinejad (Ph.D)³  

¹ M.Sc in Microbiology, Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran. ² Assistant Professor of Microbiology, Department of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran. ³ Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

Abstract

Background and Objective: Bacterial nanocellulose is known as a potential carrier for a widespread spectrum of biological compounds, including antibacterial and antifungal compounds. The present study was conducted to determine the impact of bacterial nanocellulose containing Natamycin and Amphotericin B on *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in an in vitro environment.

Methods: In this descriptive-analytical research, *Aspergillus flavus*-PTCC: 5006 and *Penicillium citrinum*-PTCC: 5304 fungi were prepared from the Fungal Collection of the Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) of Natamycin and Amphotericin B against *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* were evaluated by the microdilution method. Bacterial nanocellulose was prepared using *Komagata xylinum* bacterium, and Natamycin and Amphotericin B were added in three concentrations of 0.01%, 0.05%, and 0.1% to wet and lyophilized nanocellulose films by the immersion method. Then, the antifungal effects of the film containing the above compounds against the investigated fungi were investigated by the agar diffusion method. Parchment paper was used as a control for comparison. Spectral properties of nanocellulose film containing antifungal compounds were evaluated by the Fourier transform infrared (FTIR) method.

Results: MIC and MFC of Natamycin for *Aspergillus flavus* were determined as 3.9 µg/mL and 7.81 µg/mL, and for *Penicillium citrinum* as 7.81 µg/mL and 15.62 µg/mL, respectively. MIC and MFC of Amphotericin B for *Aspergillus flavus* were determined as 7.81 µg/mL and 15.62 µg/mL, and for *Penicillium citrinum* as 15.62 µg/mL and 31.25 µg/mL, respectively. The increased concentration had a statistically significant impact on the antifungal properties of all films ($P < 0.05$). The best antifungal effects of the film were related to the film containing Natamycin.

Conclusion: Bacterial nanocellulose containing Natamycin showed stronger antifungal effects in an in vitro environment compared to Amphotericin B against *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum*.

Keywords: Bacterial Nanocellulose, Antifungal Agents, Nanotechnology, *Aspergillus flavus*, *Penicillium citrinum*

*Corresponding Author: Vahid Tanhaie Marand (Ph.D), E-mail: dr.vahid.tanhaei@gmail.com



Received 9 May 2023

Final Revised 22 July 2023

Accepted 19 August 2023

Published Online 27 Feb 2024

Cite this article as: Abbaszadeh M, Tanhaie Marand V, Malekinejad H. [The Impact of Bacterial Nanocellulose Containing Natamycin and Amphotericin B on *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in an in Vitro Environment]. J Gorgan Univ Med Sci. 2024; 26(1): 87-94. [Article in Persian]





Extended Abstract

Introduction

The produced bacterial nanocellulose film has unique properties, such as a high surface-to-volume ratio, low thermal expansion coefficient, considerable surface chemical reactivity due to the presence of hydroxyl groups, and biocompatibility. At present, the use of nanocellulose, besides plastic industries, is also of interest in medicine and agriculture. Fungal diseases can appear both systemically and locally (cutaneous and mucosal) and delivering the appropriate medicine to the contamination site in the shortest possible time with the maximum concentration will be really noteworthy. Among the fungal diseases, aspergillosis and penicilliosis are of great importance due to having systemic and local forms, as well as high prevalence, in humans and animals. In addition to inducing illnesses, these fungi have also the capability to produce toxins under suitable conditions. Besides their medical and biological importance, *Aspergillus* and *Penicillium* fungi are also valuable in agriculture and food industry due to the production of illnesses. The use of natural polymers, including bacterial nanocellulose, is currently very notable as a substrate for medical drugs and antimicrobial compounds for usage in humans, animals, and food packaging. In this approach, the active compound (such as antimicrobial or antifungal) is present in nanocellulose and these polymers are employed as films or adhesives in wounds and cutaneous infections. The current study was conducted to determine the impact of bacterial nanocellulose containing Natamycin and Amphotericin B on *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in an in vitro environment.

Methods

In this descriptive-analytical study, *Aspergillus flavus* (PTCC: 5006) and *Penicillium citrinum* (PTCC: 5304) fungi were prepared from the fungal collection of the Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University. The prepared fungi were cultured in the subdextrose broth culture medium for one week at a temperature of 25°C. After growth, they were used for inoculation. The broth microdilution method (M38-A2 method) was employed to compare the antifungal effects of Natamycin and Amphotericin B against *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* fungi. All tests were repeated three times. This method was used to specify the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC). The Komagata xylum ATCC 700178 (previously called *Gluconoacetobacter xylinum*) available in the Microbial Collection of the Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, was used to prepare bacterial nanocellulose. In order for nanocellulose immersion in the antifungal solution, fragments of particular sizes were cut from wet nanocellulose, freeze-dried nanocellulose, and parchment paper with 8-mm diameter by a metal punch. Concentrations of 0.01%, 0.05%, and 0.1% of both antifungal compounds were first prepared and nanocellulose fragments along with parchment were immersed in it for 24 hours. Then, its antifungal properties were assessed. Zero drug concentration on the nanocellulose film was regarded as a negative control. In order to confirm the connection, probable changes, and also the placement of the antifungal agent in the film structure, and comparison with the control sample, the Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analysis of the transmission spectra was carried out on the samples using the FTIR spectroscopic apparatus (Thermo Nicolet Company) in the absorption range of 400-4000 cm⁻¹ with a spectral resolution of 4 cm⁻¹. Antifungal properties of films prepared by the agar diffusion method were assessed.

Results

The MFC of Natamycin against *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* was determined as 7.81 and 15.62, and the MIC of Amphotericin B against *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* was determined as 15.62 and 31.25, respectively.

The MIC of Natamycin against *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* was determined as 3.90 and 7.81, and the MIC of Amphotericin B against *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* was determined as 7.81 and 15.62, respectively.

Lyophilization-dried nanocellulose indicated the strongest antifungal effects against both investigated fungi. The increased concentration demonstrated statistically significant impacts on the antifungal properties of all films ($P < 0.05$). In the meantime, the antifungal effect of Natamycin against *Aspergillus flavus* was greater.

The results of examining the antifungal effects of nanocellulose without Natamycin and Amphotericin B demonstrated that the synthesized film lacked any antifungal effect against the investigated fungi.

The analysis of the antifungal effect against *Penicillium citrinum* revealed the high capability of the nanocellulose film containing natamycin. In comparing the impacts of the two medicines, lyophilized nanocellulose had a higher capability to carry and release the antifungal compound compared to wet nanocellulose and parchment paper ($P < 0.05$).

According to the results of the FTIR analysis of analysis of the transmission spectra resulting from the transmission bands of the cellulose film for Natamycin and Amphotericin B, natamycin-related transmission bands of relatively strong transmission in the range of 3282 cm⁻¹ (related to the stretching vibrations of the O-H and N-H bonds), 1714 (the stretching vibrations of C=O), 1569 (the C=C bond stretching and the N-H bending), and 1390 (the C-O-C symmetric vibrations) were evident.

Conclusion

The results of this research indicated the higher capability of Natamycin than Amphotericin B in inhibiting the growth of both fungi. Moreover, both Natamycin and Amphotericin B drugs were chemically bonded to nanocellulose based on the FTIR properties, and the release rate of the bonded drug and subsequently the rate of effectiveness of the drug bonded on the lyophilized form of nanocellulose was more than its wet form and both were more than the parchment paper.

In the current study, the effectiveness of nanocellulose film containing two antifungal compounds against *Aspergillus flavus* was determined to be greater than *Penicillium citrinum*. Overall, the impacts of Natamycin were more than those of Amphotericin B, regardless of the film type and the fungus type.

The antifungal Natamycin and Amphotericin B medicines with acceptable antifungal capability assessed by MIC and MFC tests can be attached to bacterial nanocellulose, and vice versa, they have the ability to be released from the mentioned film. It should be remembered that the results of the preliminary tests of this study and numerous previous studies have demonstrated that the nanocellulose film itself lacks antimicrobial properties and the antifungal effects observed in this study were obtained after bonding medicines to the film, denoting the release of medicines bonded to the film. The most crucial property of the bacterial nanocellulose film is that the small diameter of the fibers of this polymer allows for strong hydrogen bonds. Most of the pharmacological properties, including the extent of solubility, change in chemical nature, polymerization, and depolymerization, can depend on the compound's hydrogen bonds. The aforementioned properties may justify the strong impact of drugs loaded on nanocellulose compared to parchment paper. The FTIR analysis carried out in this research confirms that both antifungal drugs have a high capability to create hydrogen bonds through hydroxy and carboxylic acid groups with the nanocellulose substrate due to having reactive groups (carboxylic acid groups in Natamycin structure and also the disappearance of the bands placed in the range of the carbonyl group of the Amphotericin B molecule. The water absorption property of bacterial nanocellulose film, as observed in our study, seems to play a substantial role in the controlled release of the antifungal compound to the target organ.

Funding

This article was extracted from Mohammad Abbaszadeh's master's thesis in the Microbiology, Islamic Azad University, Urmia Branch, Urmia, Iran.

Conflicts of Interest

The authors have no conflict of interest.

Bacterial nanocellulose containing Natamycin showed stronger antifungal effects in an in vitro environment compared to Amphotericin B against *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum*.



تحقیقی

اثر نانوسلولز باکتریایی حاوی ناتاماسین و آمفوتریسین B روی آسپرژیلوس فلاوس و پنی سیلیوم سیترونیوم در محیط برون تنی

محمد عباسزاده^۱، دکتر وحید تنهایی مرند^{۲*}، دکتر حسن ملکی نژاد^۳

^۱ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران. ^۲ استادیار زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران. ^۳ استاد، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: نانوسلولز باکتریایی به عنوان یک حامل بالقوه برای طیف وسیعی از ترکیبات بیولوژیک از جمله ترکیبات ضدباکتریایی و ضدقارچی مطرح است. این مطالعه به منظور تعیین اثر نانوسلولز باکتریایی حاوی ناتاماسین و آمفوتریسین B روی آسپرژیلوس فلاوس (*Aspergillus flavus*) و پنی سیلیوم سیترونیوم (*Penicillium citrinum*) در محیط برون تنی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی تحلیلی قارچ‌های *Aspergillus flavus*- PTCC:5006 و *Penicillium citrinum*- PTCC:5304 از کلکسیون قارچی گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum Fungicidal Concentration: MFC) ناتاماسین و آمفوتریسین B علیه *Aspergillus flavus* و *Penicillium citrinum* به روش میکرودايلوشن ارزیابی گردید. نانوسلولز باکتریایی با استفاده از باکتری کومماگاتی گزیلینوم تهیه و ناتاماسین و آمفوتریسین B در سه غلظت ۰/۰۱ درصد، ۰/۰۵ درصد و ۰/۱ درصد به روش غوطه‌وری به فیلم مرطوب و لیوفلیز شده نانوسلولز اضافه شدند. سپس اثرات ضدقارچی فیلم حاوی ترکیبات فوق بر علیه قارچ‌های مورد مطالعه به روش انتشار در آگار بررسی شد. کاغذ پارچمنت به عنوان کنترل برای مقایسه استفاده گردید. خصوصیات طیفی فیلم نانوسلولز حاوی ترکیبات ضد قارچ به روش FTIR/رزیابی شد.

یافته‌ها: MIC و MFC ناتاماسین برای *Aspergillus flavus* به ترتیب ۳/۹ و ۷/۸۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و در *Penicillium citrinum* به ترتیب ۷/۸۱ و ۱۵/۶۲ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شدند. MIC و MFC آمفوتریسین B برای *Aspergillus flavus* به ترتیب ۷/۸۱ و ۱۵/۶۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و در *Penicillium citrinum* به ترتیب ۱۵/۶۲ و ۳۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شدند. افزایش غلظت اثر آماری معنی‌داری در خصوصیات ضدقارچی تمامی فیلم‌ها داشت ($P < 0.05$). بهترین اثرات ضدقارچی فیلم مربوط به فیلم حاوی ناتاماسین بود. نتیجه‌گیری: نانوسلولز باکتریایی حاوی ناتاماسین نسبت به آمفوتریسین B علیه *Aspergillus flavus* و *Penicillium citrinum* اثرات ضدقارچی قویتری در محیط برون تنی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: نانوسلولز باکتریایی، عوامل ضد قارچی، نانوتکنولوژی، *Aspergillus flavus*، *Penicillium citrinum*

* نویسنده مسؤول: دکتر وحید تنهایی مرند، پست الکترونیکی: dr.vahid.tanhaei@gmail.com

نشانی: ارومیه، کیلومتر دو جاده فرودگاه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، تلفن ۰۴۴-۳۱۸۰۳۰۰۰

وصول ۱۴۰۲/۲/۱۹ اصلاح نهایی ۱۴۰۲/۴/۳۱ پذیرش ۱۴۰۲/۵/۲۸ انتشار ۱۴۰۲/۱۲/۸

مقدمه

فیلم سلولزی تولید شده توسط باکتری‌ها (نانوسلولز باکتریایی) به دلیل سازگاری با سیستم‌های زیستی مورد توجه محققین و تولید کنندگان قرار گرفته است. فیلم تولید شده توسط باکتری استوباکترگزینینوم به خاطر دارا بودن زنجیره‌های خطی از بتا ۱-۴-گلوکان به عنوان هسته اولیه، برای استفاده در صنایع مختلف حائز اهمیت است. زنجیره‌های فوق، از سطح سلول‌های باکتری ترشح شده و تشکیل نوار ژلاتینی با ماهیت سه بعدی را ایجاد و ابعاد

فوق نازک (۸-۳ نانومتر) و مقاومت مکانیکی بالا را ایجاد می‌کند.^{۱،۲} فیلم نانوسلولز باکتریایی تولید شده دارای خواص منحصر به فردی از جمله نسبت سطح به حجم بالا، ضریب انبساط حرارتی پایین، واکنش‌پذیری شیمیایی سطحی قابل توجه به دلیل حضور گروه‌های هیدروکسیل و سازگاری زیستی است.^۳ امروزه استفاده از نانوسلولزها علاوه بر صنایع پلاستیک‌سازی، در پزشکی و کشاورزی نیز مورد توجه است.^۴ خصوصیت مکانیکی، تخلل بالای نانوسلولز باکتریایی باعث شده از این پلیمر به عنوان بستر برای ترکیبات مختلف از جمله

لیزوزیم،^۶ اسانس و عصاره گیاهی،^۷ پروبیوتیک و پست‌بیوتیک^۸ استفاده شود. برای اضافه کردن ترکیب فعال به فیلم نانوسولوز از دو روش *ex-situ* و *in-situ* استفاده می‌شود. در روش اول، ترکیب فعال بعد از سنتز فیلم به آن اضافه می‌شود. در حالی که در روش دوم، ترکیب حین سنتز نانوسولوز باکتریایی به محیط کشت اضافه می‌شود. لذا ترکیب کاملاً در داخل ساختار فیلم قرار می‌گیرد.^۹

در درمان بیماری‌های قارچی مانند سایر بیماری‌ها نیاز به تشخیص درست، انتخاب روش صحیح درمان و دارورسانی مناسب است؛ وگرنه شاهد غیرموثر بودن داروها و مقاومت‌های دارویی بیشتر خواهیم بود. بیماری‌های قارچی هم می‌توانند به صورت سیستمیک و هم موضعی (پوستی و مخاطی) ظاهر شوند و رساندن داروی مناسب به محل آلودگی در کمترین زمان ممکن و حداکثر غلظت، بسیار قابل توجه خواهد بود. در بین بیماری‌های قارچی آسپرژیلوزیس و پنیسیلیوزیس به خاطر داشتن اشکال سیستمیک و موضعی و همچنین شیوع بالا در انسان و حیوانات اهمیت دارند. این قارچ‌ها علاوه بر تولید بیماری، توان تولید توکسین در شرایط مناسب را نیز دارند.^{۱۰} قارچ‌های *آسپرژیلوس* و *پنیسیلیوم* علاوه بر اهمیت پزشکی و بیولوژیک، به خاطر تولید بیماری‌ها، از لحاظ کشاورزی و صنایع غذایی نیز ارزشمندند. امروزه استفاده از پلیمرهای طبیعی از جمله نانوسولوز باکتریایی به عنوان بستر داروی پزشکی و ترکیبات ضد میکروبی برای کاربرد در انسان، حیوان و بسته‌بندی غذا، بسیار مورد توجه است. در این رهیافت، ترکیب فعال (مثل ضد میکروب یا ضد قارچ)، در نانوسولوز قرار گرفته شده و از این پلیمرها به عنوان فیلم یا چسب در زخم‌ها و عفونت‌های پوستی استفاده می‌شود. امکان استفاده از فیلم‌های ضد میکروب تهیه شده با نانوسولوز، در بسته‌بندی مواد غذایی نیز متصور است. این مطالعه به منظور تعیین اثر نانوسولوز باکتریایی حاوی ناتامایسین و آمفوتریسین B روی *آسپرژیلوس فلاوس* (*Aspergillus flavus*) و *پنیسیلیوم سیترینوم* (*Penicillium citrinum*) در محیط برون تنی انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی تحلیلی قارچ‌های *Aspergillus flavus* (PTCC:5304) و *Penicillium citrinum* (PTCC:5006) کلکسیون قارچی گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید.

قارچ‌های تهیه شده در محیط کشت ساب‌رو دکستروز براث (Merck, Germany) به مدت یک هفته و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. پس از رشد، از آنها برای تلقیح استفاده شد. برای آماده‌سازی اسپور قارچ، ۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل روی کلنی قارچ از قبل کشت داده شده اضافه شد و چندین بار پی‌پتینگ گردید. شمارش اسپور به روش لام نئوبار انجام شد. تراکم

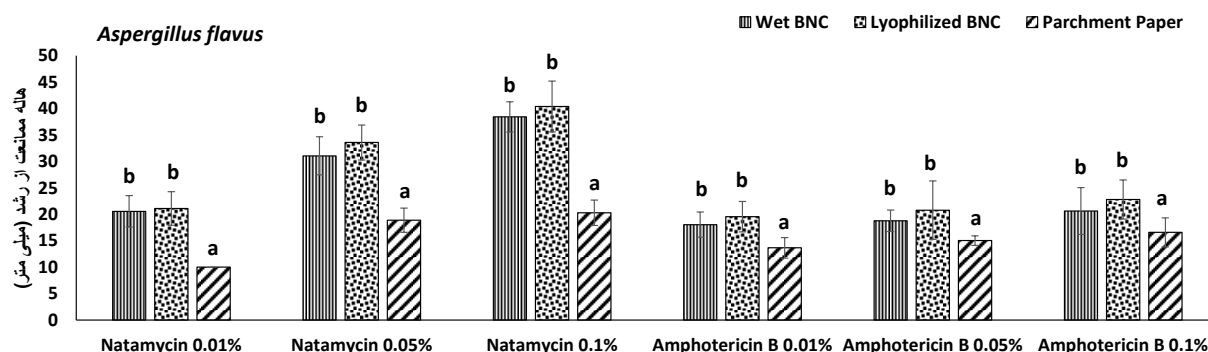
اسپور به میزان 5×10^6 اسپور در میلی‌لیتر بود.

آزمون تعیین حساسیت ترکیبات ضد قارچ: از روش میکرودا بلوشن براث (روش M38-A2) برای مقایسه اثر ضدقارچی ناتامایسین و آمفوتریسین B علیه قارچ‌های *Aspergillus flavus* و *Penicillium citrinum* استفاده شد. همه آزمایش‌ها، سه بار تکرار گردید. از این روش، برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimum Fungicidal Concentration: MFC) استفاده شد.^{۱۱،۱۲}

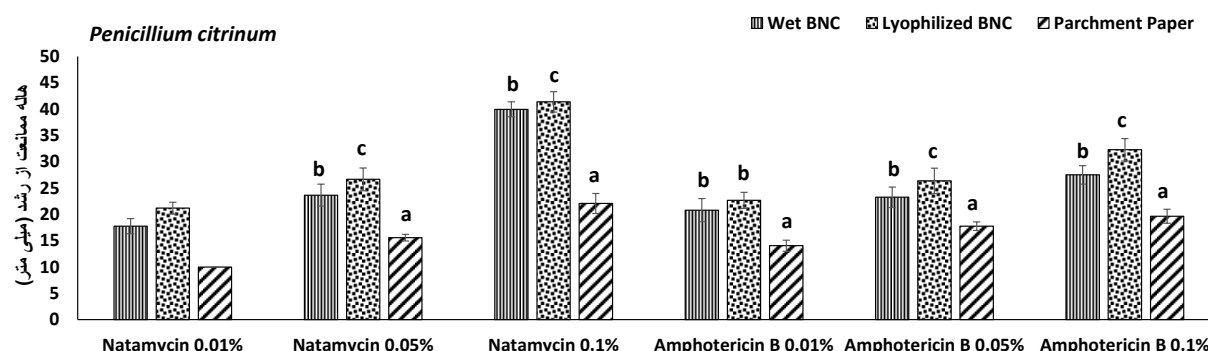
تهیه نانوسولوز باکتریایی: باکتری *کوماگاتی گزینیوم* ATCC 700178 (با نام قدیمی *گلوکونو/استوباکتر گزینیوم*) موجود در کلکسیون میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه نانوسولوز، باکتری در محیط ترکیبی حاوی گلوتن (۱/۹۱ درصد)، ملاس (۵/۳۸ درصد)، اتانول (۱/۳۸ درصد)، آمونیوم سولفات (۰/۶۳ درصد)، اسید سیتریک (۰/۱۱۵ درصد) و Na_2HPO_4 (۰/۲۷ درصد) کشت داده شد.^{۱۳} محیط حاوی باکتری به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و در شرایط استاتیک نگهداری و نانوسولوز سنتز شده پس از برداشت با آب و سود ۰/۱ مولار تا ظهور رنگ سفید شستشو داده شد. نانوسولوز سنتز شده تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید. برای تهیه فیلم ضد میکروب، فیلم با قطر ۸ میلی‌متر به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در غلظت‌های دارویی تهیه شده غوطه‌ور گردید. برای لیوفیلزاسیون، فیلم مرطوب به ظروف استریل منتقل و به مدت ۲۴ ساعت به فریزر با دمای ۴۰- درجه سانتی گراد منتقل شد. سپس فیلم منجمد شده به دستگاه خشک‌کن انجمادی تحت خلاء (به مدت ۴۸ ساعت تحت دمای ۷۰- درجه سانتی گراد و فشار ۰/۰۰۱۳ بار) منتقل شد.

غوطه‌ور کردن نانوسولوز در محلول ضد قارچ: قطعاتی در اندازه مشخص از نانوسولوز مرطوب، نانوسولوز خشک شده با فریز درایر و کاغذ پارچمنت با قطر ۸ میلی‌متری توسط پانچ فلزی برش داده شد. کاغذ پارچمنت یک کاغذ سلولزی است که به دلیل قابلیت جذب بالا در صنایع مختلف استفاده می‌گردد. لذا به عنوان کاغذ کنترل استفاده شد.^{۱۴} ابتدا غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد از هر دو ترکیب ضد قارچ تهیه و قطعات نانوسولوز به همراه پارچمنت در آن به مدت ۲۴ ساعت غوطه‌ور گردید. سپس خصوصیات ضدقارچی آن مورد بررسی قرار گرفت. غلظت صفر دارو در روی فیلم نانوسولوز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

آنالیز ساختار شیمیایی از طریق بررسی خصوصیات طیفی با مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR): به منظور تایید اتصال، تغییرات احتمالی و نیز قرار گرفتن عامل ضدقارچی در ساختار فیلم و مقایسه با نمونه شاهد آنالیز طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه طیف‌های عبوری



نمودار ۱: اثر ضد میکروبی (هاله ممانعت از رشد) فیلم نانوسلولز مرطوب، خشک و پارچمنت حاوی غلظت‌های مختلف ناتامایسین و آمفوتریسین B علیه *Aspergillus flavus* حروف کوچک نامشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین غلظت‌های مختلف داروی ضد قارچ در سه فیلم مورد مطالعه است. میانگین با احتساب مجموع قطر دیسک و هاله است.



نمودار ۲: اثر ضد میکروبی (هاله ممانعت از رشد) فیلم نانوسلولز مرطوب، خشک و پارچمنت حاوی غلظت‌های مختلف ناتامایسین و آمفوتریسین B علیه *Penicillium citrinum* حروف کوچک نامشابه بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین غلظت‌های مختلف داروی ضد قارچ در سه فیلم مورد مطالعه است. میانگین با احتساب مجموع قطر دیسک و هاله است.

آمده است. اثرات ضدقارچی به صورت هاله ممانعت از رشد سه نوع حامل دارای ناتامایسین و آمفوتریسین B علیه *Aspergillus flavus* و *Penicillium citrinum* در نمودارهای ۱ و ۲ آمده است.

جدول ۱: اثر ضد قارچی ناتامایسین و آمفوتریسین B علیه *آسپرژیلوس فلاوس* و *پنی‌سیلیوم سیتترینوم*

داروها	حداقل غلظت مهار کنندگی (میکروگرم بر میلی لیتر)		حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم بر میلی لیتر)	
	<i>آسپرژیلوس</i>	<i>پنی‌سیلیوم</i>	<i>آسپرژیلوس</i>	<i>پنی‌سیلیوم</i>
ناتامایسین	۳/۹۰	۷/۸۱	۷/۸۱	۷/۸۱
آمفوتریسین B	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۱۵/۶۲	۳۱/۲۵

نانوسلولز خشک شده به روش لیوفیلیزاسیون قوی‌ترین اثرات ضدقارچی را علیه هر دو قارچ مورد مطالعه نشان داد. افزایش غلظت اثرات آماری معنی‌داری در خصوصیات ضدقارچی تمامی فیلم‌ها نشان داد (نمودار یک) ($P < 0.05$). در همین حال اثر ضدقارچی ناتامایسین علیه *Aspergillus flavus* بیشتر بود.

نتایج بررسی اثرات ضدقارچی نانوسلولز بدون ناتامایسین و آمفوتریسین B نشان داد که فیلم سنتز شده فاقد اثر ضدقارچی علیه قارچ‌های مورد مطالعه است.

آنالیز اثر ضدقارچی علیه *Penicillium citrinum* توان بالای فیلم نانو سلولز حاوی ناتامایسین را نشان داد. در مقایسه آماری اثر هر دو دارو، نانوسلولز لیوفیلز به نسبت نانوسلولز مرطوب و در مقایسه با

با استفاده از دستگاه اسپکتروسکوپی FTIR ساخت شرکت Thermo Nicolet مدل ۶۷۰ Nexus® و در محدوده جذبی $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ و با قدرت تفکیکی طیفی 4 cm^{-1} بر روی نمونه‌ها انجام شد.

ارزیابی خصوصیات ضد قارچی فیلم: خصوصیات ضدقارچی فیلم‌های تهیه شده به روش انتشار در آگار بررسی شد.^{۱۵} برای این منظور، سوسپانسیون قارچی به روش کشت سطحی روی محیط کشت سابورد کستروز آگار پخش گردید. دیسک‌های ضدقارچی تهیه شده در مرحله قبل روی آگار قرار داده شده و پلیت‌ها به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری و اندازه هاله ممانعت تعیین گردید.

داده‌ها با استفاده از برنامه GrapPad-8.01 تجزیه و تحلیل شدند. تغییرات بین گروه‌های مورد مطالعه با آزمون ANOVA آنالیز شد. سپس برای تعیین اختلاف بین میانگین اعداد (حداقل سه تکرار برای هر آزمایش) از آزمون Duncan's multiple range برای مقایسه بین میانگین‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج اثر ضد قارچی ناتامایسین و آمفوتریسین B در جدول یک

شاید بتوان به شرکت کردن گروه‌های کربوکسیلیک اسید در ساختار ناتامایسین و تشکیل پیوند با گروه‌های عاملی نانوسولز نسبت داد. در همین حال همان‌طور که در **شکل B-۱** مشاهده می‌شود؛ جابجایی عبورهای مشاهده شده مربوط به گروه عاملی هیدروکسیل (از 3421 cm^{-1} به 3447 cm^{-1}) و همچنین ناپدید شدن باندهای قرار گرفته در محدوده مربوط به گروه کرونیل را می‌توان گواهی بر اتصال مولکول آمفوتریسین B با ایجاد پیوندهای هیدروژنی از طریق گروه‌های هیدروکسی و کربوکسیلیک اسید با بستر نانوسولز دانست.

بحث

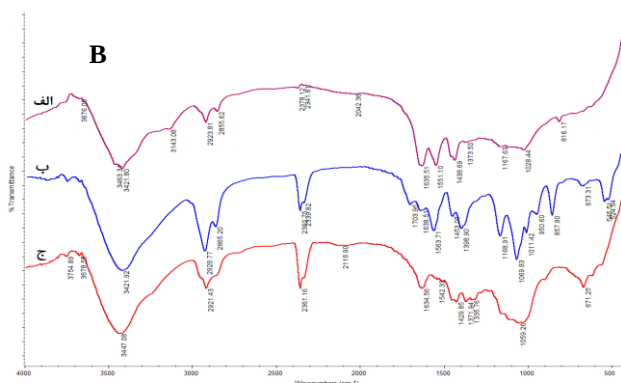
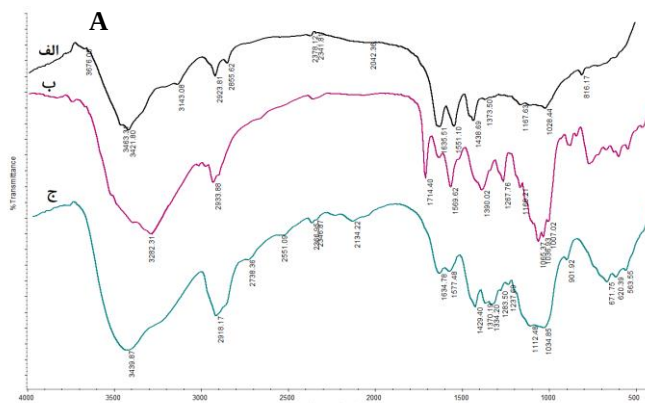
در مطالعه حاضر، ضمن تولید فیلم نانوسولز باکتریایی، توان اتصال و حمل دو ترکیب پر مصرف ضدقارچی علیه دو قارچ مهم و پر شیوع بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که ناتامایسین توان بالایی نسبت به آمفوتریسین B در مهار رشد هر دو قارچ دارد. همچنین هر دو داروی ناتامایسین و آمفوتریسین B براساس مشخصات طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوری به طور شیمیایی با نانوسولز باند شدند و میزان آزادسازی داروی اتصالی و به دنبال آن میزان اثرگذاری داروی باند شده بر شکل لیوفیلیزه نانوسولز از فرم مرطوب آن و هر دو تا بیشتر از صفحه پارچمنت بود.

محققان نشان دادند که خصوصیات ضد میکروبی لیوزیم با اضافه شدن آن به فیلم نانوسولز افزایش می‌یابد.^۶ نتایج مشابه در مطالعه حاضر گزارش گردید. اثرات فیلم‌های ضد میکروبی علیه عوامل میکروبی بستگی به نوع فیلم، نوع و میزان ترکیب ضد میکروب و نوع میکروارگانیسم دارد. به عنوان مثال، ترکیب ضد میکروبی همچون لیوزیم، فقط علیه باکتری‌های گرم مثبت اثرگذار است. در حالی که اثرات ضد میکروبی وارد کردن ترکیباتی از جمله اکسید مس به نانوسولز، در باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) (هاله ممانعت ۱۱/۸ میلی‌متر) بیشتر از باکتری گرم منفی (*اشرشیاکلی*) (هاله ممانعت ۵/۶ میلی‌متر) است.^{۱۶} در مطالعه حاضر نیز اثربخشی فیلم نانوسولز حاوی دو ترکیب ضدقارچی علیه *Aspergillus flavus* بیشتر از *Penicillium citrinum* تعیین شد. در مجموع اثرات ناتامایسین بدون توجه به نوع فیلم و نوع قارچ بیشتر از آمفوتریسین B بود. افزایش غلظت در هر دو ترکیب ضد قارچی باعث افزایش آماری معنی‌دار اثر ضدقارچی گردید.

داروهای ضدقارچ ناتامایسین و آمفوتریسین B این مطالعه، داروهایی هستند که عموماً در اغلب کشورهای در حال توسعه به صورت تکی یا ترکیبی و به فرم موضعی برای درمان کراتیت ناشی از قارچ‌های رشته‌ای استفاده می‌شود. با این حال مصرف ترکیبی احتمال افزایش خطر سمیت دارویی و مخارج درمانی را به دنبال دارد. نکته اول قابل توجه از یافته‌های مطالعه حاضر آن است که

کاغذ پارچمنت توان حمل و آزادسازی بیشتری از ترکیب ضد قارچ داشت (نمودار ۲) ($P < 0.05$).

نتایج آنالیز طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوری طیف‌های عبوری به دست آمده از نوارهای عبوری فیلم سلولزی برای ناتامایسین در **شکل A-۱** و برای و آمفوتریسین B در **شکل B-۱** نشان داده شده است.



شکل ۱: آنالیز طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوری ناتامایسین (A) و آمفوتریسین B (B). فیلم نانوسولز باکتریایی (الف)، داروی ناتامایسین / آمفوتریسین B (ب)، فیلم نانوسولز اصلاح شده با دارو (ج).

باندهای عبوری مربوط به ناتامایسین عبورهای نسبتاً قوی در محدوده 3282 cm^{-1} (مربوط به ارتعاشات کششی پیوند O-H و N-O)، 1714 cm^{-1} (ارتعاشات کششی گروه C=O)، 1569 cm^{-1} (کشش پیوند C=C و خمش‌های N-H) و 1390 cm^{-1} (ارتعاشات متقارن C-O-C) مشهود است. در فیلم نانوسولزی مجاور شده با عامل اصلاح گر ناتامایسین، جابجایی عبور مربوط به پیوندهای O-H و N-H به سمت اعداد موجی بزرگ‌تر (3282 cm^{-1} به 3439 cm^{-1}) می‌تواند شواهدی بر شرکت کردن این پیوندها و تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین ساختار پلی‌ساکارییدی نانوسولز و ناتامایسین باشد. اتفاق مهم دیگری که در این طیف‌ها به وضوح قابل مشاهده است؛ ناپدید شدن نوار عبوری در 1714 cm^{-1} از طیف مربوط به ناتامایسین است که

اولامین از نانوسلولز باکتریایی با سرعت بالاتری نسبت به عصاره در ناخن اتفاق افتاده است و این ماده اثرات ضد قارچی علیه قارچ‌های عامل اونیکومایکوزیس (عفونت قارچی ناخن) از جمله *کاندیدا آلبیکنس* داشت. هاله ممانعت از رشد فیلم نانوسلولز باکتریایی (۶ میلی‌متر) حاوی سیکلوپیروکس اولامین در *کاندیدا آلبیکنس*، ۲۰ تا ۲۵ میلی‌متر گزارش شد.^{۲۱} به نظر می‌رسد ویژگی جذب آب فیلم نانوسلولز باکتریایی چنانچه در مطالعه اشاره شده و مطالعه ما مشاهده شد؛ نقش مهمی در رهایش کنترل شده ترکیب ضدقارچی به ارگان هدف دارد. از فیلم مرطوب نانوسلولز باکتریایی حاوی ناتاماسین در پنیر نیز مورد استفاده قرار گرفت. هاله ممانعت از رشد فیلم (۱۰ میلی‌متر) نانوسلولز باکتریایی حاوی ۲/۵ درصد ناتاماسین علیه قارچ‌ها از جمله *ساکارومیسس سروزیه* ۳۵ میلی‌لیتر گزارش گردید.^{۲۲}

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوسلولز باکتریایی بستر مناسب برای اضافه کردن ترکیبات ضدقارچ تجاری و طبیعی از جمله ناتاماسین است. بیشترین اثر ضدقارچی مربوط به استفاده از شکل نانوسلولز باکتریایی بود. به نظر می‌رسد علت نتایج ضدقارچی بالای اشکال لیوفیلیزه نانوسلولزهای حاوی داروی یکسان به میزان تخلخل و شکل اسفنجی فرم لیوفیلیزه برمی‌گردد که امکان جذب بیشتر دارو و در نهایت اثر قوی‌تری را نشان می‌دهد. بررسی‌های FTIR بیانگر تداخل بین ترکیبات ضدقارچ با گروه‌های عاملی نانوسلولز در هر دو شکل لیوفیلیزه و مرطوب بود. در کل نتایج مطالعه حاضر ضمن تایید اثرات مفید استفاده از نانوسلولز باکتریایی به عنوان حامل ترکیبات ضدقارچ، نشان داد شکل نانوسلولز به کارگرفته شده در الگوی آزادسازی ترکیب ضدقارچ از پلیمر به ارگان هدف اثر ویژه دارد. استفاده از نانوسلولزهای باکتریایی حاوی دارو برای درمان عفونت‌های قارچی در انسان یا حیوان و مواد غذایی برای آزادسازی بیشتر داروی بارگذاری شده توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای محمد عباسزاده برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی گرایش میکروبیولوژی (شماره ۱۰۳۳۰۵۴۸۹۷۲۰۰۱) از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه بود. بین نویسندگان تضاد منافع وجود ندارد.

References

- Moradi M, Jacek P, Farhangfar A, Guimarães JT, Forough M. The role of genetic manipulation and in situ modifications on production of bacterial nanocellulose: A review. *Int J Biol Macromol*. 2021 Jul;183:635-50. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.173.
- Bacakova L, Pajorova J, Bacakova M, Skogberg A, Kallio P, Kolarova K, et al. Versatile Application of Nanocellulose: From

داروهای فوق با توان ضدقارچی قابل قبول که با آزمایشات سنجش MIC و MFC ارزیابی شدند؛ امکان اتصال به نانوسلولز باکتریایی و بالعکس امکان آزادشدن از فیلم مذکور را دارند. بایستی در نظر داشت که نتایج آزمایشات اولیه همین تحقیق و مطالعات متعدد قبلی نشان داده که خود فیلم نانوسلولز فاقد خاصیت ضد میکروبی است.^{۱۷} و اثرات ضدقارچی مشاهده شده در این مطالعه و بعد از اتصال داروها به فیلم حاصل شده است که بیانگر آزادسازی داروهای اتصال به فیلم است. مهم‌ترین ویژگی فیلم نانوسلولز باکتریایی آن است که قطر کوچک فیبرهای این پلیمر، امکان اتصالات قوی هیدروژنی را میسر می‌سازد.^{۱۸} اغلب ویژگی‌های دارویی از جمله میزان حلالیت، تغییر ماهیت شیمیایی، پلیمریزاسیون و دی‌پلیمریزاسیون می‌تواند به باندهای هیدروژنی ترکیب بستگی داشته باشد.^{۱۹} خواص فوق شاید علت اثر قوی داروهای بارگذاری شده بر روی نانوسلولز در مقایسه با کاغذ پارچمنت را توجیه کند. آنالیز طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه انجام گرفته در این مطالعه تایید می‌کند که هر دو داروی ضدقارچ به علت داشتن گروه‌های راکتیو (گروه‌های کربوکسیلیک اسید در ساختار ناتاماسین و همچنین ناپدید شدن باندهای قرار گرفته در محدوده مربوط به گروه کربونیل مولکول آموترتیسین B) توان بالایی در ایجاد پیوندهای هیدروژنی از طریق گروه‌های هیدروکسی و کربوکسیلیک اسید با بستر نانوسلولز را دارند.^{۱۹} در یک مطالعه جدید، اثرات ضدقارچی فیلم نانوسلولز باکتریایی حاوی مایع رویی فاقد سلول دارای دیپتیدهای سیکلیک باکتری لاکتی‌کازنی باسیلوس پاراکازنی علیه برخی از قارچ‌های مهم از جمله *آسپرژیلوس نیجر*، *پنی‌سیلیوم سیترونیوم*، *پنی‌سیلیوم پولونویکوم* و *کاندیدا آلبیکنس* مورد بررسی قرار گرفت.^{۲۰} نتایج نشان داد دیپتیدهای سیکلیک با هدف قرار دادن مسیرهای RAS1-cAMP-PKA موجب مهار اشکال فیلامنتی *کاندیدا آلبیکنس* گردید. اضافه شدن مایع رویی فاقد سلول به نانوسلولز باکتریایی باعث افزایش خصوصیات ضدقارچی فیلم در استفاده از آن در مواد غذایی گردید. این عملکرد ضدقارچی به دلیل قابلیت جذب بالای مایع رویی فاقد سلول توسط نانوسلولز و گیر افتادن ترکیبات ضدقارچی در شبکه سه‌بعدی داخلی این پلیمر است. در یک مطالعه دیگر اثرات استفاده از نانوسلولز باکتریایی حاوی داروی ضدقارچ سیکلوپیروکس اولامین و عصاره گیاه *Boswellia serrata* در ناخن بررسی گردید. نتایج نشان داد رهایش سیکلوپیروکس

Industry to Skin Tissue Engineering and Wound Healing. *Nanomaterials* (Basel). 2019 Jan;9(2):164. doi: 10.3390/nano9020164.

- Martins D, Rocha C, Dourado F, Gama M. Bacterial Cellulose-Carboxymethyl Cellulose (BC:CMC) dry formulation as stabilizer and texturizing agent for surfactant-free cosmetic formulations. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2021

- May;617:126380. doi: 10.1016/j.colsurfa.2021.126380.
4. Samyn P, Meftahi A, Geravand SA, Heravi MEM, Najarzadeh H, Sabery MSK, et al. Opportunities for bacterial nanocellulose in biomedical applications: Review on biosynthesis, modification and challenges. *Int J Biol Macromol*. 2023 Mar;231:123316. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123316.
5. Walling B, Bharali P, Giridharan B, Gogoi B, Sorhie V, Alemtoshi, et al. Bacterial nanocellulose: A novel nanostructured bio-adsorbent for green remediation technology. *Acta Ecologica Sinica*. 2023 Dec;43(6):946-67. doi: 10.1016/j.chnaes.2023.02.002.
6. Buruaga-Ramiro C, Valenzuela SV, Valls C, Roncero MB, Pastor FIJ, Diaz P, et al. Bacterial cellulose matrices to develop enzymatically active paper. *Cellulose*. 2020;27:3413-26. doi: 10.1007/s10570-020-03025-9.
7. Abdollahi S, Raoufi Z. Gelatin/Persian gum/bacterial nanocellulose composite films containing Frankincense essential oil and Teucrium polium extract as a novel and bactericidal wound dressing. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022 Jun;72:103423. doi: 10.1016/j.jddst.2022.103423.
8. Rasouli Y, Moradi M, Tajik H, Molaei R, Molaei R. Fabrication of anti-Listeria film based on bacterial cellulose and Lactobacillus sakei-derived bioactive metabolites; application in meat packaging. *Food Bioscience*. 2021 Aug;42:101218. doi: 10.1016/j.fbio.2021.101218.
9. Kraśniewska K, Galus S, Gniewosz M. Biopolymers-Based Materials Containing Silver Nanoparticles as Active Packaging for Food Applications-A Review. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan;21(3):698. doi: 10.3390/ijms21030698.
10. Pruksaphon K, Intaramat A, Ratanabanangkoon K, Nosanchuk JD, Vanittanakom N, Youngchim S. Diagnostic laboratory immunology for talaromycosis (penicilliosis): review from the bench-top techniques to the point-of-care testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020 Mar;96(3):114959. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.114959.
11. Ownagh A, Tukmechi A, Adibhesam M, Ebrahimzadeh S. Comparative study on the effect of ethanol extract of propolis collected from west Azarbaijan apiaries against dermatophytes and non-dermatophytes fungi. *Studies in Medical Sciences*. 2010;21(3):206-14. [Article in Persian]
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi," Proposed Standard, NCCLS Document M38-A, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 2002.
13. Rodrigues AC, Fontão AI, Coelho A, Leal M, Soares da Silva FAG, Wan Y, et al. Response surface statistical optimization of bacterial nanocellulose fermentation in static culture using a low-cost medium. *New Biotechnology*. 2019 Mar;49:19-27. doi: 10.1016/j.nbt.2018.12.002.
14. Mohammadi R, Moradi M, Tajik H, Molaei R. Potential application of postbiotics metabolites from bioprotective culture to fabricate bacterial nanocellulose based antimicrobial packaging material. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022 Nov;220:528-36. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.108.
15. Ghorbani M, Tajik H, Moradi M, Molaei R, Alizadeh A. One-pot microbial approach to synthesize carbon dots from baker's yeast-derived compounds for the preparation of antimicrobial membrane. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2022 Jun;10(3):107525. doi: 10.1016/j.jece.2022.107525.
16. Bayazidi P, Almasi H, Asl AK. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties. *Int J Biol Macromol*. 2018 Feb;107(Pt B):2544-51. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.137.
17. Razavi R, Molaei R, Moradi M, Tajik H, Ezati P, Shfipour Yordshahi A. Biosynthesis of metallic nanoparticles using mulberry fruit (*Morus alba* L.) extract for the preparation of antimicrobial nanocellulose film. *Appl Nanosci*. 2020;10:465-76. doi: 10.1007/s13204-019-01137-8.
18. Vilela C, Moreirinha C, Domingues EM, Figueiredo FML, Almeida A, Freire CSR. Antimicrobial and Conductive Nanocellulose-Based Films for Active and Intelligent Food Packaging. *Nanomaterials (Basel)*. 2019 Jul;9(7):980. doi: 10.3390/nano9070980.
19. Ponjavic M, Stevanovic S, Nikodinovic-Runic J, Jeremic S, Cosovic VR, Maksimovic V. Bacterial nanocellulose as green support of platinum nanoparticles for effective methanol oxidation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;223:1474-84. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.278.
20. Zheng X, Nie W, Xu J, Zhang H, Liang X, Chen Z. Characterization of antifungal cyclic dipeptides of Lactocaseibacillus paracasei ZX1231 and active packaging film prepared with its cell-free supernatant and bacterial nanocellulose. *Food Res Int*. 2022 Dec;162(Pt A):112024. doi: 10.1016/j.foodres.2022.112024.
21. Bellmann T, Lubner R, Kischio L, Karl B, Pötzinger Y, Beekmann U, et al. Bacterial nanocellulose patches as a carrier for hydrating formulations to improve the topical treatment of nail diseases. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022 Nov;628:122267. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122267.
22. de Sousa MM, Clemente VMC, Santos RMDs, Oliveira M, Silva JOR, Batista LF, et al. Development and Characterization of Sustainable Antimicrobial Films Incorporated with Natamycin and Cellulose Nanocrystals for Cheese Preservation. *Polysaccharides*. 2023;4(1):53-64. doi: 10.3390/polysaccharides4010004.