

Antibacterial Effect of Nano Polyamidoamine-G7 Dendrimer on *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, and *Shigella dysenteriae* in Aqueous Solution

Mitra Gholami¹, Shahram Nazari^{2*}, Mahdi Farzadkia¹, Soudabeh Alizadeh Matboo³, Gharib Majidi⁴, Seyed Mohsen Mohseni⁵

¹Department of Environmental Health Engineering, Faculty of Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

²Developmental Center for Student Research & Technology Talent, Faculty of Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

³Department of Public Health, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

⁴Department of Environmental Health, Faculty of Health, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

⁵Department of Environmental Health, Faculty of Health, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Shahram Nazari,
Developmental Center for Student Research & Technology Talent, Faculty of Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email:
shahramnazari73@yahoo.com

Received: 15 Aug, 2016

Accepted: 18 sep, 2016

Abstract

Background and Objectives: A large number of studies has been conducted on applications of Polyamidoamine dendrimers, but their antibacterial activity has not been investigated extensively. The purpose of this study was synthesis and determining the antibacterial effect of nano polyamidoamine-G7 (NPAMAM-G7) dendrimer in the removal of *Clostridium Perfringens*, *Bacillus Subtilis*, *Salmonella typhi*, and *Shigella dysenteriae* bacteria from aqueous solution.

Methods: This experimental study was conducted in microbiology laboratory of Iran University of Medical Sciences (autumn and winter 2015). Initially, dilution of 10³CFU/ml was prepared from each strain of bacteria. Then, different concentrations of dendrimer (0.025, 0.25, 2.5, and 25µg/ml), were added to water at laboratory temperature (23-25°C). In order to determine the efficiency of dendrimers in the removal of bacteria, sampling were performed at different times (0, 10, 20, 30, 40, 50, and 60min), and were cultured on specific medium for each bacterium.

Results: In this study, the antibacterial property of dendrimer in aqueous solution had direct relationship with increasing concentration of dendrimer and contact time. The concentration of 25 µg/ml of dendrimer at contact times of 30, 50, and 60 min, 100% removed bacteria *Salmonella typhi* and *Bacillus Subtilis* and at contact time of 60 min, 100% and 98% removed *Clostridium Perfringens* and *Shigella Dysenteriae* bacteria, respectively, from aqueous solution. The concentration of 2.5µg/ml at 30, 50, and 60 min contact times, 100% removed *Bacillus Subtilis*.

Conclusion: The findings of this study revealed that Polyamidoamine-G7 dendrimers possess appropriate antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Keywords: Poly(amidoamine); *Clostridium Perfringens*; *Bacillus Subtilis*; Aqueous solution.

اثر ضدباکتریایی نانو دندریمر پلی آمید و آمین نسل هفتم سنتز شده بر روی کلوسترید یوم پرفرنژنس، باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی و شینگلا دیسانتری در محیط آبی

میترا غلامی^۱، شهرام نظری^{۲*}، مهدی فرزاد کیا^۱، سودابه علیزاده متبوع^۳، غریب مجیدی^۴، سیدمحسن محسنی^۵

چکیده

زمینه و هدف: در زمینه کاربردهای زیست شناختی نانودندریمرهای پلی آمید و آمین، مطالعات زیادی صورت گرفته، ولی فعالیت ضدباکتریایی آن به طور گسترده بررسی نشده است. هدف از انجام این تحقیق، سنتز و تعیین اثر نانودندریمر پلی آمید و آمین-G7 در حذف باکتریهای کلوسترید یوم پرفرنژنس، باسیلوس سوبتیلیس، سالمونلا تیفی و شینگلا دیسانتری از محیط آبی بود. **روش بررسی:** مطالعه به صورت تجربی در آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران (پاییز و زمستان سال ۱۳۹۴) انجام شد. ابتدا از هر سویه باکتری، رقت ۱۰^۳ واحد تشکیل دهنده کلنی بر میلی لیتر تهیه گردید. سپس غلظت های مختلفی (۰/۲۵، ۰/۱۰، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر) از دندریمر در دمای آزمایشگاه (۲۵-۲۳ درجه سانتیگراد) به نمونه آب اضافه شد. به منظور تعیین کارایی دندریمر در حذف باکتریها، در زمان های مختلف (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه)، نمونه برداری انجام گرفت و بر روی محیط کشت اختصاصی هر باکتری کشت داده شد.

یافته ها: در این مطالعه، خاصیت ضدباکتریایی دندریمر در محیط آبی با افزایش غلظت دندریمر و زمان تماس، رابطه مستقیم داشت. غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دندریمر در زمان های تماس ۳۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه، باکتری های سالمونلا تیفی و باسیلوس سوبتیلیس را ۱۰۰٪ و در زمان تماس ۶۰ دقیقه، باکتری های کلوسترید یوم پرفرنژنس و شینگلا دیسانتری را به ترتیب به صورت ۱۰۰٪ و ۹۸٪ از محیط آبی حذف کرد. غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر دندریمر در زمان های تماس ۳۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه، باسیلوس سوبتیلیس را ۱۰۰٪ از محیط آبی حذف کرد.

نتیجه گیری: یافته های این مطالعه نشان داد دندریمر پلی آمید و آمین-G7 با گروه انتهایی آمینی دارای خاصیت ضدباکتریایی بسیار مناسبی در مقابل باکتری های گرم منفی و گرم مثبت می باشد.

کلید واژه ها: پلی آمید و آمین؛ کلوسترید یوم پرفرنژنس؛ باسیلوس سوبتیلیس؛ محلول آبی.

^۱گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

^۲مرکز رشد استعدادهای پژوهشی و فناوری دانشجویی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

^۳دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

^۴گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

^۵گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

شهرام نظری، مرکز رشد استعدادهای پژوهشی و فناوری دانشجویی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
shahramnazari73@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۴

تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۷

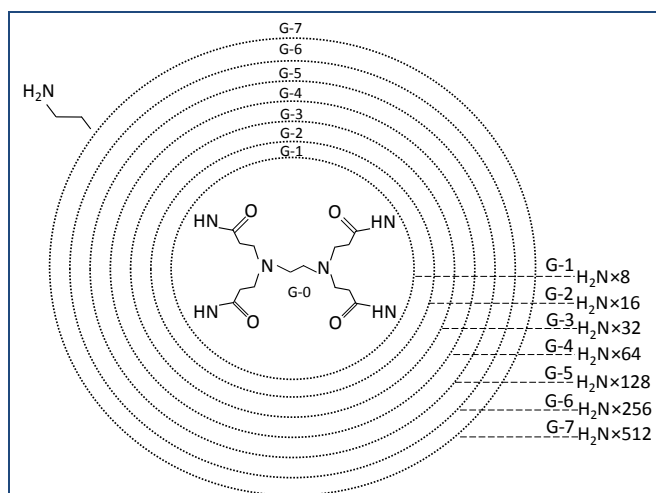
لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Gholami M, Nazari Sh, Farzadkia M, Alizadeh Matboo S, Majidi Gh, Mohseni SM. Antibacterial effect of nano Polyamidoamine-G7 dendrimer on clostridium perfringens, bacillus subtilis, salmonella typhi, and Shigella dysenteriae in aqueous solution. Qom Univ Med Sci J 2017;11(9):20-31. [Full Text in Persian]

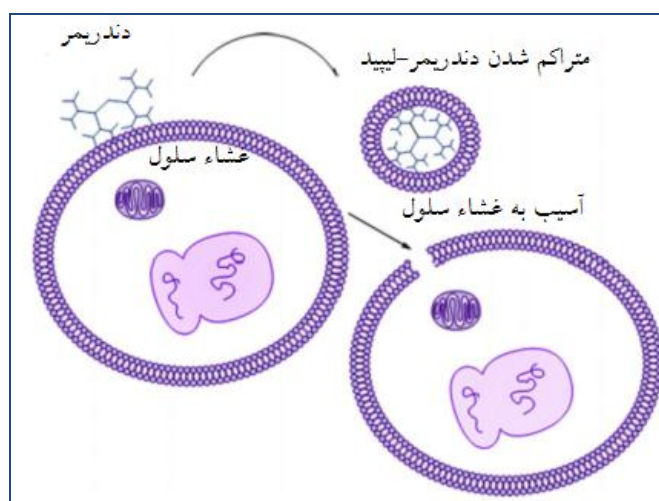
مقدمه

گندزدهای شیمیایی که به طور معمول برای تصفیه آب مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل کلر آزاد، کلر آمین و ازن می‌باشند. در طی فرآیند گندزدایی با کلر، واکنش بین کلر و ترکیبات آلی طبیعی منجر به تولید انواع مختلفی از محصولات جانبی گندزدایی از قبیل تری هالومتان‌ها، هالواستیک اسیدها، هالواستونیتریل‌ها، هالوکتون‌ها و نیتروزودی متیل آمین‌ها می‌شود. وجود محصولات جانبی گندزدایی در آب آشامیدنی، احتمال ابتلا به سرطان را در انسان افزایش می‌دهد (۱). کلر آمین نسبت به کلر، یک گندزدای ضعیف‌تر بوده و منجر به تشکیل محصولات جانبی گندزدایی سمی‌تر می‌گردد، همچنین ازن در حضور یون‌های بروماید موجب تشکیل برومات می‌شود (۲). الگوی زنده ماندن کلی فرم‌های مدفوعی و اشرشیاکلی، مشابه پاتوژن‌های باکتریایی است، به دلیل مقاومت کمتر در برابر شرایط نامساعد محیطی در مقایسه با تک‌یاخته‌ها و ویروس‌ها، همچنین امکان تکثیر در محیط، از اعتبار کمتری برخوردار است (۳، ۴). اتحادیه اروپا برای تعیین کیفیت آب آشامیدنی، کلستریدیوم پرفرئزنس را به‌عنوان یکی از پارامترهای میکروبی برای کنترل کیفیت آب مصرفی انسان در نظر گرفت (۵). کلستریدیوم پرفرئزنس از باسیل‌های گرم مثبت، بی‌هوازی و هاگ‌دار است که نسبت به فشارهای محیطی و گندزدایی کاملاً مقاوم بوده و تقریباً به‌طور دائمی در فاضلاب حضور دارد و در محیط‌های آبی تکثیر نمی‌کند (۶). به همین دلیل از کلستریدیوم پرفرئزنس به‌عنوان شاخص مناسب‌تری برای حضور داشتن یا نداشتن ویروس‌ها و کیست‌های تک‌یاخته‌ای در واحدهای تصفیه آب، همچنین برای حضور داشتن یا نداشتن اسپست‌های کریپتوسپوریدیوم پاروم پس از گندزدایی با مخلوطی از اکسیدان‌ها استفاده می‌شود (۷). بنابراین، یافتن روش‌های جایگزین که بتوانند بدون تولید محصولات جانبی گندزدایی، کارآیی بالایی در حذف میکروارگانیسم‌های شاخص از جمله

کلستریدیوم پرفرئزنس داشته باشند ضروری است. همچنین نانوذرات‌ها می‌توانند نقش مهمی در گندزدایی ایفا کنند (۲). نانوذرات علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت، خاصیت ضدباکتریایی بسیار بالایی دارد (۸). فلزات، اکسیدهای فلزی، نمک‌های فلزی، هیدروکسیدهای فلزی، نانوحامل‌های آلی اصلاح‌شده با عوامل ضد میکروبی (۹)، مواد هیبریدی و پلیمرها (۱۰)؛ نمونه‌هایی از نانوذرات با خاصیت ضد میکروبی هستند. دندریمرها پلیمرهایی منظم، پرشاخه و دارای گروه‌های سطحی بسیار فعال می‌باشند (۱۱). دندریمرها دارای نسل‌های مختلف، ابعاد و جرم مولکولی متفاوتی هستند که در طی فرآیند سنتز کنترل می‌شود. شاخه‌های یک دندریمر با داشتن ساختار منظم و یکنواخت، بر روی خواص دندریمرها بسیار تأثیرگذار است (۱۲). از مهم‌ترین واحدها در تعیین ویژگی‌ها و کاربردهای یک دندریمر، گروه‌های عاملی متصل به واحدهای منشعب است. گروه‌های سطحی که به مولکول‌های نانودندریمر متصل می‌شوند، بسیار متنوع هستند. این گروه‌ها شامل آمین، کربوکسیلات، هیدروکسیل و متیل استر می‌باشند. نانودندریمرهای پلی‌آمید و آمین با گروه انتهایی آمینی، اثر ضدباکتریایی بالایی دارند. تعداد گروه‌های انتهایی نانودندریمرهای پلی‌آمید و آمین با هسته اتیلن‌دی‌آمین با افزایش هر نسل دو برابر می‌شود (۱۳). در مطالعه حاضر، تصویری از نانودندریمر PAMAM-G7 که تعداد گروه‌های انتهایی آمینی را با افزایش هر نسل نشان می‌دهد، طراحی شد (شکل شماره ۱). فعل و انفعال الکترواستاتیکی میان بخش آنیونی سطح سلول باکتری و بخش کاتیونی نانودندریمر (گروه آمینی) باعث می‌گردد تا به سرعت با یکدیگر در تماس قرار گیرند. همچنین نفوذپذیری غشای میکروارگانیسم بسته به غلظت نانودندریمر، تغییر پیدا می‌کند و سرانجام منجر به اختلال در دیواره سلولی و مرگ باکتری می‌شود (شکل شماره ۲) (۱۴).



شکل شماره ۱: طراحی تصویر نانودندریمر پلی آمید و آمین -G7 با افزایش هر نسل.



شکل شماره ۲: شماتیکی از فعل و انفعال بین دندریمر و عشاء سلولی.

سالمونلا تیفی، شیگلا دیسانتری انجام گرفت. با استفاده از نتایج این مطالعه می توان به قابلیت کاربرد دندریمرها در صنعت تصفیه آب پرداخت و شرایط فرصت های موجود را بررسی کرد.

روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی در آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۴ انجام شد. نانودندریمرهای PAMAM با هسته اتیلن دی آمین با استفاده از متد Tomalia و روش رشد واگرا سنتز می شوند (۱۷). سنتز شامل دو واکنش متوالی تشکیل زنجیره (واکنش کامل افزودن Michael و واکنش کامل Amidation که به طور متناوب تکرار می شوند) می باشد. واکنش افزودن Michael متیل اکریلات به اتیلن دی آمین در متانول نانودندریمرهای نسل

تاکنون مطالعات متعددی در زمینه ویژگی ضدباکتریایی دندریمرها انجام شده است. مطالعه Gholami و همکاران (سال ۲۰۱۶) نشان داد دندریمر پلی آمید و آمین نسل هفتم از رشد باکتری های اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس، سالمونلا تیفی، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس جلوگیری می کند (۱۵). Felczak و همکاران نیز گزارش کردند دندریمر پلی پروپیلن ایمین نسل چهارم در برابر استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس، سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی، از فعالیت ضدباکتریایی خوبی برخوردار است (۱۶). این مطالعه با هدف سنتز و تعیین کارایی نانودندریمر پلی آمید و آمین - PAMAM-G7 (Polyamidoamine-G7) همچنین شناسایی و ارائه ترکیب شیمیایی نانودندریمر PAMAM-G7، به عنوان عامل ضدباکتریایی در حذف باکتری های کلستریدیوم

در متانول حل و به G0.5 NPAMAM اضافه شد، بعد از هم زدن به مدت ۴۸ ساعت تحت نیتروژن و حذف واکنشگرهای اضافی به وسیله تقطیر خلاء، محصولی به دست آمد که دارای ۴ گروه انتهایی آمین است (این محصول تحت عنوان G1-NPAMAM تعریف می شود). با تکرار چرخه بالا، نانودندریمرهای PAMAM نسل بالاتر سنتز شدند. برای تعیین خصوصیات و گروه‌های عاملی دندریمر PAMAM-G7، از آنالیز Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany) استفاده گردید. همچنین برای ریخت‌شناسی و تعیین اندازه دندریمر PAMAM-G7، از میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM, Philips CM 30 (Transmission Electron Microscopy) استفاده شد. ویژگی‌های شیمیایی نانودندریمر PAMAM-G7 در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: ویژگی‌های شیمیایی نانودندریمر پلی آمید و آمین-G7

تعداد گروه‌های آمین داخلی	تعداد گروه‌های انتهایی آمین	وزن مولکولی (گرم بر مول)	نسل نانو نانو دندریمر	فرمول مولکولی
۵۱۰	۵۱۲	۱۱۶۴۹۳	۷	C ₅₁₀₂ H ₁₀₂₀₈ N ₂₀₄₂ O ₁₀₂₀

برای باکتری کلستریدیوم پرفرئزئس از محیط کشت مایع تیوگلیکولات (FTG) استفاده گردید. سپس محیط به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد. در ادامه، با لوپ استریل از محیط کشت، مقداری مایع تیوگلیکولات برداشته و بر روی محیط جامد سولفیت پلی میکسین سولفادیازین (SPS Agar) کشت داده شد، سپس محیط به حالت وارونه به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد (۲۰). از استاندارد مک‌فارلند به عنوان مرجعی برای مطابقت دادن کدورت ناشی از سوسپانسیون باکتری استفاده گردید (۲۱). از آنجایی که تعداد باکتری تلقیح شده، یکی از مهم‌ترین متغیرهایی است که بر نتیجه این پژوهش اثر می‌گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد. جذب نوری کدورت ایجاد شده با محلول ۰/۵ مک‌فارلند (شامل اسیدسولفوریک و کلرور باریم) در طول موج ۶۱۰ نانومتر

نیم با گروه‌های نهایی استر (OH) (تحت عنوان G0.5) به دست می‌دهد. واکنش کامل Amidation این نانودندریمرهای با انتهای استری در حضور میزان زیاد اتیلن دی آمین در متانول نانودندریمرهای نسل کامل با انتهای آمین (منتسب به Gn) به دست می‌دهد. تکرار واکنش‌های افزودن Michael و Amidation، نانودندریمرهای نسل بالاتر بعدی را تولید می‌کند. در مطالعه حاضر، نانودندریمرهای PAMAM مطابق روش ذیل سنتز شدند (۱۸). اتیلن دی آمین (۱۰ گرم یا ۰/۱۶۶ مول) در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول و در داخل یک بالن ته گرد حل شد. متیل اکریلات (۹۴/۶ گرم یا ۰/۷۵۱ مول) در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد اضافه و سیستم تحت نیتروژن به مدت ۲۴ ساعت همزده شد. متیل اکریلات اضافی تحت خلاء و در دمای اتاق حذف گردید (یک واکنش افزودن Michael بین آمین و اکریلات، محصولی با ۴ گروه متیل استر تولید می‌کند که تحت عنوان G0.5 NPAMAM تعریف می‌شود). در ادامه، اتیلن دی آمین (۱۲۰ گرم یا ۲ مول)

سویه‌های باکتری استفاده شده در این مطالعه شامل باکتری‌های گرم مثبت کلستریدیوم پرفرئزئس ATCC 10543، باسیلوس سوبتیلیس ATCC 23857، گرم منفی سالمونلا تیفی ATCC 6539 و شیگلا دیسانتری ATCC 13313 بود که از مرکز پژوهش‌های صنعتی ایران خریداری شد. همه سوش‌های باکتریایی خریداری شده بجز کلستریدیوم پرفرئزئس در محیط کشت نوترینت براث در شرایط هوازی، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند، سپس با لوپ استریل از محیط کشت نوترینت براث مقداری برداشته و بر روی محیط‌های کشت اختصاصی، هر سویه باکتری (برای باسیلوس سوبتیلیس از محیط کشت باسیلوس آگار، برای سالمونلا تیفی و شیگلا دیسانتری از SS آگار استفاده گردید). به حالت خطی یکنواخت کشت داده شد. سپس محیط‌ها به حالت وارونه در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری شدند (۱۹).

نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس از آن تعداد کلنی‌ها شمارش گردید. به دلیل رقیق‌سازی ۱۰ برابر، تعداد کلنی‌های رشد کرده به ضریب رقت ضرب شد. تعداد کل نمونه‌ها با احتساب ۴ غلظت نانودندریمر، ۴ سوش باکتری، ۶ دوره زمان تماس و ۲ بار تکرار؛ برابر ۱۹۲ عدد به دست آمد. تمامی آزمایش‌ها براساس دستورالعمل‌های موجود در کتاب آزمایش‌های استاندارد آب و فاضلاب انجام شد.

از نرم‌افزار (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) Excel نسخه ۱۶ برای رسم نمودارها استفاده گردید.

یافته‌ها

نمودار شماره ۱، مشخصات گروه عاملی نانودندریمر PAMAM-G7 که از طریق FTIR اندازه گرفته شده را نشان می‌دهد. پیک‌های نشان داده شده در نمودار به موارد زیر اختصاص دارد: پیک در $1032/56\text{cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های C-O می‌باشد. دو پیک در $1645/91$ و $1546/25\text{cm}^{-1}$ نیز به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی C=O (آمید I) و خمیدگی N-H یا ارتعاشات کششی C-N (آمید II) ساختار داخلی نانودندریمر است. ارتعاشات انرژی پایین‌تر گروه‌های متیلن، پراکندگی و حالت‌های تغییر شکل نامتقارن H-C-H به ترتیب در پیک‌های $1462/78$ و $1365/41\text{cm}^{-1}$ دیده می‌شود. پیک‌ها در $2828/57$ و $2942/15\text{cm}^{-1}$ به کشش C-H نسبت داده می‌شوند. باندها در $3407/84$ و $3280/00\text{cm}^{-1}$ به ترتیب به حالت کششی گروه‌های آمین اولیه و آمید اختصاص دارند (۲۲).

ریخت‌شناسی و قطر نانوذرات PAMAM-G7 از طریق TEM مورد بررسی قرار گرفت (شکل شماره ۳). طبق شکل، نانوذرات PAMAM-G7 کروی شکل و میانگین اندازه قطر ذرات، ۲۰ نانومتر می‌باشد.

اسپکتروفوتومتر (مدل Hach) اندازه‌گیری شد که دارای میزان جذب نوری ۰/۱ - ۰/۰۹ بود. کلنی‌های باکتری تا حدی به آب اضافه شدند تا کدورت ایجاد شده به وسیله باکتری‌ها معادل با کدورت اندازه‌گیری شده در لوله استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند باشد. با توجه به اینکه غلظت باکتریایی ۰/۵ مک‌فارلند برابر $10^8 \times 1/5$ CFU/ml است، از رابطه ۱ برای به دست آوردن رقت باکتریایی 10^3 CFU/ml استفاده گردید.

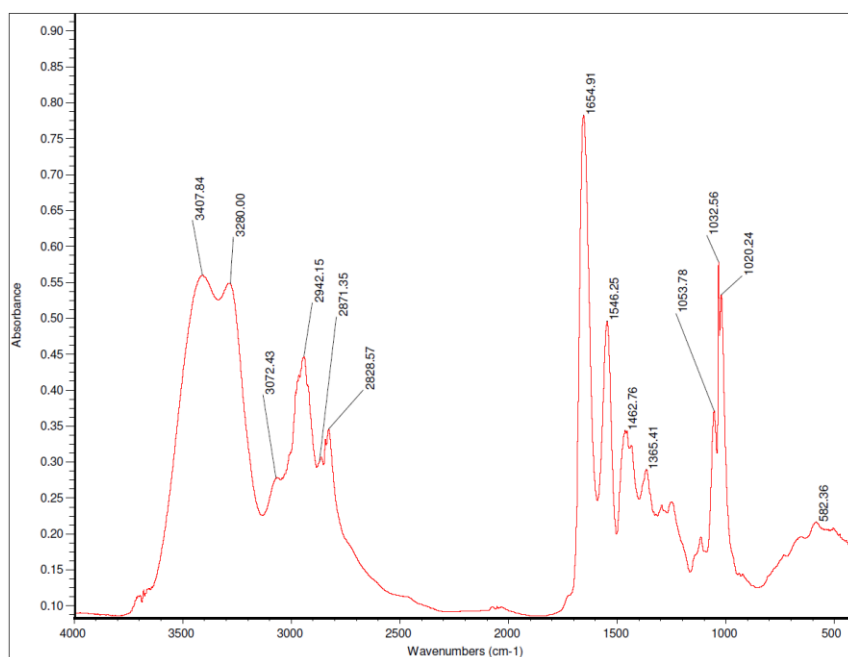
$$(1) C_1 V_1 = C_2 V_2$$

C_1 : غلظت باکتریایی معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند؛

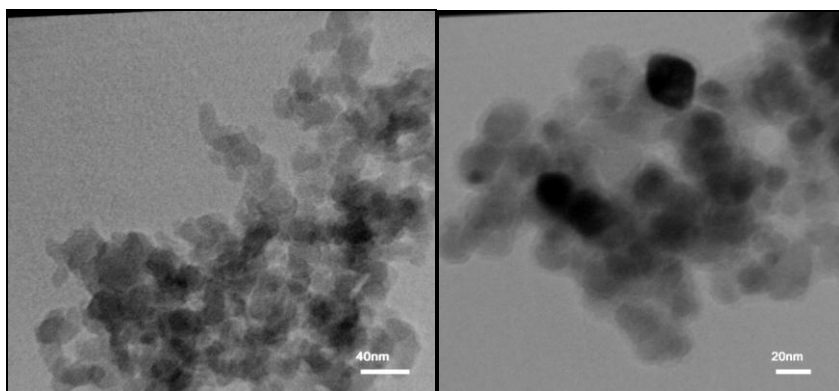
V_1 : حجم مورد نیاز برای تهیه غلظت باکتریایی برابر 10^3 CFU/ml

C_2 : غلظت باکتریایی برابر 10^3 CFU/ml؛

V_2 : حجمی برابر ۴۰ میلی‌لیتر (۴ غلظت نانودندریمر که هر غلظت به ۱۰ میلی‌لیتر آب با غلظت باکتریایی 10^3 CFU/ml انتقال یافت). حجمی برابر با ۰/۲۷ میکرولیتر از غلظت معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند برداشته و با آب مقطر استریل شده به حجم ۴۰ میلی‌لیتر رسانده شد و رقت باکتریایی برابر 10^3 CFU/ml به دست آمد. این عملیات برای هر ۴ باکتری مورد مطالعه به‌طور جداگانه انجام گرفت. برای حذف باکتری‌ها در غلظت‌های مورد نظر، از نانودندریمر (۰/۲۵، ۰/۱۰، ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با آب مقطر استریل شده به روش رقیق‌سازی، سریالی تهیه گردید، سپس ۵۰ میکرولیتر از نانودندریمر PAMAM-G7 در غلظت‌های مختلف و در شرایط کاملاً استریل، در دمای آزمایشگاه (۲۵-۲۳ درجه سانتیگراد) به نمونه آب (حاوی باکتری) اضافه شد. به‌منظور تعیین کارایی نانودندریمر در حذف باکتری‌ها (در زمان‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه)، از نمونه به حجم ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و بر روی محیط کشت اختصاصی هر باکتری قرار گرفت، در ادامه با استفاده از یک سواب استریل به‌صورت خطی یکنواخت کشت داده شد. در هر بار آزمایش یک لوله به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد که دارای باکتری و بدون نانودندریمر PAMAM-G7 بود. تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده ساخت شرکت مرک آلمان بود.



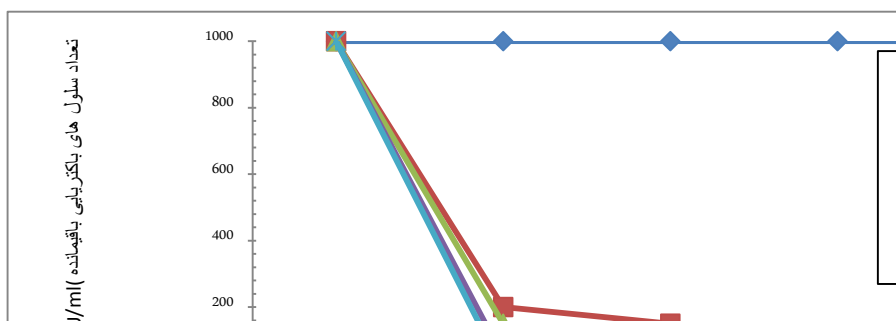
نمودار شماره ۱: طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، دندریمر پلی آمید و آمین-G7



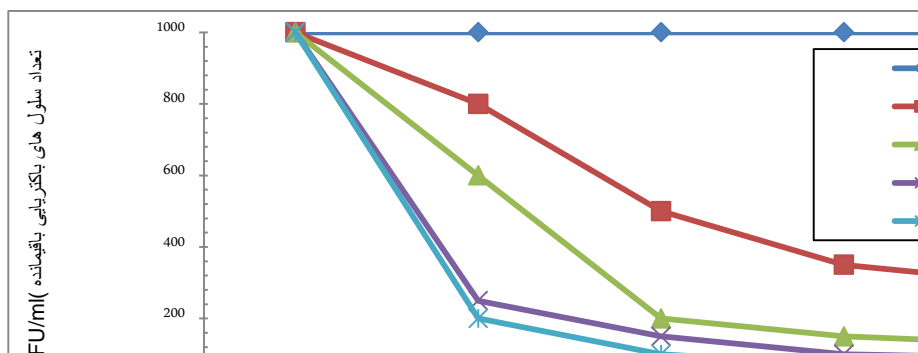
شکل شماره ۳: تصویر نانوذرات PAMAM-G7 با میکروسکوپ الکترونی عبوری.

مورد مطالعه بجز شیگلا دیسانتری (میزان حذف آن ۹۸٪ می باشد)، به صورت ۱۰۰٪ حذف شدند. در غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر نانودندریمر و در زمان های تماس ۳۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه، باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و در زمان تماس ۶۰ دقیقه، باکتری گرم منفی سالمونلا تیفی، به صورت ۱۰۰٪ حذف شدند. تأثیر غلظت های ۰/۲۵ و ۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نانودندریمر در زمان های ۵۰ و ۶۰ دقیقه در کاهش تعداد باکتری های سالمونلا تیفی بیشتر از سایر باکتری های مورد مطالعه بود. تمامی غلظت های دندریمر در زمان های مختلف باعث کاهش باکتری ها شد (نمودار شماره ۵-۱).

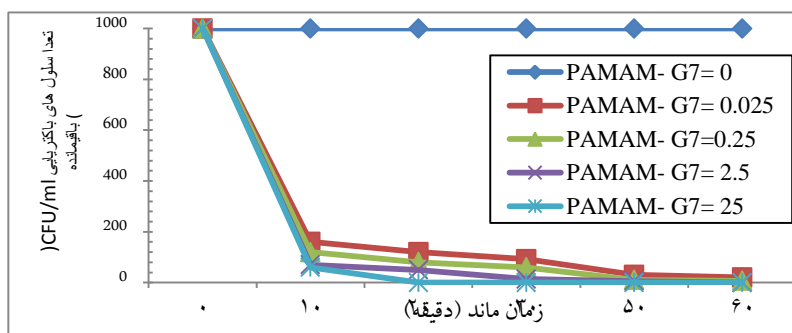
دندریمر پلی آمید و آمین-G7 در برابر هر دو گروه باکتری های گرم منفی سالمونلا تیفی، شیگلا دیسانتری، گرم مثبت کلستریدیوم پرفرنزنس و باسیلوس سوبتیلیس مؤثر بود. خاصیت ضدباکتریایی دندریمر در محیط آبی با افزایش غلظت دندریمر و زمان تماس، رابطه مستقیم داشت، غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دندریمر مورد استفاده؛ باکتری های باسیلوس سوبتیلیس و سالمونلا تیفی را در زمان های تماس ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه و باکتری کلستریدیوم پرفرنزنس را در زمان تماس ۶۰ دقیقه، به صورت ۱۰۰٪ از محیط آبی حذف کرد. به طور کلی در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر و زمان تماس ۶۰ دقیقه، همه باکتری های



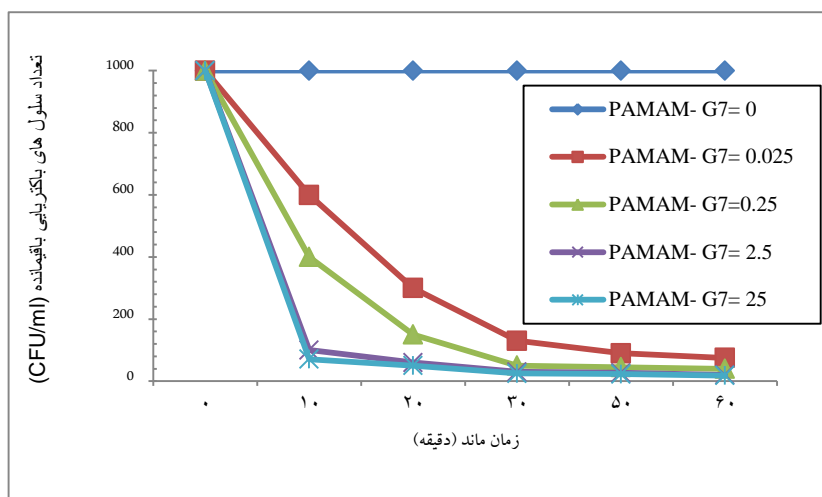
نمودار شماره ۲: تأثیر نانودندریمر PAMAM- G7 بر تغییرات جمعیت باکترهای باسیلوس سوتیلیس در آب.



نمودار شماره ۳: تأثیر نانودندریمر PAMAM- G7 بر تغییرات جمعیت باکترهای کلستریادیوم پرفرنزنس در آب.



نمودار شماره ۴: تأثیر نانودندریمر PAMAM- G7 بر تغییرات جمعیت باکترهای سالمونلا تیفی در آب.



نمودار شماره ۵: تأثیر نانودندریمر PAMAM- G7 بر تغییرات جمعیت باکترهای شیگلا دیسانتری در آب.

بحث

در جهان حدود ۸۰٪ بیماری‌های واگیر از طریق آب آلوده منتقل می‌شود. در منابع آب، آلودگی به باکتری‌های کلی‌فرم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و گونه‌های بیماری‌زای آن موجب مشکلات بهداشتی متعددی می‌گردد (۲۳). براساس اعلام سازمان بهداشت جهانی (WHO)، تعداد کلی‌فرم‌ها و باکتری‌های گوارشی شمارش شده در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر آب نوشیدنی باید صفر باشد (۲۴). در این تحقیق سعی گردید تا با استفاده از ترکیبات و روش‌های نانو، مشکلات و کمبودهای حاضر در گندزدایی آب‌های سطحی، زیرزمینی و پساب‌ها حل شود. همچنین در این پژوهش، اثر نانودندریمر PAMAM-G7 در حذف باکتری‌های گرم منفی *سالمونلا تیفی*، *شیگلا دیسانتری*، گرم مثبت *کلستریدیوم پرفرنزنس* و *باسیلوس سوبتیلیس* در محلول آبی بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد نانودندریمر PAMAM-G7، خاصیت ضدباکتریایی بسیار مناسبی در حذف باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارد و مشخص گردید تأثیر نانودندریمر PAMAM-G7 نسبت به نسل‌های پایین‌تر، بالا می‌باشد. در مطالعه‌ای که در مورد اثر ضدباکتریایی نانودندریمر پلی‌آمید و آمین-G4 به روش دیسک انتشاری انجام شد، مشخص گردید نانودندریمر پلی‌آمید و آمین-G4 بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، اثر ضدباکتریایی دارد ولی بر روی باکتری *آنتروباکتر کلوآکه* هیچ‌گونه اثر ضدباکتریایی ندارد (۲). یک مطالعه دیگر بر روی اثر ضدباکتریایی نانودندریمر پلی‌آمید و آمین-G4 نشان داد این ماده هیچ‌گونه خاصیت ضدباکتریایی بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* ندارد (۲۵). همچنین در این مطالعات نشان داده شد اثر ضدباکتریایی نانودندریمر پلی‌آمید و آمین-G4 بر روی بیشتر باکتری‌ها در غلظت‌های بالاتر اتفاق می‌افتد (۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (۲۵،۲). در مطالعه حاضر، نانودندریمر PAMAM-G7 تأثیر ضدباکتریایی بسیار مناسبی داشت و همه باکتری‌های مورد بررسی را با راندمان بالایی حذف کرد. تأثیر ضدباکتریایی بالاتر نانودندریمر PAMAM-G7 نسبت به نسل‌های پایین‌تر را می‌توان به تعداد بیشتر گروه انتهایی آمینی آنها نسبت داد. هر قدر تعداد گروه انتهایی آمینی بیشتر باشد به همان نسبت خاصیت

باکتری‌کشی نانودندریمر افزایش خواهد یافت. تعداد گروه‌های انتهایی آمینی در نانودندریمر پلی‌آمید و آمین نسل چهارم برابر ۶۴ عدد است؛ درحالی‌که این تعداد در نانودندریمر پلی‌آمید و آمین نسل هفتم برابر ۵۱۲ عدد (جدول شماره ۱) می‌باشد (۲۶). این گروه‌های عاملی بر روی سطوح سلول باکتریایی جذب شده و از طریق دیوار سلولی نفوذ می‌کنند، سپس به غشای سیتوپلاسمی متصل و آن را متلاشی می‌کنند. در این هنگام، الکترولیت‌هایی از قبیل یون‌های پتاسیم، فسفات و مواد هسته‌ای مانند DNA و RNA، از سلول آزاد می‌شوند که در نتیجه به مرگ سلول باکتریایی می‌انجامد. پس می‌توان گفت خاصیت ضد میکروبی نانودندریمرها به واسطه اختلال در غشای داخلی و خارجی باکتری‌ها که از طریق گروه‌های انتهایی آمینی صورت می‌گیرد، می‌باشد (۲). در مطالعه حاضر مشخص گردید میزان کاهش باکتری *کلستریدیوم پرفرنزنس* با افزایش زمان تماس و غلظت نانودندریمر PAMAM-G7 نسبت به سایر باکتری‌های مورد بررسی، کمتر است. مطالعات Payment و همکاران نشان داد *کلستریدیوم پرفرنزنس* در مقایسه با بسیاری از ارگانسیم‌های بیماری‌زا مانند *اشرشیاکلی*، در محیط دارای طول عمر بیشتر و در شرایط نامساعد محیطی و مواد ضد عفونی‌کننده مقاومت بیشتری دارد که موجب می‌گردد تا بتواند سال‌ها در خاک و بیوفلم زنده بماند (۲۷،۷). مطالعه Mohammadi و همکاران نیز نشان داد در ۵٪ از نمونه‌های آب واحد تولید ماکارونی، *کلستریدیوم پرفرنزنس* وجود دارد که از نظر استاندارد، آب واحدهای تولید مواد غذایی باید فاقد *کلستریدیوم پرفرنزنس* باشند (۲۸). همان‌طور که نمودارهای شماره ۵-۲ نشان می‌دهد با افزایش غلظت نانودندریمر و زمان تماس، تأثیر ضدباکتریایی نانودندریمر افزایش یافته و باعث کاهش چشمگیر باکتری‌ها می‌شود. مطالعه انجام شده در مورد اثر ضدباکتریایی نانودندریمر پلی‌پروپیلن آمین نسل دوم نشان داد غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از این ماده، تأثیری بر روی باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *پروتئوس میرابیلیس* نداشته و با افزایش غلظت تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، باکتری‌هایی از جمله *اشرشیاکلی*، *پروتئوس میرابیلیس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را به‌طور کامل حذف می‌کند (۲۹). در یک مطالعه‌ای که توسط Charles و همکاران در مورد خاصیت

افزایش می‌یابد (۳۲). در مطالعه حاضر، با افزایش زمان تماس به ۶۰ دقیقه، همه باکتری‌ها بجز شیگلا دیسانتری (میزان حذف آن در این زمان ۹۸٪ بود)، به صورت ۱۰۰٪ حذف شدند. افزایش راندمان حذف باکتری‌ها با افزایش زمان تماس، نشان‌دهنده ماندگاری بالای این ماده در محلول‌های آبی بود. برخلاف ازن، UV و دی‌اکسید کلر که زمان ماند خیلی پایینی در محلول‌های آبی دارند و بعد از چند دقیقه، باقیمانده خیلی کمی از خود به جا می‌گذارند (۳۳)، نانودندیریمر PAMAM-G7 می‌تواند زمان ماند خیلی بالایی در محلول‌های آبی داشته باشد. با توجه به اینکه آلودگی‌های ثانویه در شبکه‌های توزیع آب آشامیدنی در هر لحظه می‌تواند اتفاق بیفتد، بنابراین استفاده از این ماده به دلیل ماندگاری بالای آن، به‌عنوان گندزدا باید مورد توجه قرار گیرد. همچنین مطالعات نشان داده‌اند نانودندیریمرهای پلی آمید و آمین به دلیل شباهتی که با برخی از پروتئین‌های بدن دارند، دارای حداقل سمیت برای سلول‌های یوکاریوتیک هستند (۱۵، ۱۶).

نتیجه گیری

براساس نتایج این مطالعه، نانودندیریمر PAMAM-G7 برای حذف باکتری‌های گرم منفی سالمونلا تیفی، شیگلا دیسانتری، گرم مثبت کلستریدیوم پرفرترننس و باسیلوس سوبتیلیس بسیار مؤثر است و حتی در غلظت‌های پایین‌تر نیز اثر ضدباکتریایی مناسبی بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارد. لذا پیشنهاد می‌گردد با توجه به اینکه نانودندیریمرهای PAMAM سمیت خیلی پایین‌تری بر روی سلول‌های انسانی و حیوانی دارند، از این ماده به‌عنوان گندزدا در صنعت آب و موارد مشابه استفاده شود. با این حال استفاده از نانودندیریمر برای گندزدایی آب آشامیدنی، نیازمند مطالعات بیشتر و وسیع‌تری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایران در سال ۱۳۹۴ (با کد طرح ۲۷۱۹۳-۱۹۳-۰۵-۹۴) می‌باشد که بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری، مرکز رشد استعداد‌های پژوهشی و فناوری دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی ایران در تأمین هزینه‌های آن، تشکر و قدردانی می‌گردد.

ضدباکتریایی نانودندیریمرهای PAMAM-G3 بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد، مشخص گردید با افزایش غلظت نانودندیریمر، قطر هاله عدم رشد این باکتری‌ها افزایش می‌یابد (۳۰)، که یافته‌های مطالعه حاضر با این نتایج همخوانی داشت. در پژوهش حاضر، در زمان ۶۰ دقیقه و غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تمامی باکتری‌ها بجز شیگلا دیسانتری به صورت ۱۰۰٪ حذف شدند. همچنین در غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانودندیریمر و در زمان‌های تماس ۳۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه، باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و در زمان تماس ۶۰ دقیقه، باکتری گرم منفی سالمونلا تیفی به صورت ۱۰۰٪ حذف شدند. همچنین مطالعه حاضر نشان داد نانودندیریمر PAMAM-G7 در غلظت‌های پایین‌تر نیز (۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) خاصیت باکتری‌کشی نسبتاً مناسبی دارد که احتمالاً این می‌تواند به دلیل خاصیت درخت‌سانی، ساختار منظم و پرشاخه، فضا‌های خالی مابین شاخه‌ها، تعداد زیاد گروه‌های عاملی آمینی انتهایی و ماکرومولکول بودن نانودندیریمر PAMAM-G7 باشد. این خصوصیات سبب افزایش سطح ویژه نانودندیریمرها می‌شود و با افزایش هر نسل، سطح ویژه آن افزایش می‌یابد. بالا بودن سطح ویژه به نانودندیریمرها اجازه فعالیت در سطح بیشتری را می‌دهد و در نتیجه باکتری‌های موجود در محلول را در شاخه‌های میانی و انتهایی خود به دام انداخته و مانع از فعالیت و تولید مثل باکتری‌ها می‌شود (۲). در مطالعه حاضر با افزایش زمان تماس، کارایی نانودندیریمر در حذف باکتری‌ها به‌طور چشمگیر افزایش یافت (نمودارهای شماره ۵-۲). در یک مطالعه که در آن از فرآیند نانوذرات آهن صفر ظرفیتی برای حذف باکتری اشرشیاکلی استفاده شده بود، مشخص گردید با افزایش زمان تماس، راندمان غیرفعال‌سازی اشرشیاکلی افزایش می‌یابد (۳۱). در مطالعه‌ای که توسط IZANLOO و همکاران در مورد اثر ضدباکتریایی نانودندیریمر پلی‌پروپیلن ایمن نسل دوم بر روی برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی انجام شد، مشاهده گردید با افزایش زمان تماس تعداد باکتری‌ها در محیط آبی کاهش می‌یابد (۲۹). همچنین Nazari و همکاران با بررسی تأثیر ضدباکتریایی نانودندیریمر پلی‌آمید و آمین نسل پنجم بر روی برخی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت نشان دادند با افزایش زمان تماس، کارایی حذف باکتری‌ها به‌طور چشمگیری

References:

1. Kang S, Pinault M, Pfefferle LD, Elimelech M. Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity. *Langmuir* 2007;23(17):8670-3.
2. Izanloo H, Ahmadi Jebelli M, Nazari Sh, Safavi N, Tashauoei HR, Majidi Gh, et al. Studying the antibacterial effect of Polyamidoamine-G4 Dendrimer on some of the gram-negative and gram-positive bacteria. *Arak Med Univ J* 2014;17(90):1-10. [Full Text in Persian]
3. Bitton G. Microbial indicators of fecal contamination: Application to microbial source tracking. *Rep Sub Flori Storm Associa* 2005;719:4-6.
4. Edberg SC, Rice EW, Karlin RJ, Allen MJ. *Escherichia coli*: The best biological drinking water indicator for public health protection. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2000;88(29):106S-16S.
5. Araujo M, Sueiro RA, Gómez MJ, Garrido MJ. Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in groundwater samples: Comparison of six culture media. *J Microbiol Methods* 2004;57(2):175-80.
6. World Health Organization. Guidelines for drinkingwater quality. 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
7. Payment P, Franco E. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl Environ Microbiol* 1993;59(8):2418-24.
8. Li WR, Xie XB, Shi QS, Duan SS, Ouyang YS, Chen YB. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals* 2011;24(1):135-41.
9. Abbasi AR, Akhbari K, Morsali A. Dense coating of surface mounted CuBTC Metal-organic framework nanostructures on silk fibers, prepared by layer-by-layer method under ultrasound irradiation with antibacterial activity. *Ultrason Sonochem* 2012;19(4):846-52.
10. Yudovin-Farber I, Beyth N, Weiss EI, Domb AJ. Antibacterial effect of composite resins containing quaternary ammonium polyethyleneimine nanoparticles. *J Nanoparticle Res* 2010;12(2):591-603.
11. Balogh L, Swanson DR, Tomalia DA, Hagnauer GL, McManus AT. Dendrimer-silver complexes and nanocomposites as antimicrobial agents. *Nano Letters* 2001;1(1):18-21.
12. Khakzar BF, Malek R, Mazaheri F. The effect of dendrimer on cotton dyeability with direct dyes. *Chem Industry Chem Eng Q* 2014;20(3):379-85.
13. Hermanson GT. *Bioconjugate techniques*. 3rd ed. Elsevier; 2013. p. 351-86.
14. Strydom SJ, Rose WE, Otto DP, Liebenberg W, de Villiers MM. Poly (amidoamine) dendrimer-mediated synthesis and stabilization of silver sulfonamide nanoparticles with increased antibacterial activity. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2013;9(1):85-93. [Full Text in Persian]
15. Gholami M, Nazari S, Farzadkia M, Mohseni SM, Alizadeh Matboo S, Akbari Dourbash F, et al. Nano polyamidoamine-G7 dendrimer synthesis and assessment the antibacterial effect in vitro. *Tehran Univ Med J* 2016;74(1):25-35. [Full Text in Persian]
16. Felczak A, Wrońska N, Janaszewska A, Klajnert B, Bryszewska M, Appelhans D, et al. Antimicrobial activity of poly (propylene imine) dendrimers. *New J Chem* 2012;36(11):2215-22.
17. Esfand R, Tomalia, DA. Laboratory synthesis of poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimers. *Dendrimers and other dendritic polymers*. New York: John Wiley; 2001. p. 589-604.

18. Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, et al. Dendritic macromolecules: Synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules* 1986;19(9):2466-8.
19. Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) performance standards for antimicrobial disk diffusion susceptibility tests 19th ed. Approved standard 19th ed. Approved standard. CLSI document M100-S19; 2009.
20. Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* 1996;9(2):216-34.
21. Zapata A, Ramirez-Arcos S. A comparative study of McFarland Turbidity standards and the densimat photometer to determine bacterial cell density. *Curr Microbiol* 2015;70(6):907-9.
22. Divsar F, Ju H. Electrochemiluminescence detection of near single DNA molecules by using quantum dots–dendrimer nanocomposites for signal amplification. *Chem Commun (Camb)* 2011;47(35):9879-81.
23. Nemade PD, Kadam AM, Shankar HS. Removal of iron, arsenic and coliform bacteria from water by novel constructed soil filter system. *Ecol Eng* 2009;35(8):1152-7.
24. Odonkor ST, Ampofo JK. Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water: An overview. *Microbiol Res* 2013;4(1):5-11.
25. Vakili B, Vazirrad V, Aghababae H, Mjidi Gh, Nazari Sh, Khazae M, et al. The antimicrobial effects of Polypropylenimine-G2 and Polyamidoamine-G4 Dendrimers on Klebsiella oxytoca, Pseudomonas aeruginosa and Proteus mirabilis, in vitro experiment. *J Sabzevar Univ Med Sci* 2014;21(5):925-33. [Full Text in Persian]
26. Boas U, Christensen JB, Heegaard PM. Dendrimers: Design, synthesis and chemical properties. *J Mater Chem* 2006;16(38):3785-98.
27. Payment P, Waite M, Dufour A. Introducing parameters for the assessment of drinking water quality. *Asse Micro Safety Drin Water* 2003;2:47-79.
28. Dallal MS, Mohammadian Z, Gharibian N. The investigation to determine the pollution rate of produced Spaghetti to Clostridium perfringens in Rudehen, Jajrood region. *J Gorgan Uni Med Sci* 2001;3(1):24-9. [Full Text in Persian]
29. Izanloo H, Nazari Sh, Ahmadi Jebelli M, Alizadeh Matboo S, Hamid Reza Tashauoei, Vakili B, et al. Studying the Polypropylenimine-G2 (PPI-G2) Dendrimer performance in removal of Escherichia coli, Proteus mirabilis, Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus from Aqueous Solution. *Arak Med Univ J* 2015;18(6):8-16. [Full Text in Persian]
30. Charles S, Vasanthan N, Kwon D, Sekosan G, Ghosh S. Surface modification of poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimer as antimicrobial agents. *Tetrahedron Lett* 2012;53(49):6670-5.
31. Zarei R, Mosafere M, Soroush Barhagi MH, Khataee AR, Asghari Jafarabadi M. E. coli Inactivation efficiency of Zero-valent iron nanoparticles stabilized by carboxymethyl cellulose. *J Health* 2014;5(3):214-23. [Full Text in Persian]
32. Nazari Sh, Ashkani S, Yosefzadeh H, Aghaei F, Majidi Gh, Kamran A, et al. Application of the nano polyamidoamine –g5 (npamam-g5) dendrimer in removal of Escherichia Coli, Klebsiella Oxytoca, Pseudomonas Aeruginosa, Proteus Mirabilis and Staphylococcus Aureus from aqueous medium. *Arak Med Univ J* 2016;18(104):82-92. [Full Text in Persian]
33. Chowdhury S, Rodriguez MJ, Sadiq R. Disinfection byproducts in Canadian provinces: Associated cancer risks and medical expenses. *J Hazard Mater* 2011;187(1):574-84.