



بررسی اثر نانوذرات آهن و نقره بر تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی

غزاله کشوری، امیرحسین مؤمن، حسین وزینی

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران.

چکیده	مقاله پژوهشی اصیل
<p>مقدمه</p> <p>عفونت‌های بیمارستانی به عنوان یک مشکل عمده جهانی مطرح هستند. استفاده از نانوذرات اکسید فلزی جهت مقابله با عفونت‌های باکتریایی به عنوان روش جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند موثر باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر نانوذرات آهن و نقره بر تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی و امکان استفاده از این نانوذرات بر سطوح آزمایشگاهی می‌باشد.</p> <p>مواد و روش‌ها</p> <p>این مطالعه روی سه گونه باکتریایی جدا شده از بخش‌های مختلف بیمارستان‌های امام رضا (ع)، امام حسین (ع) و طالقانی شهر کرمانشاه انجام شد. با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و استاندارد CLSI باکتری‌های مورد نظر شناسایی شدند و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها با روش دیسک‌گذاری تعیین گردید. جهت بررسی تاثیر ضد عفونی کنندگی نانوذرات نقره و آهن بر تشکیل بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد. داده‌ها به وسیله نرم افزار SPSS و پیرایش ۲۴ تجزیه و تحلیل شد.</p> <p>یافته‌ها</p> <p>نتایج نشان داد ۹ نمونه مربوط به خون (۳۰ درصد)، ۵ نمونه از پوست (۱۶/۶۷ درصد) و ۱۶ نمونه ادرار (۵۳/۳۳ درصد) بود. بیشترین میزان مهار تشکیل بیوفیلم باکتری اشریشیاکلی، توسط نانوذرات نقره و آهن به ترتیب به میزان ۹۳ و ۶۴ درصد است. مهار تشکیل بیوفیلم در باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس توسط نانوذرات نقره و آهن به ترتیب به میزان ۸۶ و ۶۴ درصد رخ داد و نیز بیشترین میزان مهار تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا توسط نانوذرات نقره و آهن ۹۶ و ۸۸ درصد می‌باشد.</p> <p>نتیجه‌گیری</p> <p>استفاده از نانوذرات نقره و آهن توانایی بالایی برای از بین بردن باکتری‌های سودوموناس آئروجینوزا موجود در بیوفیلم دارد.</p> <p>کلیدواژه‌ها</p> <p>بیوفیلم، نانوذرات نقره، نانوذرات آهن، ایزوله بالینی</p>	<p>تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۲۵</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۳۰</p> <p>*نویسنده مسئول: امیرحسین مؤمن، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران</p> <p>تلفن: ۰۹۰۲۸۴۴۹۹۸</p> <p>پست الکترونیک: Momen@iauc.ac.ir</p>

مقدمه

ذاتی در ارگانسیم داخل بیوفیلم باشد و یا اکتسابی و در نتیجه انتقال عناصر ژنتیک به ارگانسیم‌های حساس در بیوفیلم صورت گیرد (۴). مقاومت ذاتی ارگانسیم‌ها در بیوفیلم نسبت به مواد ضد میکروبی حداقل سه دلیل دارد: (۱) عوامل ضد میکروبی باید به درون ماتریکس EPS انتشار یابند تا بتوانند با ارگانسیم‌های داخل بیوفیلم تماس یابند و آن‌ها را غیر فعال نمایند. ماتریکس EPS یا با واکنش شیمیایی با مولکول‌های ضد میکروبی و یا با محدود کردن سرعت انتقال، انتشار را به تعویق می‌اندازند (۲). ارگانسیم‌های مرتبط با بیوفیلم سرعت رشد کمتری دارند که باعث می‌شود سرعت ورود عوامل ضد میکروبی به سلول‌ها نیز کاهش یابد و بنابراین اثر دارو کند شود. (۳) محیطی که مجاور سلول‌های بیوفیلم است و آنرا احاطه می‌کند می‌تواند شرایطی را برای حفاظت بیشتر ارگانسیم‌ها فراهم کند (۵). گسترش مقاومت باکتریایی به درمان آنتی‌بیوتیکی، نیاز به توسعه مواد ضد میکروبی جدید را افزایش داده است. روش‌های مختلفی وجود دارد تا مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش دهد. نانوذرات جایگاه ویژه‌ای در پزشکی به خصوص در تشخیص بیماری‌های گوناگون دارند. آنتی‌بیوتیک‌ها، تنها تعداد بسیار کمی از عوامل مسبب بیماری‌های مختلف را از بین می‌برند، در حالی که با استفاده از نانوذرات می‌توان طیف وسیعی از باکتری‌ها را از بین برد. نقره در ابعاد بزرگتر فلزی خاصیت کمی دارد، ولی زمانی که به ابعاد کوچک‌تر در حد نانومتر تبدیل می‌شود، خاصیت میکروب‌کشی آن افزایش می‌یابد، به همین دلیل در پزشکی به بررسی اثرات آن اهمیت داده می‌شود. نانوذرات از طرق مختلف با گسترش مقاومت دارویی در میکروارگانسیم‌ها مقابله می‌کنند (۶،۷). هدف اصلی این طرح بررسی تعیین حداقل غلظت مهاری نانوذره نقره بر بیوفیلم حاصل از باکتری‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، سودوموناس آئروجینوزا و اشریشیاکلی جداشده از نمونه‌های بالینی می‌باشد.

عفونت‌های بیمارستانی از جمله مهمترین مشکلات فراگیر در تمامی بیمارستان‌های سراسر دنیا هستند و در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه، یکی از دلایل مهم مرگ و میر محسوب می‌شوند. استافیلوکوک‌ها یکی از فراوان‌ترین عوامل شایع عفونت‌های خون، چشم، گوش، بینی، قلب و عروقی هستند (۱). بیوفیلم یک مجموعه میکروبی متصل به سطح و محصور در ماتریکس است که مزایای زیادی برای رشد و بقای باکتری دارد. عفونت‌های مربوط به بیوفیلم پایدارتر از عفونت‌های ناشی از حالت پلانکتونی باکتری‌ها و همچنین، مقاوم‌تر به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. یکی از دلایلی که امروزه بیوفیلم‌ها مورد توجه دانشمندان قرار گرفته‌اند، مشکلات قابل توجهی است که بیوفیلم‌ها در پزشکی و صنعت ایجاد کرده‌اند. آن‌ها بر روی سطوح بیمارستان‌ها باقی می‌مانند و موجب آلودگی و بیماری‌های ناشی از آن می‌گردند (۲، ۳). بیوفیلم‌های تشکیل شده بر روی وسایل آزمایشگاهی می‌توانند متشکل از باکتری‌های گرم مثبت یا گرم منفی و یا مخمر باشند. باکتری‌هایی که معمولاً از این وسایل جدا می‌شوند عبارتند از باکتری‌های گرم مثبت شامل: *اِنتروکوکوس فکالیس*^۱، *استافیلوکوکوس اورئوس*^۲، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*^۳ و *استرپتوکوکوس ویریدانس*^۴. باکتری‌های گرم منفی شامل: *اشریشیاکلی*^۵، *کلبسیلا پنومونیه*^۶، *پروتئوس میرابیلیس*^۷ و *سودوموناس آئروجینوزا*^۸. این ارگانسیم‌ها ممکن است از پوست بیماران یا کارکنان آزمایشگاه، شیر آب یا دیگر منابع محیط نشأت گرفته باشند. مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، راه اصلی درمان عفونت‌های باکتریایی است. میکروارگانسیم‌های وابسته به بیوفیلم کاهش چشمگیری در حساسیت به مواد ضد میکروبی نشان می‌دهند. این حساسیت ممکن است بطور

¹ *Enterococcus faecalis*² *Staphylococcus aureus*³ *Staphylococcus epidermidis*⁴ *Streptococcus viridans*⁵ *Escherichia coli*⁶ *Klebsiella pneumoniae*⁷ *Proteus mirabilis*⁸ *Pseudomonas aeruginosa*

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه تجربی جدایه‌های باکتریایی طی شش ماه در فاصله زمانی دی ماه ۱۳۹۷ تا خرداد ۱۳۹۸ از نمونه‌های پوست، خون و ادرار بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان امام رضا (ع)، بیمارستان امام حسین (ع) و بیمارستان طالقانی شهر کرمانشاه جمع‌آوری شد و جهت انجام آزمایش‌های تاییدی به آزمایشگاه میکروب شناسی بیمارستان امام رضا (ع) منتقل گردید.

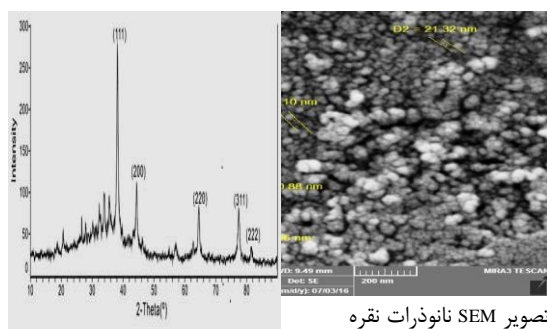
معیار ورود به مطالعه حضور به مدت ۴۸ ساعت در بخش‌های مختلف بیمارستان بود؛ لازم به ذکر است که نمونه‌های بیماران سرپایی از جامعه مورد مطالعه حذف شدند. خواص مورفولوژی و بیوشیمیایی/استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس شامل رنگ‌آمیزی گرم، ارزیابی واکنش کاتالاز، تخمیر مانیتول سالت آگار، آزمایش DNase، مقاومت به باسیتراسین و آزمایش کواگولاز مورد تایید قرار گرفت؛ سپس به منظور آزمایش تاییدی سودوموناس آئروجینوزا/تست کاتالاز و اکسیداز، تخمیر لاکتوز، تست OF، احیای نیترات، ایندول انجام گرفت و به منظور تایید سویه/شریشیاکلی از تست‌های بیوشیمیایی (EMB, TSI, Citrate, Methyred) و ایندول استفاده شد.

سپس نمونه‌ها در محیط^۱ TSB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (۸). سپس با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر گلیسرول به هر لوله، لوله‌ها تا زمان نیاز در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از پایان نمونه‌گیری، نمونه‌های فریز شده از محیط فریزر خارج و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال و پس از آن نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شدند.

تهیه نانوذرات

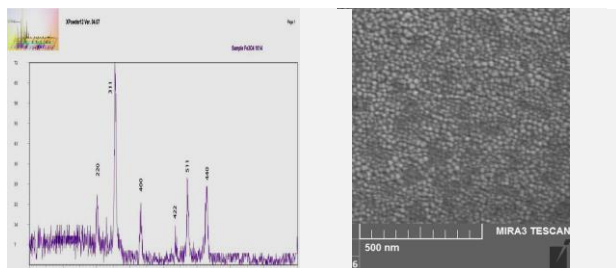
نانوذرات نقره (Ag) با قطر ۲۰ نانومتر و نانو اکسید آهن (Fe₃O₄) از شرکت آرمان جستجوگران انرژی نور (ایسپ) نانو خریداری شد. نانوذرات نقره و نانو اکسید آهن در آب دوبار تقطیر استریل به مدت ۲۰ دقیقه در حمام

اولتراسونیک (الماسونیک، آلمان) برای اینکه پراکنده شوند و تعلیق کلونیدی یکسان را تشکیل دهند سونیکیت شدند. برای تعیین ساختار، جنس و نوع نانوذرات، عکس XRD و برای تعیین اندازه و شکل ذرات، عکس SEM گرفته شد.



طیف XRD نانوذرات نقره

تصویر SEM نانوذرات نقره در مقیاس ۲۰۰ نانومتر



طیف XRD نانوذرات آهن

تصویر SEM نانوذرات آهن در مقیاس ۲۰۰ نانومتر

شکل ۱- تصاویر SEM و طیف‌های XRD نانوذرات نقره و نانو اکسید آهن

آنتی بیوگرام

ابتدا سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک فارلند (۱۰^۸ × ۱/۵) به محیط‌های کشت جامد تلقیح شد. سپس دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تتراسایکلین، استرپتومایسین، سفالوسپرین، کانامایسین و پنی‌سیلین (پادتن طب) پس از گذشت ۵ تا ۱۵ دقیقه از تلقیح، به کمک یک پنس استریل در سطح آن قرار داده شد. دیسک‌ها با فاصله ۲۲ میلی‌متر از یکدیگر و ۱۶ میلی‌متر از جداره پلیت در روی محیط قرار داده شدند. لازم به ذکر

^۱ Tryptose Soy Broth



خلوص باکتری مورد نظر ابتدا بر روی محیط آگار خون‌دار کشت داده می‌شوند و سپس در محیط نوترینت براث کشت خالص داده شدند. غلظت‌های (۱/۶، ۳/۱، ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ ppm) از نانوذره نقره و آهن تهیه شد. به هر ردیف از میکروپلیت داخل هر حفره ۸۰ میکرولیتر از باکتری با غلظت (۱۰^۵ CFU/ml) و ۸۰ میکرولیتر محیط NB استریل و ۴۰ میکرولیتر نانوذره نقره و آهن با غلظت‌های ذکر شده در هر چاهک مخلوط شد (هرمیکروپلیت یک باکتری). به یک ردیف از حفره‌های میکروپلیت باکتری اضافه نشد (بلانک) و به یک ردیف نانوذره نقره یا آهن اضافه نگردید (کنترل)، برای هر باکتری آزمایش ۳ بار انجام شد و میانگین گرفته شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حالت شیکر انکوبه شدند. حفره‌ها را خالی نموده و با ۲۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. به هر حفره ۲۰۰ میکرولیتر الکل ۹۹ درصد اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه حفره‌ها خالی و در معرض هوا خشک گردید. به هر حفره ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد اضافه و ۵ الی ۱۰ دقیقه بعد به آرامی با آب مقطر شسته شد. به هر حفره ۱۶۰ میکرولیتر اسیداستیک گلاسیال اضافه گردید. تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها در ۴۹۲ نانومتر با دستگاه الیزاریدر قرائت شد (۱۲).

بررسی اثر هم افزایی نانوذرات نقره و نانوذرات آهن بر باکتری‌های سطوح آزمایشگاهی

هم‌افزایی بین دو داروی یک برهمکنش مثبت است که وقتی دو دارو با هم ترکیب می‌شوند اثر یکدیگر را تقویت کرده و یک اثر مهاری بیشتر از مجموع اثر هر کدام از آن‌ها به تنهایی ایجاد می‌کند و باعث کاهش دوز مصرف دارو می‌شود.

این آزمایش بر اساس روش Birla و همکاران انجام گرفت (۱۳) به این صورت که باکتری‌ها ابتدا روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. ۲۰ میکرولیتر نانو نقره بر روی دیسک بلانک حاوی نانوذرات آهن اضافه شد به علاوه دیسک‌های کنترل (آغشته به ۲۰ میکرولیتر نانوذره آهن) روی پلیتی که باکتری در آن کشت شده بود قرار داده شد.

است که دیسک‌ها، یک ساعت قبل از استفاده بایستی در دمای اتاق قرار گیرند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از قرار دادن دیسک‌ها، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از گذشتن زمان انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه گیری و تفسیر آن با توجه به جدول انستیتو استاندارد بالینی و آزمایشگاهی CLSI انجام شد (۹).

تعیین حداقل غلظت مهاری نانوذرات نقره و آهن

تعیین MIC به روش (Broth Macro dilution Method) انجام گرفت. بدین منظور از محلول نانوذره نقره، نانوذرات آهن استفاده شد. ابتدا نمونه باکتری در محیط نوترینت براث کشت داده شد تا به کدورت نیم مک فارلند برسد. سپس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از کدورت نیم مک فارلند با ۴/۵ میلی‌لیتر محیط NB استریل مخلوط شد و رقت سازی انجام گردید تا ۱۰^۵ CFU/ml تهیه شود. در مرحله بعد ۱ میلی‌لیتر نانوذره نقره با ۹ میلی‌لیتر آب مخلوط شد و ۲۰ ثانیه سونیکت گردید (استوک A). ۶ لوله حاوی ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی تهیه شد و سپس ۱ میلی‌لیتر از استوک A برداشته و به لوله اول اضافه کرده و و عمل رقت سازی در گوده‌های دیگر صورت خواهد گرفت. یک لوله فاقد نانوذره نقره به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حالت شیکر انکوبه شدند. اولین لوله از غلظت پایین نانوذره نقره یا آهن که فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری باشد به عنوان غلظت MIC نقره محاسبه شد. تمام مراحل فوق ۳ بار تکرار گردید. روش ذکر شده فوق برای نانوذرات آهن نیز به طور کامل انجام گرفت (۱۰).

تعیین اثر نانوذرات نقره و آهن بر جلوگیری از تشکیل بیوفیلم

در ابتدا توانایی تشکیل بیوفیلم توسط هر کدام از ایزوله‌های بالینی و همینطور سویه استاندارد با روش اصلاح شده میکروتیتر پلیت بررسی شد (۱۱). جهت بررسی تاثیر ضدعفونی‌کنندگی نانوذرات نقره و آهن بر تشکیل بیوفیلم از پلیت ۹۶ خانه کف صاف استفاده شد. برای اطمینان از



یافته‌ها

از هر یک از باکتری‌ها ۱۰ جدایه انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. از این جدایه‌ها، ۹ نمونه مربوط به خون (۳۰ درصد)، ۵ نمونه از پوست (۱۶/۶۷ درصد) و ۱۶ نمونه ادرار (۵۳/۳۳ درصد) بود. نتایج بررسی تعداد و درصد جدایه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی در جدول (۱) و نمودار (۱) ذکر شده است. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مورد مطالعه نشان داد باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و تتراسایکلین ۱۰۰ درصد مقاوم است و کمترین مقاومت را نسبت به سفالوسپرین به میزان ۵۰ درصد بروز داد. *سودوموناس آئروجینوزا* نسبت به پنی‌سیلین ۱۰۰ درصد مقاوم و کمترین مقاومت را نسبت به استرپتومایسین به میزان ۶۰ درصد داشت. میزان مقاومت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ۹۰ درصد بود، کمترین مقاومت را در برابر استرپتومایسین ۳۰ درصد نشان داد.

پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری و ثبت شد برای هر سوش باکتری از غلظت از نانو نقره که به عنوان MIC بیان شده بود استفاده گردید. در این مطالعه، رشد باکتری در حضور همزمان نانوذره نقره و نانوذرات آهن با استفاده از روش فرمول Birla و همکاران بررسی شد و به طور خلاصه برای اندازه‌گیری اثر هم افزایی نانوذرات مورد مطالعه از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{Fold increase area: } (b^2 - a^2)/a^2$$

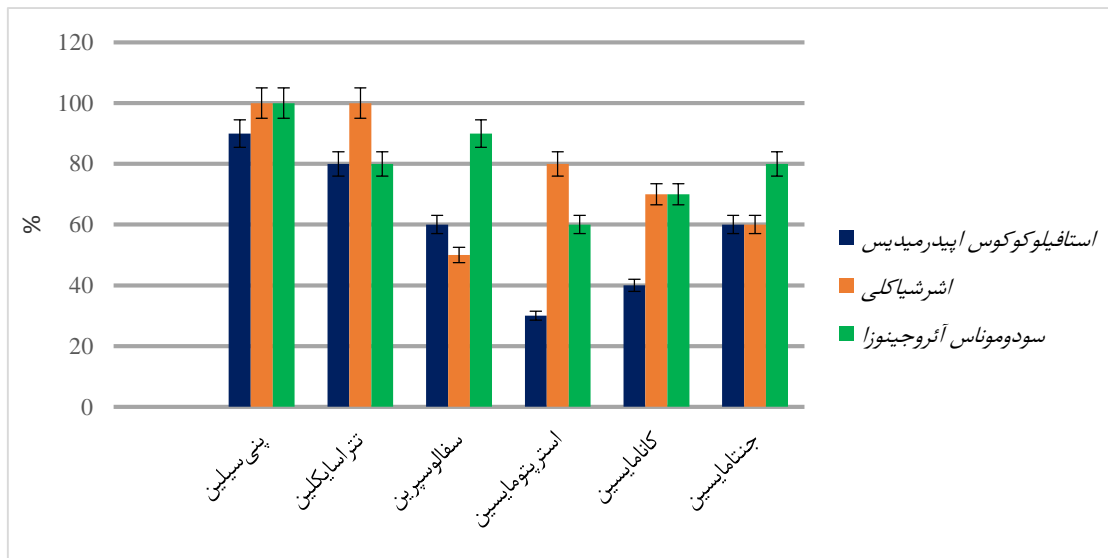
a: هاله نانوذره آهن به تنهایی

b: هاله نانوذره نقره و نانوذرات آهن

به منظور بررسی آماری نتایج، داده‌ها به کمک نرم افزار SPSS و با تست pearson chi-square بررسی شدند

جدول ۱. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مختلف

نتایج آنتی بیوگرام آنتی بیوتیک	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (درصد)	اشریشیا کلی (درصد)	سودوموناس آئروجینوزا (درصد)
پنی‌سیلین	۹ (۹۰٪)	۱۰ (۱۰۰٪)	۱۰ (۱۰۰٪)
تتراسایکلین	۸ (۸۰٪)	۱۰ (۱۰۰٪)	۸ (۸۰٪)
سفالوسپرین	۶ (۶۰٪)	۵ (۵۰٪)	۹ (۹۰٪)
استرپتومایسین	۳ (۳۰٪)	۸ (۸۰٪)	۶ (۶۰٪)
کانامایسین	۴ (۴۰٪)	۷ (۷۰٪)	۷ (۷۰٪)
جنتامایسین	۶ (۶۰٪)	۶ (۶۰٪)	۸ (۸۰٪)



نمودار ۱- نتایج درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های مختلف

انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید (۱۴). نتایج به صورت میانگین در جدول ۲ آورده شده است.

MIC که برابر است با پایین‌ترین غلظت ضد عفونی کننده که مانع از رشد قابل مشاهده باکتری می‌شود پس از ۲۴ ساعت

جدول ۲- نتایج میانگین تعیین MIC نانوذرات نقره و آهن بر ۳ باکتری مورد آزمایش

سودوموناس آئزروچینوزا	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	اشریشیاکلی	باکتری
۱۲/۵ ppm	۶/۲۵ ppm	۳/۱ ppm	نانوذره نقره
۱۲/۵ ppm	۱۲/۵ ppm	۳/۱ ppm	نانوذرات آهن

این روش برای اندازه گیری اثر نانوذرات از فرمول زیر استفاده شد (نتایج در جدول ۳ ذکر شده است).

در این مطالعه پس از تعیین MIC، درصد جلوگیری از تشکیل بیوفیلم در حضور نانوذره نقره و نانوذرات آهن با روش Guo-xian wei (۱۵) بررسی شد. به طور خلاصه در

$$100 \times \frac{A595 \text{ of the test} - A595 \text{ of non-treated control}}{A595 \text{ of non-treated control}}$$

A595 of the test: باکتری + (نانوذره نقره یا نانوذرات آهن)
A595 of non-treated control: باکتری

بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به خوبی نشان داد نانوذرات کلونیدی نقره می‌توانند مانع تشکیل بیوفیلم این باکتری شوند. مهار تشکیل بیوفیلم در باکتری استاف/ اپیدرمیدیس توسط

براساس اطلاعات جدول ۳ بیشترین میزان مهار تشکیل بیوفیلم باکتری اشریشیاکلی، توسط نانوذره نقره و نانوذرات آهن به ترتیب به میزان ۹۳ درصد و ۶۴ درصد است. در پژوهش حاضر اثر نانوذرات نقره در جلوگیری از تشکیل



تشکیل بیوفیلم توسط نانوذرات نقره نسبت به نانوذرات آهن بیشتر است و همچنین تاثیر نانوذرات بر باکتری گرم منفی (*اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروجینوزا*) بیشتر از گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*) است.

نانوذرات نقره و آهن به ترتیب به میزان ۸۶ و ۶۴ درصد رخ داد و نیز بیشترین میزان مهار تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروجینوزا* توسط نانوذرات نقره و آهن ۹۶ و ۸۸ درصد می باشد. همانطور که قابل مشاهده است تاثیر بازدارندگی

جدول ۳- درصد جلوگیری نانوذرات نقره و آهن از تشکیل بیوفیلم بر ۳ باکتری مورد آزمایش

۱/۶ ppm	۳/۱ ppm	۶/۲۵ ppm	غلظت نانوذره نقره
% ۸۴	% ۸۸	% ۹۳	<i>اشرشیاکلی</i>
۳/۱ ppm	۶/۲۵ ppm	۱۲/۵ ppm	غلظت نانوذره نقره
% ۸۲	% ۸۶	% ۸۶	<i>استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس</i>
۶/۲۵ ppm	۱۲/۵ ppm	۲۵ ppm	غلظت نانوذره نقره
% ۹۲	% ۹۴	% ۹۶	<i>سودوموناس آئروجینوزا</i>
۱/۶ ppm	۳/۱ ppm	۶/۲۵ ppm	غلظت نانوذرات آهن
% ۷۰	% ۷۳	% ۷۶	<i>اشرشیاکلی</i>
۶/۲۵ ppm	۱۲/۵ ppm	۲۵ ppm	غلظت نانوذرات آهن
% ۶۰	% ۶۲	% ۶۴	<i>استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس</i>
۶/۲۵ ppm	۱۲/۵ ppm	۲۵ ppm	غلظت نانوذرات آهن
% ۸۴	% ۸۶	% ۸۸	<i>سودوموناس آئروجینوزا</i>

جدول ۴. نتایج هم افزایی نانوذرات نقره و نانو ذرات آهن بر

باکتری های سطوح آزمایشگاهی

باکتری	<i>سودوموناس آئروجینوزا</i>	<i>اشرشیاکلی</i>	<i>استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس</i>
هاله عدم رشد	۲۷*	۱۷	۲۰
نانوذره آهن	۳۴	۲۲	۲۲
نانوذره آهن + نانو ذره نقره	% ۵۸	% ۶۷	% ۲۱
هم افزایی	۲۷*	۱۷	۲۰

* بر حسب میلی متر

بیشترین تاثیر هم افزایی نانوذرات نقره و آهن مورد مطالعه بر باکتری های سطوح استیل آزمایشگاهی به میزان ۶۷ درصد بر باکتری *اشرشیاکلی* بود. همچنین تاثیر هم افزایی این دو نانوذره بر باکتری های *سودوموناس آئروجینوزا* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به ترتیب ۵۸ و ۲۱ درصد بود. تاثیر همزمان دو نانوذره موجب افزایش قطر هاله عدم رشد باکتری نسبت به استفاده از دیسک آغشته به نانوذره آهن تنها (کنترل) بود.

تاثیر نانوذرات بر باکتری گرم منفی (*اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروجینوزا*) بیشتر از گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*) است. همسو با نتایج حاصله از مطالعه حاضر، نتایج مطالعه مارتینز و همکاران نیز نشان داد که نانوذرات نقره با اندازه‌ی ۲۰-۳۰ نانومتر فعالیت ضدبیوفیلمی بهتری نسبت به میکروارگانسیم‌های گرم منفی در مقایسه با میکروارگانسیم‌های گرم مثبت دارد (۱۸).

کیم و همکاران نشان دادند که باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* در مقایسه با باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت بیشتری نسبت به نانوذره نقره نشان داده که به علت اختلاف در ساختار دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی و مثبت می‌باشد. اثر باکتری‌کشی نانوذرات به غلظت نانوذرات و غلظت اولیه باکتری وابسته است (۱۹). در این مطالعه نیز تاثیر بازدارندگی تشکیل بیوفیلم توسط نانوذرات نقره نسبت به نانوذرات آهن بیشتر است و همچنین تاثیر نانوذرات بر باکتری گرم منفی (*اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروجینوزا*) بیشتر از گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*) است.

باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی در مقابل نانوذرات فلزی، مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند که این می‌تواند به ساختار دیواره سلولی ارتباط داشته باشد (۲۰).

درحالی که در مطالعه کاریشوالا^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که نانوذرات نقره علیه *سودوموناس آئروجینوزا* و *استاف اپیدرمیدیس* فعالیت ضدبیوفیلمی دارند. نتایج حاصله نشان داد که نانوذرات نقره با متوسط اندازه ۵۰ nm در غلظت ۱۰۰ nM می‌توانند تشکیل بیوفیلم را تقریباً به یک میزان در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مهار کنند (۲۱). از آنجایی که در این آزمایشات از روش‌های متفاوتی برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شد، نمی‌توان نتایج را با هم مقایسه کرد. مکانیسم سمیت نانوذرات به ترکیب شیمیایی، تغییرات سطح، خواص ذاتی نانوذرات و نوع گونه‌ی باکتریایی



شکل ۲- آثار ضد باکتریایی هم افزایی نانوذره آهن+نانوذره نقره بر باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (۴: کنترل)

بحث

یکی از چالش‌های بسیار مهم و حیاتی برای بهداشت و سلامت عمومی، گسترش باکتری‌های مقاوم به داروهای چندگانه می‌باشد. از بین بردن باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به داروهای گران قیمت و گوناگون نیاز دارد که ممکن است عوارض جانبی متعددی در برداشته باشند. در نتیجه، درمان‌ها پرهزینه بوده و به زمان بیشتری نیاز دارد. نانوذرات می‌توانند استراتژی‌های جدیدی برای مقابله با باکتری‌های مقاوم به داروهای چندگانه ارائه دهند (۱۶). اثر نانوذرات بر باکتری‌های خاص یا بافت‌های آلوده، چشم انداز موثر و کارایی را در درمان عفونت ارائه می‌کند زیرا این پدیده عوارض جانبی را به حداقل می‌رساند و فعالیت عوامل ضدباکتریایی را افزایش می‌دهد (۱۷).

در این مطالعه بیشترین میزان مهار تشکیل بیوفیلم باکتری *اشریشیاکلی*، توسط نانوذره نقره با اندازه ۲۰ نانومتر و نانوذرات آهن با اندازه بزرگتر از ۵۰ نانومتر به ترتیب به میزان ۹۳ درصد و ۶۴ درصد است. مهار تشکیل بیوفیلم در باکتری *استاف اپیدرمیدیس* توسط نانوذرات نقره و آهن به ترتیب به میزان ۸۶ و ۶۴ درصد رخ داد و نیز بیشترین میزان مهار تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروجینوزا* توسط نانوذرات نقره و آهن ۹۶ و ۸۸ درصد می‌باشد. همانطور که قابل مشاهده است تاثیر بازدارندگی تشکیل بیوفیلم توسط نانوذرات نقره نسبت به نانوذرات آهن بیشتر است و همچنین

^۱ Kalishwaralal



رشته میکروبیولوژی را هدایت کنند و یا نرم افزارهای استاندارد برای روش‌های آماری استفاده شود.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد:

نانوذرات فلزی دارای خواص آنتی باکتریال بسیار موثری هستند.

نتایج به دست آمده از تعیین خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره و آهن نشان داد که بین غلظت نانوذرات و درصد حذف باکتری ارتباط مستقیم وجود دارد، این نتایج از لحاظ آماری معنی دار می‌باشد ($P < 0.05$).

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

بستگی دارد. نتایج متناقض از اثرات نانوذرات مختلف نشان می‌دهد که مکانیسم سمیت نانوذرات بسیار پیچیده است و با فاکتورهای مختلفی از جمله خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات مرتبط است (۲۲).

سیلوا و همکاران خواص ضدباکتریایی نانوذرات آهن صفرظرفیتی را علیه باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و گرم منفی اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروجینوزا، سالمونلا تیفیموریوم و یرسینیا پستیس مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دادند که نانوذره آهن عملکرد ضدباکتریایی بالقوه‌ای علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشتند (۲۳). در این مطالعه نیز تاثیر مثبت نانوذرات آهن بر مهار تشکیل بیوفیلم باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیس و گرم منفی اشریشیاکلی و سودوموناس آئروجینوزا نشان داده شد.

در مطالعه بارزان و همکاران که باکتری گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا را با نانوذرات اکسید آهن، هماتیت ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) با اندازه‌های ۲، ۴۳، ۸۵ و ۵۴۰ نانومتر تیمار کردند. نتایج حاصل از این مطالعه گویای این مطلب است که نانوذرات اکسید آهن رشد باکتری را با یک رابطه معکوس بین رشد و اندازه ذرات افزایش می‌دهد به طوری که کوچکترین نانوذره بیشترین تاثیر را بر رشد باکتری و توانایی تشکیل بیوفیلم دارند. به این علت می‌تواند باشد که با کاهش اندازه قابلیت انحلال نانوذره آهن افزایش یافته که به نوبه خود موجب افزایش در مقادیر آهن قابل جذب برای رشد باکتری می‌گردد (۲۴). در این مطالعه نیز بیشترین مهار تشکیل بیوفیلم در غلظت ۶/۲۵ ppm حاصل شد. از کاستی‌های این پژوهش علاوه بر خطای انسانی در مراحل دیسک‌گذاری آنتی‌بیوگرام و آلوده شدن محیط کشت، می‌توان به نبود امکانات کافی و محدودیت‌های دسترسی به بیماران و نیز عدم همکاری بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی اشاره کرد. بنابراین امکان اینکه تعداد نمونه‌های بیشتری گرفته شود، وجود نداشت و همچنین بهتر است در بیمارستان اشخاصی باشند که دانشجویان

References

1. Cargill JS, Upton M. Low concentration of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Pathol* 2010; 62(12): 1112-6.
2. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology* . 2008; 322 : 207-228.
3. Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *J Future Microb* 2010; 5(6): 917-33.
4. Costerton WJ, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. *MicrobiolBiofilms*. Annual Review of Microbiology. 1995; 49: 711-745.
5. Eftekhar F, Mirmohamadi Z. Evaluation of biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates from nosocomial infections and skin of healthy volunteers. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2009, 1.10: 438-441.
6. Chu CS, McManus AT, Pruitt BA, et al. Therapeutic effects of silver nylon dressing with weak direct current on *Pseudomonas aeruginosa* infected burn wounds. *J Trauma*. 1988; 28: 1488–1492.
7. Law N, Ansari S, Livens FR, et al. The formation of nano-scale elemental silver particles via enzymatic reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 74: 7090–7093.
8. Ahmadi M, Pourbabaee AA, Doudi M. The isolation and identification of biofilm-forming bacteria in a membrane bioreactor and its removal by silver nanoparticles. *Feyz* 2012; 16(5): 433-8.
9. Abdoli Oskoi Sh, Ahangarzade M. Detrmination of antibiotic resistant patterns and minimal inhibition concentration of vancomycin in *S.aureus* coagulase negative isolated from clinical samples in children in Tabriz Spring 1392. *J Ardebil uni med sci*; 2013. 1(13). (Persian).
10. Marambio-Jones C, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res*. 2010; 12(5): 1531-51.
11. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, et al. Enterococcal surface protein:Esp Enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*. 2004; 72: 6032-6039.
12. Shakeri S, Kermanshahi R. Moghaddam M, et al.. Assessment of biofilm cell removal and killing and biocide efficacy using the microtiter plate test. *Biofouling*. 2007; 23: 79 – 86.
13. Birla S, Tiwari V, Gade AK, et al. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol*. 2009; 48: 173-9.
14. Marambio-Jones C, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res*. 2010; 12(5): 1531-51.
15. Guo-Xian Wei, Alexander N, Campagna and Libuse A. Bobek Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006; 57: 1100-1109.
16. Lee HW, Kah YM, Kim J, et al. Capacity of multi – drug resistant clinical isolates of *Acinetobacterbaumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clinical Microbiology Infectious*. 2008; 14: 49-54.
17. Southey Pilling CJ, Davies DG, Sauer K. Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Bacteriology*. 2005; 187: 8114-8126.
18. Fidel Martinez-Gutierrez, Laura Boggle, Alessandra Agostino. 2013, Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Journal of Bio fouling*, Vol. 29, No. 6, 651–660.
19. Kim JS, Kuk E, Yu KN, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2007; 3(1): 95-101.
20. Beranová J, Seydlová G, Kozak H, Benada O, Fišer R, Artemenko A, Konopásek I, Kromka A. Sensitivity of bacteria to diamond nanoparticles of various size differs in gram-positive and gram-negative cells. *FEMS Microbiol Lett* 2014; 351 (2):179-86.
21. Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandean SR, Deepak V. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of " Colloids Surfaces B :Bio interfaces* , 2010. ,79:340–344.
22. Hajipour J., Katharina M, Mahmoudi M. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30 (10):499-511. [Persian].



23. Silva, A. C., Oliveira, T. R., Mamani, J. B., Malheiros, S. M., Malavolta, L., Pavon, L. F., ... & Gamarra, L. F. (2011). Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. *Int J Nanomedicine*, 6(3), 591-603.
24. Barzan, E., Mehrabian, S., Irian, S. (2014). Antimicrobial and Genotoxicity Effects of Zero-valent Iron Nanoparticles. *Jundishapur J Microbiol*, 7(5), 5pp



The Effect of Iron and Silver Nanoparticles on Biofilm Formation in *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Clinical Specimens

Ghazaleh Keshvari, AmirHossein Momen, Hossein Vazini

Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

Original Article

Received: 16 Dec 2019

Accepted: 19 May 2020

***Corresponding Author:**

Momn AmirHossein,
Department of
Microbiology, School of
Basic Sciences, Hamedan
Branch, Islamic Azad
University, Hamedan,
TEL: 0902844998
Email:
Momen@iauc.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction

Nosocomial infections are a major global problem. Using metallic oxide nanoparticles to counter bacterial infections as an alternative to antibiotics can be effective. The aim of this study was to evaluate the effect of iron and silver nanoparticles on biofilm formation in bacteria isolated from clinical specimens and the possibility of using these nanoparticles on laboratory surfaces.

Materials and Methods

This study was performed on three bacterial strains isolated from different wards of Imam Reza, Imam Hossein, and Taleghani hospitals in Kermanshah. The biochemical tests of the bacteria were identified and their antibiotic resistance was determined by the disk method. The microtiter plate method was used to investigate the disinfecting effect of silver and iron nanoparticles on biofilm formation. Data were analyzed by SPSS software.

Results

Results showed 9 blood samples (30%), 5 skin samples (16.67%), and 16 urine samples (53.33%). The highest rate of inhibition of *Escherichia coli* biofilm formation by silver and iron nanoparticles was 93% and 64%, respectively. The inhibition of biofilm formation in *S. epidermidis* by silver and iron nanoparticles was 86 and 64%, respectively, and the highest inhibition of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* by silver and iron nanoparticles was 96 and 88%, respectively.

Conclusion

The use of silver and iron nanoparticles has a high potential to kill the bacteria in the biofilm of *P. aeruginosa*.

Keywords

Biofilm, Silver nanoparticles, Iron nanoparticles, Clinical isolate

► **Please cite this article as:** Keshvari G, Momen AH, Vazini H. The Effect of Iron and Silver Nanoparticles on Biofilm Formation in *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Clinical Specimens. *J Neyshabur Univ Med Sci* 2020;8(3):96-107.