

## اثر نانوذرات نقره با و بدون ایمی پنم بر مهار تشکیل بیوفیلم جدایه های بالینی *Pseudomonas aeruginosa*

خدیجه رضانی علی اکبری<sup>۱</sup>، احیا عبدی عالی<sup>۲\*</sup>، مهوش سیفعلی<sup>۳</sup>

۱- گروه میکروبیولوژی، کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران.  
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران  
۳- گروه علوم گیاهی، استادیار دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران.

\*نشانی برای مکاتبه: تلفن: ۰۲۱۸۸۰۴۴۰۴۰ (۲۸۶۸)، [abdialya@alzahra.ac.ir](mailto:abdialya@alzahra.ac.ir)  
پذیرش برای چاپ: اسفند نود و چهار دریافت مقاله: دی نود و چهار

### چکیده

**سابقه و هدف:** *Pseudomonas aeruginosa* یکی از مهم ترین میکروارگانیسم های فرصت طلب و تشکیل دهنده بیوفیلم است. ساختار بیوفیلمی آن، سدی موثر در برابر نفوذ مواد ضد میکروبی ایجاد کرده و در مقایسه با سلول های پلانکتونی، مقاومت دارویی بیوفیلم *P. aeruginosa* را ۱۰۰۰ برابر افزایش می دهد. اما نانومواد به دلیل عدم ایجاد مقاومت، گزینه های مناسبی برای مقابله با تشکیل بیوفیلم *P. aeruginosa* هستند. مطالعه حاضر به منظور تعیین اثر ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره با و بدون ایمی پنم بر *P. aeruginosa* انجام شد.

**روش کار:** ۶۰ جدایه *P. aeruginosa* از بیمارستان های سوختگی شهید مطهری، مهر و بیمارستان قلب و عروق شهید رجایی تهران جمع آوری شد. ۲۰ جدایه تولید کننده قوی بیوفیلم به منظور بررسی اثر نانوذرات نقره انتخاب گردید. فعالیت ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره با تکنیک میکروداپلوشن در پلیت میکروتیتردر ۲۰ جدایه مورد مطالعه قرار گرفت سپس اثرات توام نانوذرات نقره و ایمی پنم با استفاده از تکنیک رقیق سازی Checkerboard در ۱۰ جدایه تولید کننده قوی بیوفیلم بررسی شد. یافته ها: کاهش توده سلولی بیوفیلم در حضور رقت های ۵۰-۱۰۰/۴ از نانوذرات نقره در ۲۰ جدایه متفاوت بود و ۱۴ جدایه کاهش ۹۵-۴ درصدی را نشان داد. ترکیب نانوذرات نقره و ایمی پنم در اکثر جدایه، روابط هم افزایی ( $\sum FIC \leq 0.5$ ) را بر مهار تشکیل بیوفیلم نشان داد.

**نتیجه گیری:** این مطالعه پیشنهاد می کند که نانوذرات نقره می توانند کاندیدای مناسبی برای مهار تشکیل بیوفیلم *P. aeruginosa* باشند. علاوه بر این، نانوذرات نقره در ترکیب با آنتی بیوتیک هایی از جمله ایمی پنم می توانند میزان تشکیل بیوفیلم *P. aeruginosa* را بر سطوح به صورت چشمگیری کاهش دهند.

**واژگان کلیدی:** *Pseudomonas aeruginosa* - بیوفیلم - نانوذرات نقره - ایمی پنم

### مقدمه

بیشتری از باکتری های پلانکتونی دارند. مکانیسم های مقاومت در بیوفیلم با مکانیسم های مقاومت به ترکیبات ضد میکروبی در سلول های پلانکتونی متفاوت است. در بیوفیلم *P. aeruginosa*، گسترش مقاومت ضد میکروبی نقش مهمی در عفونت های دستگاه ادراری و تنفسی دارد (۱).

چندین فرضیه شامل: ۱- نفوذ محدود مواد ضد میکروبی به بیوفیلم ۲- تشکیل گرادیان های فیزیولوژیک در بیوفیلم ۳-

بیوفیلم، ماتریکسی از مواد پلیمریک و غیر پلی مریک است که باکتری ها در آن محصور شده اند. در *P. aeruginosa* این ماتریکس از آگزوپلی ساکاریدها، پروتئین ها و DNA خارج سلولی تشکیل شده است (۱).

یکی از مهم ترین ویژگی های بیوفیلم باکتریایی، مقاومت به ترکیبات ضد میکروبی و سیستم ایمنی میزبان است به طوری که باکتری های ساکن در بیوفیلم، ۱۰۰۰ برابر مقاومت

ضدمیکروبی موثرتری هستند که می توانند در غلظت بالا به محل عفونت برسند و در نتیجه به میکروارگانیسم ها فرصتی برای گسترش مقاومت ندهند. ۳- ترکیب چندگانه آنتی بیوتیک ها در نانوذرات مهندسی شده می شود (۷).

تاکنون اثر نانوذرات نقره به تنهایی بر تشکیل بیوفیلیم *P. aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*، *E. coli aeruginosa*، *Staphylococci*، *Candida albicans* و *Enterococcus* برسوندهای پلاستیکی مطالعه شده است. نانوذرات نقره در ترکیب با آنتی بیوتیک هایی مانند پنی سیلین G، آموکسی سیلین، اریترومایسین، کلیندامایسین و ونکومایسین علیه *S. aureus*، *E. coli* بررسی شده اند و حضور نانوذرات نقره فعالیت آنتی بیوتیک ها را در هر دو باکتری افزایش داده است (۸). لذا در این تحقیق اثرات مهاری نانوذرات نقره به تنهایی و توأم با آنتی بیوتیک ایمی پنم بر تشکیل بیوفیلیم جدایه های *P. aeruginosa* بررسی شد.

#### روش کار

بیست نمونه ی بالینی از بیمارستان قلب و عروق شهید رجایی تهران در سال ۹۲ در اختیار قرار گرفت و ۴۰ نمونه مربوط به بیمارستان سوختگی شهید مطهری و مهر تهران بود که در سال ۱۳۸۹ جمع آوری شدند. جدایه ها بعد از تعیین هویت، در محیط skim milk حاوی ۱۵٪ گلیسرول در فریزر  $70^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. سنجش کمی بیوفیلیم در ۶۰ جدایه با روش پلیت میکروتیتر استاندارد انجام شد و از رنگ کریستال و بوله ی ۱/۰٪ برای رنگ آمیزی بیوفیلیم تشکیل شده بر چاهک ها استفاده شد. بعد از رنگ بری با اسید استیک، جذب چاهک ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد. از جدایه *P. aeruginosa* PAO1 به عنوان کنترل مثبت و از محیط کشت فاقد باکتری برای کنترل منفی آزمایش استفاده و جذب چاهک حاوی محیط کشت به عنوان OD (C) در نظر گرفته شد. در این روش جدایه هایی با  $4 \times \text{OD} (C) < \text{OD}$  یک تولیدکننده قوی بیوفیلیم محسوب شد. ۲۰ جدایه تولیدکننده قوی بیوفیلیم برای مراحل بعدی انتخاب شد (۹).

محلول کلونیدی نانوذرات نقره با غلظت ppm ۱۰۰ و در اندازه ی ۱۵ nm از دانشکده فناوری های نوین پزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید. برای تعیین MBIC نانوذرات

فنوتیپ اختصاصی بیوفیلیم ۴- واریته های فنوتیپی و واریته های پایا ۵- پاسخ کلی به تنش ۶- پمپ های افلاکس چند دارویی برای مقاومت در بیوفیلیم های باکتریایی مطرح شده است (۲ و ۳).

درمان های رایج برای مقابله با بیوفیلیم شامل استفاده از مواد باکتری سیدال و باکتریوستاتیک از جمله آنتی بیوتیک ها و آنتی سبتیک ها است. آنتی بیوتیک هایی نظیر کلیندامایسین دیکلوکساسیلین، تریکلوسان و... در جلوگیری از استقرار باکتریایی بر سطح سوندها بررسی شده اند. یکی از مشکلات استفاده ی آنتی بیوتیک ها در پروفیلاکسی، گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی در میان جدایه های میکروبی می باشد. آنتی سبتیک هایی نظیر سولفودیازین نقره، کلرهگزیدین، نیتروفورازون و گونه های چهارتایی آمونیوم مانند بنزالکونیوم کلراید برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلیم در سطح سوندها بررسی شده اند. گسترش مقاومت باکتریایی به درمان آنتی بیوتیکی، نیاز به توسعه مواد ضد میکروبی جدید را افزایش داده است. در بین این مواد، نانو مواد از جمله نانوذرات نقره گزینه های مناسبی برای مبارزه با بیوفیلیم هستند (۴).

نانو مواد معمولاً اندازه ای از ۱۰۰-۱ نانومتر دارند و از مواد آلی یا غیر آلی ساخته شده اند، که به دلیل اندازه کوچک و افزایش نسبت سطح به حجم، خواص متفاوتی از هم تاهای اتمی خود در مقیاس بزرگ نشان می دهند (۵). مکانیسم دقیق سمیت نانوذرات، علیه جنس های مختلف باکتریایی به طور کامل شناخته نشده است. نانوذرات می توانند از طریق برهم کنش های الکتروستاتیک، به غشای باکتریایی متصل و باعث تخریب یکپارچگی غشا گردند. بعد از مصرف نانوذرات، سمیت اکسیداتیو با تولید رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) القا می شود. مکانیسم سمیت نانوذرات به ترکیب شیمیایی، تغییرات سطح، خواص ذاتی نانوذرات و نوع گونه ی باکتری بستگی دارد (۶).

نانوذرات مختلف با گسترش مقاومت دارویی از راه های مختلف در میکروارگانیسم ها مقابله می کنند. این راه ها شامل: ۱- نانوذرات از مکانیسم های مختلف ضدمیکروبی برای مبارزه با پاتوژن ها استفاده می کنند که احتمال گسترش مقاومت میکروبی را به شدت کاهش می دهد در حالی که آنتی بیوتیک ها، دارای یک مکانیسم عمل ضدمیکروبی هستند. ۲- نانوذرات به دلیل نسبت سطح به حجم بالا و توانایی هدف گیری فعال یا غیرفعال به جایگاه عفونت، مواد

$$FIC (A) = \frac{MIC (A \text{ in the presence of } B)}{MIC (A \text{ alone})}$$

$$FIC (B) = \frac{MIC (B \text{ in the presence of } A)}{MIC (B \text{ alone})}$$

$$\sum FIC = FIC (A) + FIC (B)$$

اندیس های A و B ترکیب ضد میکروبی اول و دوم را نشان می دهند. مجموع FIC های A و B برای دسته بندی ترکیب عوامل ضد میکروبی به صورت  $\sum FIC \leq 0.5$  هم افزایی،  $1 \leq \sum FIC < 0.5$  هم افزایی جزئی،  $2 < \sum FIC \leq 1$  بی تفاوتی یا  $\sum FIC > 2$  آنتاگونیسم می باشد (۱۱).

نقره از روش میکروداپلوشن در پلیت میکروتیترا استفاده شد و سری رقت از  $50 \mu\text{g/ml}$  -  $0.4$  نانوذرات تهیه گردید. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، چاهک ها تخلیه و میزان تشکیل بیوفیلم با رنگ آمیزی کریستال ویوله  $0.1\%$  اندازه گیری شد. حداقل غلظت مهاری بیوفیلم (MBIC) نانوذرات نقره در  $20$  جدایه تولیدکننده ی قوی بیوفیلم تعیین و هر آزمایش ۳ بار تکرار شد (۱۰).

بررسی اثر توأم ترکیبات ضد میکروبی با تکنیک رقیق سازی Checkerboard (جدول ۱) انجام شد. در این روش به هر چاهک پلیت میکروتیترا  $50 \mu\text{l}$  از هر رقت ترکیب ضد میکروبی اضافه شد. هر ردیف افقی به یک تراکم از یکی از ترکیبات ضد میکروبی و هر ردیف عمودی به یک تراکم از ترکیب ضد میکروبی دیگر اختصاص داده شد. در نهایت  $100 \mu\text{l}$  سوسپانسیون باکتری به چاهک ها اضافه شد. هر پلیت حاوی کنترل های مثبت و منفی بود. چاهک های کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون باکتری و محیط کشت، چاهک های کنترل منفی حاوی رقت های ترکیبات ضد میکروبی و محیط کشت بدون باکتری بود. سوسپانسیون باکتریایی  $10$  جدایه در تماس با سری رقتی از  $3275 - 3/2$   $\mu\text{g/ml}$  از ایمی پنم و رقت هایی از  $50 \mu\text{g/ml}$  -  $0.78$  از نانوذرات نقره به تنهایی و در ترکیب با هم قرار گرفت. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، چاهک ها تخلیه و با کریستال ویوله رنگ آمیزی شد. Fractional inhibitory concentration (FIC) هر کدام از عوامل ضد میکروبی طبق فرمول زیر به دست می آید:

جدول ۱. اثر توأم ترکیبات ضد میکروبی با تکنیک رقیق سازی Checkerboard

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GC	A 0.5	A 1	A 2	A 4	A 8	A 16	A 32	A 64	A 128	A 256	A 512
B	B1	A 0.5 +	A 1 +	A 2 +	A 4 +	A 8 +	A 16 +	A 32 +	A 64 +	A 128 +	A 256 +	A 512 +
		B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1	B1
C	B2	A 0.5 +	A 1 +	A 2 +	A 4 +	A 8 +	A 16 +	A 32 +	A 64 +	A 128 +	A 256 +	A 512 +
		B2	B2	B2	B2	B2	B2	B2	B2	B2	B2	B2
D	B4	A 0.5 +	A 1 +	A 2 +	A 4 +	A 8 +	A 16 +	A 32 +	A 64 +	A 128 +	A 256 +	A 512 +
		B4	B4	B4	B4	B4	B4	B4	B4	B4	B4	B4
E	B8	A 0.5 +	A 1 +	A 2 +	A 4 +	A 8 +	A 16 +	A 32 +	A 64 +	A 128 +	A 256 +	A 512 +
		B8	B8	B8	B8	B8	B8	B8	B8	B8	B8	B8
F	B16	A 0.5 +	A 1 +	A 2 +	A 4 +	A 8 +	A 16 +	A 32 +	A 64 +	A 128 +	A 256 +	A 512 +
		B16	B16	B16	B16	B16	B16	B16	B16	B16	B16	B16
G	B32	A 0.5 +	A 1 +	A 2 +	A 4 +	A 8 +	A 16 +	A 32 +	A 64 +	A 128 +	A 256 +	A 512 +
		B32	B32	B32	B32	B32	B32	B32	B32	B32	B32	B32
H	B64	A 0.5 +	A 1 +	A 2 +	A 4 +	A 8 +	A 16 +	A 32 +	A 64 +	A 128 +	A 256 +	BC
		B64	B64	B64	B64	B64	B64	B64	B64	B64	B64	

شد و سپس از سطح شیشه تصاویر به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی (VEGA3 TESCAN) ثبت شد (۱۲).

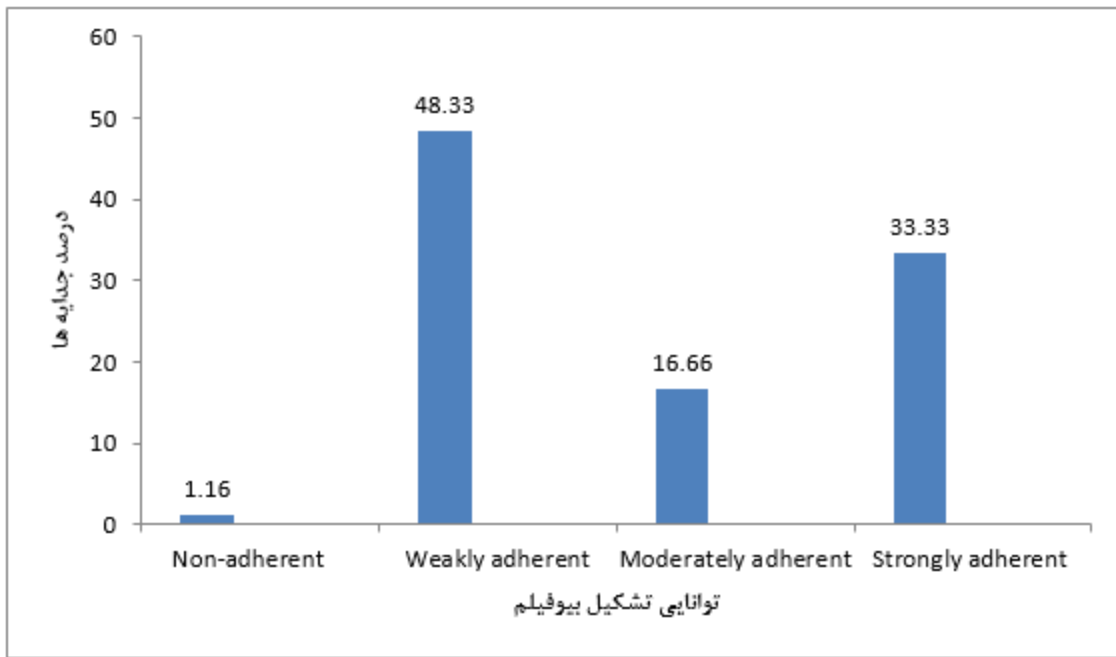
#### یافته‌ها

سنجش بیوفیلیم در ۶۰ جدایه بالینی نشان داد که ۲۰ جدایه (۳۳/۳۳٪) قادر به تشکیل بیوفیلیم قوی بر چاهک‌های پلیت میکروتیتر بودند. میزان تشکیل بیوفیلیم این ۲۰ جدایه در تماس با سری رقت‌های نانوذرات نقره متفاوت بود. در ۴ جدایه میزان تشکیل بیوفیلیم افزایش و در ۱۶ جدایه دیگر میزان تشکیل بیوفیلیم کاهش یافت. میزان کاهش بیوفیلیم در

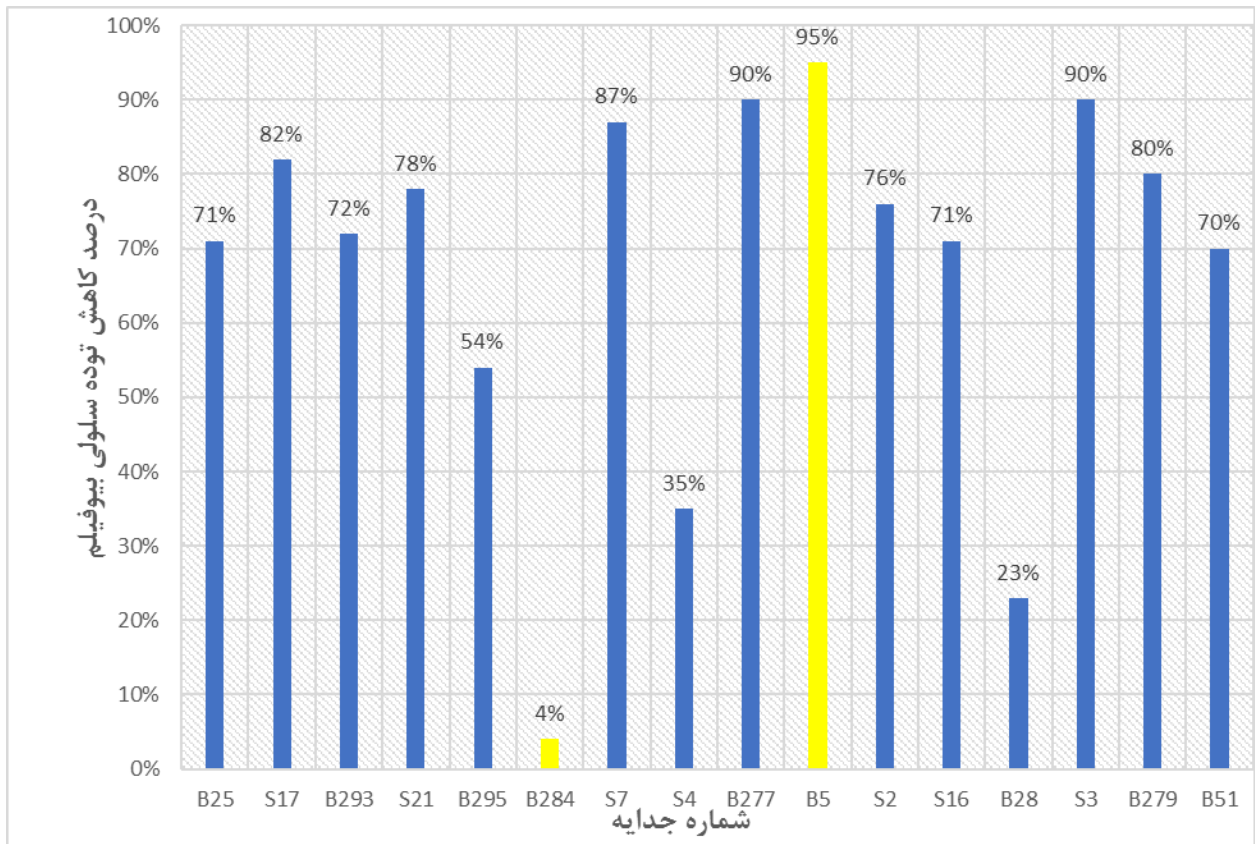
به منظور آماده سازی نمونه‌ها، شیشه‌ها تهیه و در پلیت میکروتیتر ۱۲ چاهکی قرار داده شدند. چاهک کنترل مثبت فاقد ترکیب ضد میکروبی بود و در سایر چاهک‌ها، ایمی پنم و نانوذرات نقره به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر اضافه شد. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، شیشه‌ها از محیط کشت خارج و به منظور حذف سلول‌های پلانکتونی، با آب مقطر استریل شسته شدند. در تهیه نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی ۳ مرحله شامل: آب‌گیری با گلو تار آلدئید ۴٪، تثبیت در رقت‌های مختلف الکل و خشک کردن در دستگاه خشک‌کن سرمایشی انجام شد. قبل از قرار دادن نمونه‌ها در میکروسکوپ الکترونی، روکش طلا بر روی نمونه‌ها قرار داده

قوی بیوفیلم بیانگر روابط هم‌افزایی در ۸ جدایه بود که در  
جدول ۳ و ۲ آمده است.

نمودار ۲ کاهش ۹۵-۴ درصدی را در میان ۱۶ جدایه نشان داد.  
اثرات توام نانوذرات نقره وایمی پنم در ۱۰ جدایه تولیدکننده



نمودار ۱. سنجش میزان تشکیل بیوفیلم در ۶۰ جدایه *P.aeruginosa* با رنگ آمیزی کریستال ویوله



نمودار ۲. نتایج کاهش توده سلولی بیوفیلیم در حضور نانوذرات نقره در ۱۶ جدایه بالینی *P.aeruginosa*

جدول ۲. اثرات توام ایمی پنم در ترکیب با نانوذرات نقره بر مهار تشکیل بیوفیلم ۱۰ جدایه *P.aeruginosa*

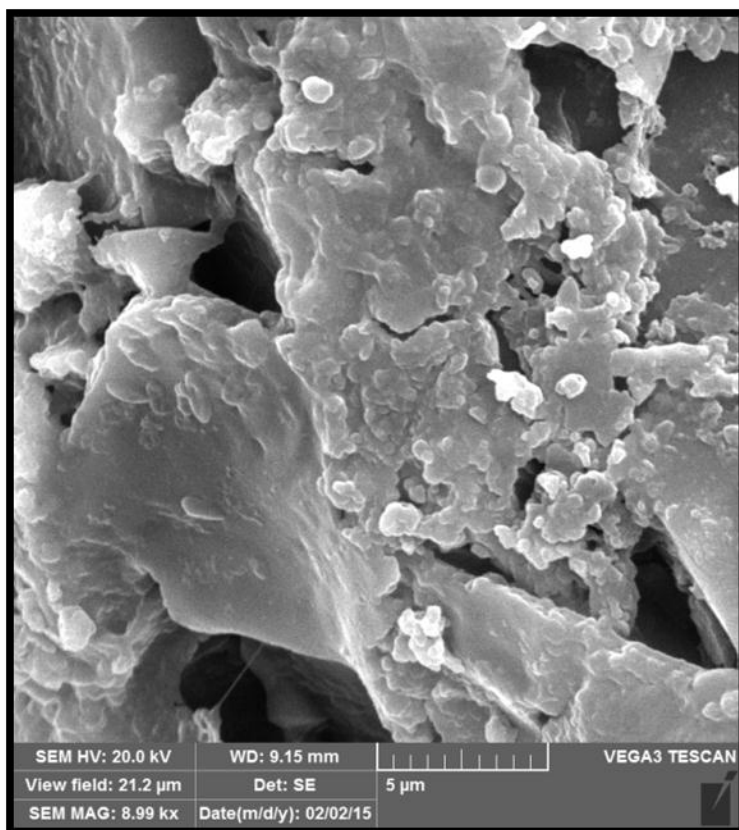
MBIC ایمی پنم و نانو ذرات نقره به تنهایی و در ترکیب با هم				
شماره جدایه	MBIC ایمی پنم به تنهایی (µg/ml)	MBIC ایمی پنم در ترکیب با نقره (µg/ml)	MBIC نانوذرات نقره به تنهایی (µg/ml)	MBIC نانوذرات نقره در ترکیب با ایمی پنم (µg/ml)
S <sub>4</sub>	۵۱/۲	۲۵/۶	>۵۰	۵۰
S <sub>12</sub>	۵۱/۲	۳/۲	>۵۰	۱۲/۵
S <sub>21</sub>	۱۳	۳/۲	>۵۰	۰/۷۸
S <sub>17</sub>	>۳۲۷۵	>۳۲۷۵	>۵۰	>۵۰
S <sub>2</sub>	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵	>۵۰	>۵۰
B <sub>25</sub>	>۳۲۷۵	۴۰۹/۴	>۵۰	۱/۵۶
B <sub>307</sub>	۵۱/۲	۱۲/۸	>۵۰	۱۲/۵
B <sub>5</sub>	۲۵/۶	۳/۲	>۵۰	۰/۷۸
B <sub>279</sub>	۰/۸	۰/۰۲۵	>۵۰	۱/۵۶
B <sub>51</sub>	۱۲/۸	۳/۲	۱۲/۵	۰/۷۸

جدول ۳. نوع روابط ترکیبی ایمی پنم و نانوذرات نقره بر مهار تشکیل بیوفیلم ۱۰ جدایه *P.aeruginosa*

شماره جدایه	FIC (A*)	FIC (B**)	ΣFIC	دسته بندی ترکیب عوامل ضد میکروبی
S <sub>2</sub>	۱	۱	$1 \leq \Sigma FIC < 2$	بی تفاوتی
S <sub>4</sub>	۰/۵	$\leq 0/5$	$1 \leq \Sigma FIC < 0/5$	هم افزایی جزئی
S <sub>12</sub>	۰/۰۶۲	$\leq 0/125$	$\Sigma FIC \leq 0/5$	هم افزایی
S <sub>17</sub>	-	-	-	مقاوم
S <sub>21</sub>	۰/۲۴۶	$\leq 0/078$	$\Sigma FIC \leq 0/5$	هم افزایی
B <sub>25</sub>	$\leq 0/062$	$\leq 0/156$	$\Sigma FIC \leq 0/5$	هم افزایی
B <sub>307</sub>	۰/۲۵	۰/۱۲۵	$\Sigma FIC \leq 0/5$	هم افزایی
B <sub>5</sub>	۰/۱۲۵	$\leq 0/078$	$\Sigma FIC \leq 0/5$	هم افزایی
B <sub>51</sub>	۰/۲۵	۰/۰۶۲	$\Sigma FIC \leq 0/5$	هم افزایی
B <sub>279</sub>	۰/۰۳۱۲	۰/۰۳۱۲	$\Sigma FIC \leq 0/5$	هم افزایی

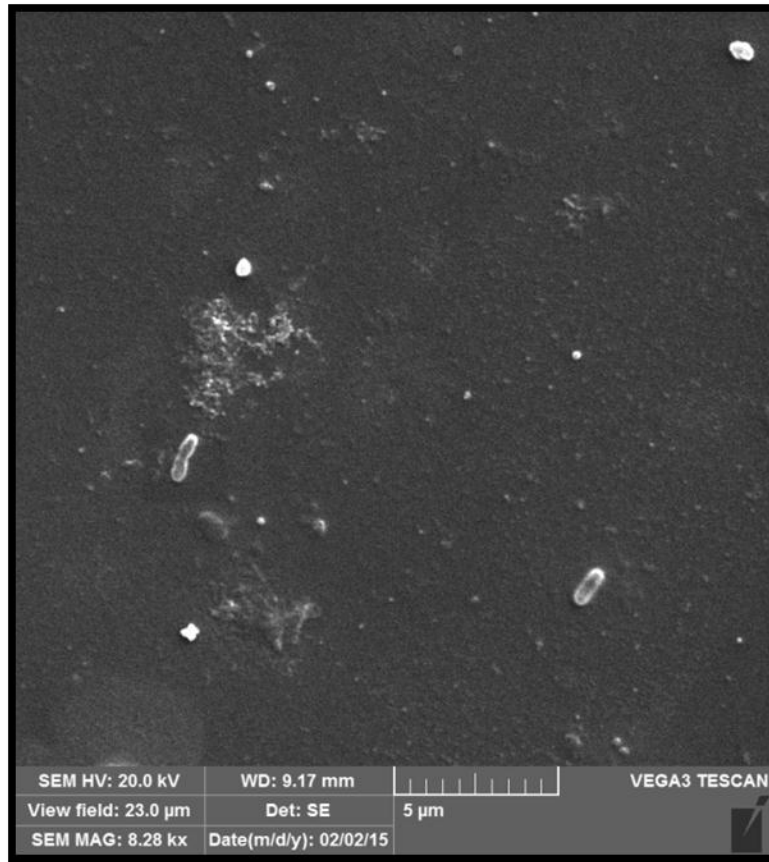
آسیب به غشای سلولی و بیرون ریختن محتویات سلول باکتریایی شده است که در شکل b-۳ قابل مشاهده است.

بیوفیلیم‌ها روی شیشه تشکیل شد (شکل ۱) و پس از مجاورت با ایمی پنم، تراکم سلول‌ها بسیار کاهش پیدا کرد (شکل ۲) و در کنار نانوذرات نقره و ایمی پنم تشکیل بیوفیلیم مهار شد (شکل ۳). اثرات ترکیبی ایمی پنم و نانوذرات نقره منجر به

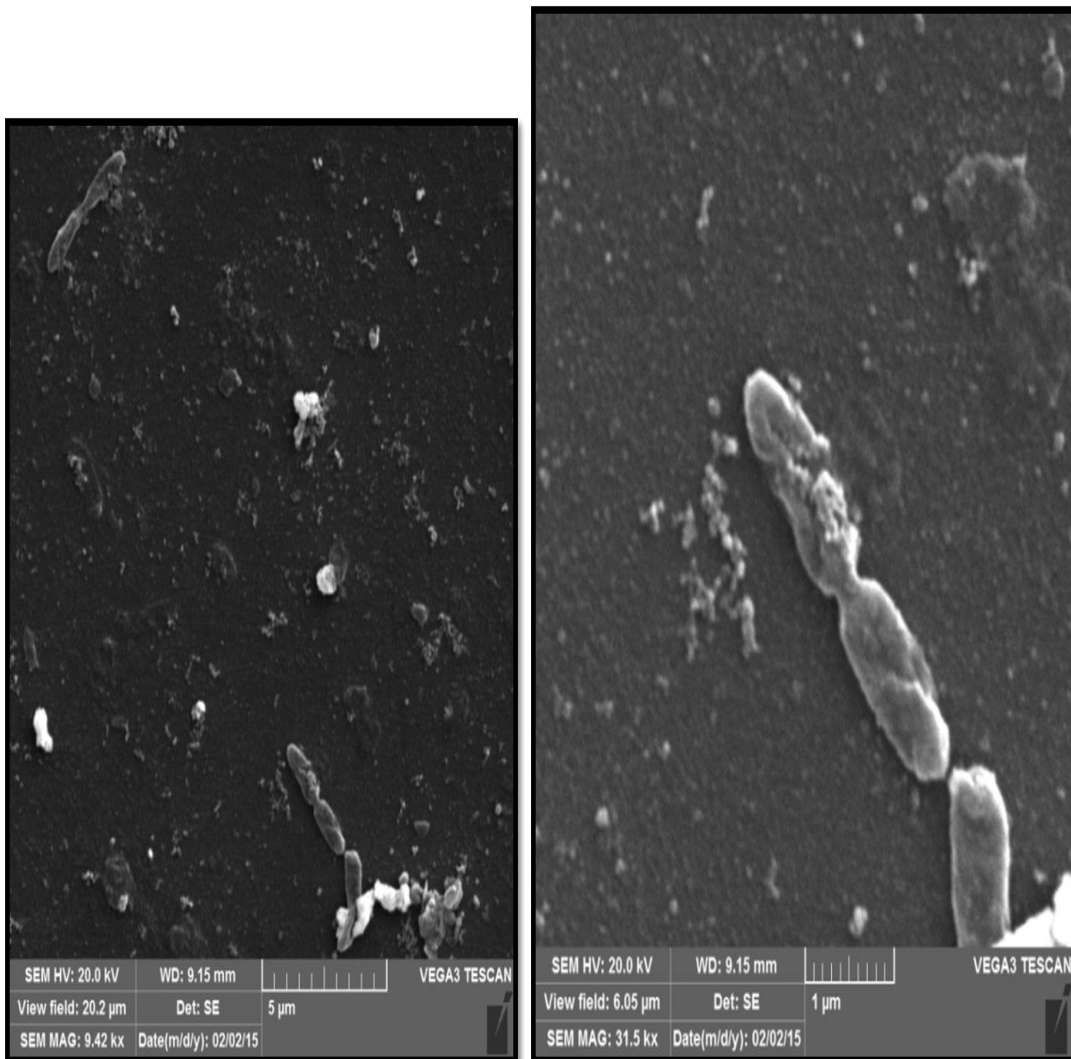


شکل ۱. تشکیل بیوفیلیم *P.aeruginosa* در چاهک کنترل مثبت بدون ماده ضد میکروبی با بزرگ‌نمایی ۸/۹۹kx





شکل ۲. کاهش تشکیل بیوفیلم *Paeruginosa* در حضور ایمی پنم با بزرگ‌نمایی ۸/۲۸kx



شکل ۳- ممانعت از تشکیل بیوفیلیم *P.aeruginosa* در حضور ایمی پنم و نانوذرات نقره با بزرگ‌نمایی ۹/۴۲KX (A) و ۳۱/۵ KX (B)

دو حالت نانوذرات نقره به تنهایی و در ترکیب با ایمی پنم معنی‌دار است ( $P \leq 0.005$ ).

آزمون تی مستقل نشان داد که اختلاف بین داده‌ها در دو حالت ایمی پنم به تنهایی و در ترکیب با نانوذرات نقره معنی‌دار است ( $P \leq 0.005$ ). هم‌چنین اختلاف بین داده‌ها در

### بحث

ارگانسیم‌های بیماری‌زا در ساختار خود، و انتقال پلاسمیدهای مقاومت به سایر میکروارگانسیم‌ها در بالین اهمیت دارند (۱۳). از بین ۶۰ جدایه بررسی شده، تنها یک جدایه توانایی تشکیل بیوفیلیم را بر پلیت‌های میکروتیتر (از جنس پلی

امروزه تشکیل بیوفیلیم روی سطوح پزشکی نظیر سوندها، پروتزها، لنزهای تماسی و غیره به یک معضل در دنیای پزشکی تبدیل شده است. بیوفیلیم‌ها بعلاوه مقاومت به ترکیبات ضد میکروبی، به عنوان منبع عفونت در بدن، در برگرفتن

جدایه (۰.۵٪) مهار شد. در ۲۰٪ دیگر، توده سلولی بیوفیلیم در حضور نانوذرات افزایش یافت. مقاومت بیوفیلیم به نانوذرات نقره می تواند به دلیل تجمع نانوذرات نقره با بقایای سلولی و در نتیجه عدم نفوذ به ماتریکس بیوفیلیم باشد. علاوه بر این نانوذرات نقره با کاهش تعداد سلول های باکتریایی اولیه و کاهش سنتز آگزوپلی ساکارید باعث کاهش توده سلولی بیوفیلیم می شوند. در ۲۰٪ جدایه ها با افزایش بیوفیلیم مواجه شدیم که می تواند به دلیل القای مکانیسم های پیام دهی مورد نیاز برای تشکیل بیوفیلیم باشد که در غلظت های sub-MIC آنتی بیوتیک ها نیز رخ می دهد (۱۸).

نانوذرات نقره در مقایسه با یون های نقره ظرفیت برهم کنش با چندین مولکول را دارند و ترکیبات کیلاته شده بزرگتر می توانند اثرات ضد میکروبی متفاوت و حتی یک اثر هم افزایی ضد میکروبی داشته باشند. در سال ۲۰۰۵، Li و همکاران نشان دادند که آنتی بیوتیک های مثل آموکسی سیلین در ترکیب با نانوذرات نقره علیه *E. coli* فعالیت هم افزایی (سینرژسم) دارند. مکانیسم این اثر هم افزایی احتمالاً، پیوند بین گروه های آمیدو و هیدروکسیل در ساختار آنتی بیوتیک با نانوذرات نقره است. بنابراین نانوذرات نقره علاوه بر اثرات ضد میکروبی، به عنوان یک حامل آنتی بیوتیکی نیز عمل می کنند (۱۹).

شاهوردی و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که فعالیت های ضد باکتریایی اریترومايسين، پنی سیلین G، آموکسی سیلین، کلیندامایسین و ونکومايسين علیه *E. coli* و *S. aureus* در حضور نانوذرات نقره افزایش می یابد (۲۰).

آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین و ایمپنم در ترکیب با نانوذرات نقره، رشد پلانکتونی را به صورت موثری مهار می کنند. در این حالت اگر باکتری به یک ترکیب ضد میکروبی مقاوم شود، ترکیب باکتری سایدی دیگر سلول های باکتریایی را می کشد. اثر باکتری سایدی به دلیل برهم کنش گروه های فعال آمینو و هیدروکسیل در این آنتی بیوتیک ها، با نانوذرات تقویت می شود. بنابراین کونجوگاسیون نقره- آنتی بیوتیک باعث تشکیل یک هسته از نانوذرات می شود، که به وسیله ی مولکول های آنتی بیوتیکی احاطه شده اند. در نتیجه غلظت ضد میکروبی افزایش می یابد که منجر به افزایش تخریب باکتریایی می شود (۱۹).

در پژوهش حاضر، اثرات ترکیبی نانوذرات نقره و ایمپنم در ۱۰ جدایه بررسی شد. در اکثر موارد روابط هم افزایی ( $\Sigma FIC \leq 0.5$ ) مشاهده شد. در این حالت، گروه های فعال در ایمپنم با نانوذرات نقره برهم کنش دارد و باعث

استرن) نداشت و ۲۰ جدایه تولید کننده ی قوی بیوفیلیم بود. به نظر می رسد که این جدایه ها توانایی تشکیل بیوفیلیم را روی سطوح دیگری نظیر سطوح پزشکی نیز داشته باشند.

گسترش مقاومت باکتریایی به درمان آنتی بیوتیکی، نیاز به توسعه مواد ضد میکروبی جدید را افزایش داده است. نانو مواد، با نوع جدیدی از فعالیت یا هدف گیری سلولی متفاوت در مقایسه با آنتی بیوتیک ها عمل می کنند (۱).

Kalishwaralal و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که نانوذرات نقره علیه *P. aeruginosa* و *Staphylococcus epidermidis* فعالیت ضد بیوفیلیمی دارند. نتایج حاصله نشان داد که نانوذرات نقره با متوسط اندازه ۵۰ nm در غلظت ۱۰۰ nm می توانند تشکیل بیوفیلیم را تقریباً به یک میزان در باکتری های گرم منفی و گرم مثبت مهار کنند (۱۴).

Fidel Martinez-Gutierrez و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که نانوذرات نقره با اندازه ی ۲۰-۳۰ nm فعالیت ضد بیوفیلیمی بهتری نسبت به میکروارگانیزم های گرم منفی در مقایسه با میکروارگانیزم های گرم مثبت و *C. albicans* دارند (۱۵). از آنجایی که در این آزمایشات از روش های متفاوتی برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شد، نمی توان نتایج را با هم مقایسه کرد. مکانیسم سمیت نانوذرات به ترکیب شیمیایی، تغییرات سطح، خواص ذاتی نانوذرات و نوع گونه ی باکتریایی بستگی دارد. نتایج متناقض از اثرات نانوذرات مختلف نشان می دهد که مکانیسم سمیت نانوذرات بسیار پیچیده است و با فاکتورهای مختلفی از جمله خواص فیزیکی شیمیایی نانوذرات مرتبط است (۶).

Kumari Palanisamy و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که نانوذرات نقره با اندازه ی ۲۰-۳۰ nm که به روش شیمیایی سنتز شده بودند، در غلظت ۲۰ μg/ml، باعث کاهش میزان تشکیل بیوفیلیم در جدایه های حساس (۶۷٪) و مقاوم (۵۶٪) *P. aeruginosa* می شود (۱۶).

Kasi murugan و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که نانوذرات نقره در اندازه ی ۵۰ nm که به روش طبیعی سنتز شده اند، باعث مهار بیش از ۹۰٪ تشکیل بیوفیلیم *P. aeruginosa* می شوند. به نظر می رسد نانوذرات نقره سنتز آگزوپلی ساکارید و بیوفیلیم را مهار می کنند (۱۷).

در پژوهش حاضر ۸۰٪ جدایه ها در حضور نانوذرات نقره کاهش در توده سلولی بیوفیلیم را نشان دادند و تنها بیوفیلیم یک

نانوذرات نقره در حضور ایمی پنم افزایش می یابد. در نتیجه نانوذرات نقره در ترکیب با ایمی پنم، با کاهش تعداد سلول های اولیه مورد نیاز برای تشکیل میکروکلنی ها از تشکیل بیوفیلم جلوگیری می کنند. بنابراین، نانوذرات نقره می توانند کاندیدای مناسبی برای مهار تشکیل بیوفیلم *P.aeruginosa* در پزشکی باشند که گسترش آن ها به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

افزایش غلظت ایمی پنم در سطح سلول می شود. همچنین ایمی پنم با تخریب دیواره سلولی، ورود نانوذرات نقره به داخل سلول را تسهیل می کند. به نظر می رسد بعد از ورود نانوذرات به سلول، نانوذرات نقره با تولید رادیکال های آزاد اکسیژن باعث تخریب غشای سلولی می شوند. در نتیجه فعالیت باکتری سایدی ایمی پنم در حضور نانوذرات نقره و فعالیت

## REFERENCES

- 1) Carl Edwin Haney. Effects on iron nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms . *Electronic Theses & Dissertations Center*, 2011, pages 1-74.
- 2) Thien-Fah C. Mash and George A. O'Toole. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 2001, Vol.9 No.1.
- 3) Eliana Drunkard. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Microbes and Infection*, 2003, 5(13):1213-1219.
- 4) Paul N. Danes. Ant biofilm Approaches: Prevention of Catheter Colonization. *Journal of Chemistry & Biology*, 2002, Vol. 9, 873-880.
- 5) Jonathan Lellouche<sup>1</sup>, Alexandra Friedman. Antibacterial and ant biofilm properties of yttrium fluoride nanoparticles. *International Journal of Nan medicine*, 2012, 7:5611-24.
- 6) Mohammad J.Hajipour, Katharina M.Fromm, Morteza Mahmoudi. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 2012, 30 (10):499-511.
- 7) Robert Y. Pelgrift, Adam J. Friedman. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Journal of Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, 65:1803-1815.
- 8) Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Ram Kumar Pandean SU. Silver nanoparticles *Journal of Colloids and Surfaces B: Bio interfaces*, 2010, 79, 340-344.
- 9) Asker SH, Kara Kermanshah R, Moment Moghaddam M. Assessment of biofilm cell removal and killing and biocide efficacy using the microliter plate test. *Journal of Bio fouling*, 2007, 23(2): 79 - 86.
- 10) Abdi-Ali A, Hendiani, S., Mohammadi, P., Gharavi, S. Assessment of Biofilm Formation and Resistance to Imipenem and Ciprofloxacin among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran. *Jundishapour J Microbiol.* 2014, 7(1): 8606.
- 11) CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2012.
- 12) M. Kolari, Mattila, K. Mikkola, R.Salkinoja-Salonen. Community structure of biofilms on ennobled stainless steel in Baltic Sea water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1998, 21(6):261-274.
- 13) Madilyn Fletcher and G. I. Loeb. Influence of Substratum Characteristics on the Attachment of a Marine *Pseudomonad* to Solid Surfaces. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 1: 67-72.
- 14) 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.

- 15) Fidel Martinez-Gutierrez, Laura Boggle, Alessandra Agostino. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Journal of Bio fouling*, 2013, Vol. 29, No. 6, 651–660.
- 16) Mahindra Kumara Palanisamy, Naps Farina, Thira Knur Amirulhusni. Ant biofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Nanobiotechnology*, 2014, 12:1-7.
- 17) Kais Morgan, SelvanaYaki Krishnasamy .nanotechnology approach for exploring the anti biofilm a potential of an ethannomedical pediculate for controlling lung infection causing *Pseudomonas aeruginosa*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2013, 8: 1, 117-126.
- 18) Okkyoung Choi, Chang-Ping Yu, G. Esteban Ferna ´ndez, Zhiqiang Hu .Interactions of nanosilver with *Escherichia coli* cells in planktonic and biofilm cultures. *water research* ,2010,44 , 6095-6103.
- 19) Ping Li, Juan Li, Changzhou Wu. Synergistic antibacterial effects of  $\beta$  lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Journal of Nanotechnology*, 2005, 16(9):1912–1917.
- 20) H. Shah Verdi, A. Sashimi, Seminarian. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aurous* and *Escherichia coli*. *Journal of Nano medicine*, 2007, 3: 168-171.