

## اثر آنتی بیوفیلیم محلول کلوئیدی نانوذره نقره بر بیوفیلیم جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

مارال میرزاعلی<sup>۱</sup>، تینا دادگر<sup>۲\*</sup>، حمیدرضا پردلی<sup>۳</sup>

- ۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
- ۲- استادیار گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
- ۳- استادیار گروه زیست شناسی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

\*نشانی برای مکاتبه: [dadgar\\_teena@yahoo.com](mailto:dadgar_teena@yahoo.com)

پذیرش برای چاپ: آذر نود و هشت

دریافت مقاله: فروردین نود و نه

### چکیده

**سابقه و هدف:** فاکتور کلیدی در بیماری زایی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس کولونیزه شدن و تشکیل بیوفیلیم چند لایه است. بیوفیلیم سدی در برابر عوامل ضد میکروبی ایجاد کرده و مانع عملکرد آنتی بیوتیک می شود. علاوه بر این، افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک ها یکی از مشکلات اصلی استفاده از آنها می باشد. امروزه استفاده از نانوذرات به علت خاصیت ضد میکروبی و سمیت پایین آن به مقدار زیادی مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این تحقیق ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره علیه بیوفیلیم ناشی از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود.

**روش کار:** در این مطالعه ۹۰ سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، شامل ۵۰ جدایه کلینیکی و ۴۰ سویه جدا شده از ناقلین مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایشات تشکیل بیوفیلیم با استفاده از روش میکروتیتر پلیت و رنگ آمیزی با کریستال ویوله انجام شد. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) با روش انتشار در چاهک و میکروپلیت صورت گرفت. میزان مقاومت به اگزاسیلین با روش انتشار دیسک بررسی شد.

**یافته ها:** نانو ذره نقره در غلظت ۳/۹ ppm اثر ضد بیوفیلیمی داشته و در غلظت بالاتر ۷/۱ ppm اثر ضد بیوفیلیمی آن افزایش یافت. در غلظت ۱۵/۶۲ ppm بیوفیلیم تشکیل شده را از بین برد. در مجموع ۲۴ جدایه مقاوم به اگزاسیلین بودند.

**نتیجه گیری:** نتایج این تحقیق نشان می دهد نانوذرات کلوئیدی در برابر باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس دارای اثر باکتری کشی یا ممانعت کننده از رشد است و در غلظت های پایین تر از MIC می تواند از تشکیل بیوفیلیم ناشی از این باکتری ممانعت کند.

**واژگان کلیدی:** استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، بیوفیلیم، نانوذرات نقره

### مقدمه

Nanocid L2000 (شرکت نانو نصب نیرو، ایران) با قطر ۱۰ نانومتر استفاده شده است. این ماده حاوی ۴۰۰۰ ppm از نانو ذرات نقره است که به صورت محلول معلق کلوئیدی استفاده می شود.

مقاومت سویه ها نسبت به دیسک اگزاسیلین (یک میکروگرم) با روش انتشار دیسک تعیین شد. پلیت ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری و نتایج براساس معیارهای CLSI تفسیر گردید.

تعداد ۹۰ نمونه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس شامل ۵۰ جدایه کلینیکی از بیمارستان ها و آزمایشگاه های تشخیص طبی شهرستان گرگان و ۴۰ نمونه از افراد ناقل سالم جمع آوری شد. نمونه های کلینیکی مربوط به عفونت های خون، ادرار، چشم بودند. نمونه ها در محیط مانیتول سالت آگار کشت داده شد. تمام نمونه ها از لحاظ موفولوژی در رنگ آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی افتراقی آزمایشگاهی از جمله کاتالاز، اکسیداز، کوآگولاز، اوره و حساسیت به نووبیوسین مورد بررسی قرار گرفتند.

در این مطالعه از نانو ذرات نقره کلوئیدی با نام تجاری فصلنامه بیماری های عفونی و گرمسیری، سال بیست و پنجم، شماره ۸۸

شده، سپس سوسپانسیونی معادل نیم مگفارلند با غلظت  $OD_{620} = 0.1$  تهیه شد. پس از آن به هر چاهک الیزا ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط اضافه کرده و میکروپلیت را در ۳۷ درجه ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت، محلول روئی دور ریخته شده و هر چاهک سه بار با  $100 \mu\text{l}$  از PBS شستشو داده تا باکتری‌های نجسبیده جدا شوند. در مرحله بعد سایر باکتری‌های چسبیده به چاهک با  $250 \mu\text{l}$  از اتانول ۹۶٪ به مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدند. سپس هر چاهک با  $200 \mu\text{l}$  کریستال ویوله ۰/۰۲٪ رنگ شده و پس از ۵ دقیقه رنگ با آب مقطر شسته شد. بعد از خشک شدن پلیت‌ها، آنالیز کمی بیوفیلم با افزودن  $200 \mu\text{l}$  از گلاسیال استیک اسید ۳۳٪ به هر چاهک و خواندن OD آنها در طول موج  $492 \text{ nm}$  توسط دستگاه الیزا محاسبه می‌گردید. آزمایشات فوق حداقل ۳ بار در زمان‌های مختلف کرار می‌شود تا نتایج قابل اعتماد بوده و بتوان ادعا نمود با n مرتبه تکرار همان نتایج به دست می‌آید.

تأثیر نانوذره نقره بر تشکیل بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت انجام شد با این تفاوت که مقدار  $100 \mu\text{l}$  نانوذره نقره به هر چاهک اضافه شد. کنترل مثبت چاهک حاوی محیط و باکتری بدون نانوذره و کنترل منفی یا بلانک چاهک حاوی محیط کشت بدون باکتری و نانوذره می‌باشد.

از آمارهای توصیفی میانگین، انحراف معیار و نمودار برای توصیف داده‌ها استفاده شد. همچنین اطلاعات به دست آمده از نمونه‌ها و نتایج ارزیابی‌ها در نرم‌افزار SPSS16 وارد شد و با روش Chi-Square آنالیز و مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت و در تمامی موارد سطح معنی‌دار  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

سی و یک نمونه از مردان (۱۴ ناقل و ۲۵ بیمار) و پنجاه و یک نمونه از زنان (۲۶ ناقل و ۲۵ بیمار) گرفته شد. تمام نمونه‌های افراد ناقل از بینی گرفته شد. در بیماران (۵۶٪) ۲۶ نمونه از ادرار، (۴۲٪) ۲۱ نمونه از خون، و (۲٪) یک نمونه از چشم گرفته شد.

نتایج حاصل از بررسی مقاوت آنتی‌بیوتیکی سوبیه‌ها در جدول ۲ آورده شده است. بین مقاومت به آگزامپلین و منبع نمونه رابطه معنی‌داری وجود نداشت.

برای تعیین اثر نانوذرات نقره در روش انتشار چاهک پس از کشت ۲۴ ساعته در محیط مولر هینتون آگار سوسپانسیونی میکروبی معادل نیم مگفارلند را در محیط مولر هینتون برات تهیه کرده و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا به کدورت لازم برسد. بعد از آماده‌سازی و مقایسه با لوله استاندارد نیم مگفارلند آن را در محیط مولر هینتون آگار با سوآپ استریل و در کنار شعله کشت متراکم داده، سپس در هر پلیت چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر ایجاد کرده، سپس نانو ذره نقره را در غلظت‌های مختلف ppm ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ در هر چاهک به میزان  $100 \mu\text{L}$  در هر چاهک تلقیح نموده و پلیت‌ها را در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد باکتری را با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد.

آزمایشات حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) نانوذرات در محیط مولر هینتون آگار با روش Agar dilution مطابق با استانداردهای CLSI انجام شد. برای سنجش اثر نانو ذرات نقره در جلوگیری از رشد باکتری‌ها، ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری چند کلنی خالص برداشته و در محیط مولر هینتون برات حل شد. سپس به مدت ۱۰-۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری و کدورت آن با استاندارد نیم مگفارلند بررسی و مقایسه شد. سپس در داخل هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای مقدار  $100 \mu\text{L}$  نانو ذره نقره با غلظت‌های مختلف بارگذاری شد. در مرحله بعد از سوسپانسیون تهیه شده معادل نیم مگفارلند به مقدار ۱۰ میکرولیتر داخل هر چاهک تلقیح شد. در چاهک‌های یک ستون ۸ تایی پلیت ۹۶ خانه‌ای نیز نانوذره نقره با غلظت استاندارد به همراه محیط مولر هینتون برات به عنوان کنترل منفی و در یک ستون ۸ تایی دیگر سوسپانسیون باکتری به- عنوان کنترل مثبت اضافه گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون در دما مناسب رشد باکتری مورد نظر کدورت چاهک‌ها در طول موج  $570 \text{ nm}$  توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. اولین رقت از نانو نقره که باکتری رشد نکرده بود به عنوان MIC تعیین گردید. دوز پائین‌تر از MIC به- عنوان دوز sub-MIC برای ادامه مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

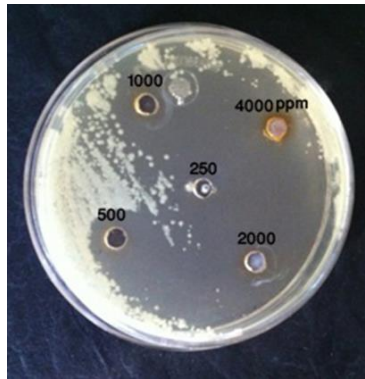
توانایی تشکیل ایزوله‌ها به روش میکروتیترپلیت بررسی شد (۱۰). به طور خلاصه، ابتدا جدایه‌ها در محیط TSB برات حاوی ۱٪ ساکارز به مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه

جدول ۱- الگوی مقاومتی اگزاسیلین در جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از ناقلین و بیماران

الگوی مقاومت	نمونه		p-value
	n=۵۰ بیمار	n=۴۰ ناقل	
MRCoNS	۱۵ (۳۰٪)	۹ (۲۲/۵٪)	۰/۲۱
MSCoNS	۳۵ (۷۰٪)	۳۱ (۷۷/۵٪)	

۴۰۰۰ و ۲۰۰۰ بود. میانگین درصد قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ۲۰۰۰ ppm و ۴۰۰۰ ppm از نانوذرات نقره در کل نمونه‌ها به ترتیب برابر با  $۱۴/۳۵ \pm ۱/۹$  و  $۱۶/۳۵ \pm ۲/۴$  بوده است.

نمونه‌ها تحت تاثیر غلظت‌های ۲۵۰ ppm، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ نانوذره نقره به روش چاهک قرار گرفتند و قطر هاله عدم رشد در آنها اندازه‌گیری شد (شکل ۱). در میانگین به دست آمده از غلظت‌های مختلف بیشترین اثر مهارکنندگی در بین غلظت‌های مورد مطالعه به ترتیب در غلظت‌های ppm



شکل ۱: اثر نانوذره نقره به روش انتشار چاهک

MIC به عنوان sub-MIC در نظر گرفته شد (جدول ۲).

در بررسی MIC نانوذره نقره کمترین غلظت ممانعت‌کنندگی در رشد، MIC معادل ۱۵/۶۲ ppm و غلظت‌های پایین‌تر از

جدول ۲: فراوانی MIC جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

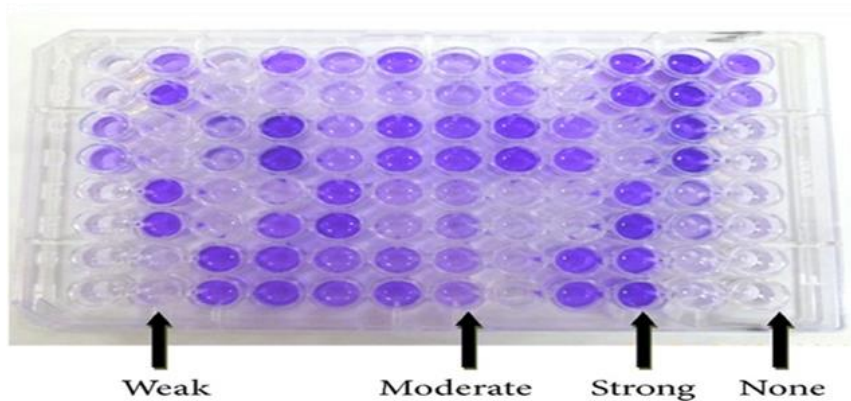
Sub-MIC	MIC (ppm)	فراوانی مطلق (نسبی)
*	۳/۹	۶ (۶/۶۶٪)
*	۷/۸	۱۱ (۱۲/۲۲٪)
	۱۵/۶۲	۳۱ (۳۴/۴۴٪)
	۳۱/۲۵	۴۲ (۴۶/۶۷٪)
	کل	۹۰ (۱۰۰٪)

قوی در نظر گرفته می‌شوند (جدول ۳، شکل ۲). بین توانایی تشکیل بیوفیلم، جنس بیمار، نوع و منبع نمونه جدا شده ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ( $P > 0.05$ ).

در ارزیابی میزان بیوفیلم تشکیل شده، نمونه‌های با OD کمتر از ۰/۱ فاقد بیوفیلم، ۰/۲-۰/۱ به‌عنوان بیوفیلم ضعیف، ۰/۲-۰/۳ به‌عنوان بیوفیلم متوسط و بیش از ۰/۳ به‌عنوان بیوفیلم قوی

جدول ۳: فراوانی توانایی تشکیل بیوفیلم سویه‌ها

مشخصات	جذب نوری (OD)	بیمار	ناقل	P-value
دارای بیوفیلم	کمتر از ۰/۱	۱۱ (۲۲)٪	۹ (۱۹)٪	۰/۲۸
	۰/۱-۰/۲	۴ (۸)٪	۲ (۵)٪	
	بیش از ۰/۳	۳ (۷)٪	۱ (۴)٪	
فاقد بیوفیلم		۳۲ (۶۲)٪	۲۸ (۷۰)٪	



شکل ۲: تشکیل بیوفیلم در روش میکروتیتر پلیت

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس حساس به اگزاسیلین ۲ جدایه بیوفیلم قوی و ۲۶ جدایه فاقد بیوفیلم بودند (جدول ۴).

در بررسی بیوفیلم در جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مقاوم به اگزاسیلین ۳ جدایه بیوفیلم قوی، ۷ جدایه فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم بودند. همچنین در جدایه‌های

جدول ۴- فراوانی تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بر اساس الگوی مقاومت اگزاسیلین

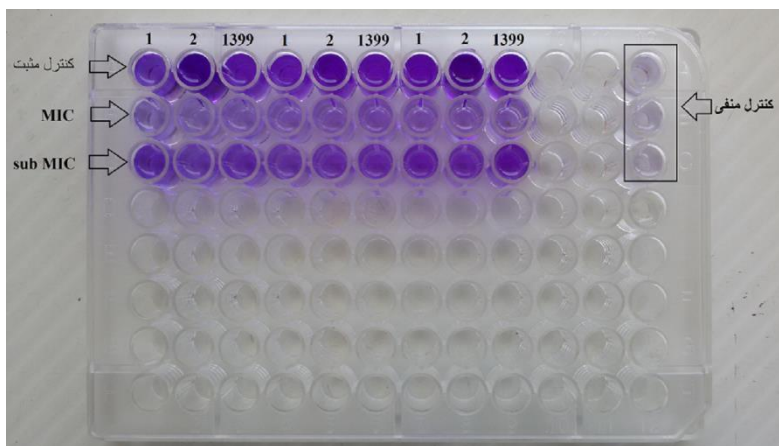
مقاومت	فاقد بیوفیلم	بیوفیلم ضعیف	بیوفیلم متوسط	بیوفیلم قوی	کل
MRCoNS	۷ (۲۹)٪	۱۲ (۵۰)٪	۳ (۸)٪	۳ (۱۲)٪	۲۴ (۱۰۰)٪
MSCoNS	۲۶ (۳۹)٪	۲۸ (۴۲)٪	۱۵ (۱۵)٪	۳ (۳)٪	۶۶ (۱۰۰)٪
تعداد کل	۳۳ (۳۶)٪	۴۰ (۴۴)٪	۱۲ (۱۳)٪	۵ (۵)٪	۹۰ (۱۰۰)٪

بیوفیلم ضعیف را داشته و ۹۶٪ فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم بودند. همچنین غلظت پایین‌تر از sub-MIC نانوذره نقره بر تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها نیز نشان داد که ۹۳٪ جدایه‌ها فاقد توانایی تشکیل بیوفیلم می‌باشد (جدول ۵، شکل ۳).

تیمار ۸۰ جدایه‌ای که دارای توانایی تشکیل تیپ‌های مختلف بیوفیلم بودند، در غلظت MIC نانوذره نقره نشان می‌دهد که تمامی جدایه‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم را از دست داده و در غلظت sub-MIC نانوذره نقره ۴٪ جدایه‌ها توانایی تشکیل

جدول ۵- مقایسه اثر نانوذره نقره بر تشکیل بیوفیلم در تیمار با غلظت‌های sub-MIC<sub>1</sub> و sub-MIC<sub>2</sub> نانوذره نقره

تیمار جدایه‌ها با نانوذره نقره				بدون تیمار با نانوذره نقره
غلظت sub-MIC <sub>1</sub>		غلظت sub-MIC <sub>2</sub>		
بیوفیلم ضعیف	فاقد بیوفیلم	بیوفیلم ضعیف	فاقد بیوفیلم	
۲ (۱٪/۳)	۶ (۸٪/۴)	۳ (۴٪)	۵ (۷٪)	بیوفیلم قوی ۸ (۱۱٪/۸)
۱ (۲٪/۷)	۱۱ (۱۵٪/۳)	۲ (۱٪/۳)	۱۰ (۱۳٪/۷)	بیوفیلم متوسط ۱۲ (۱۶٪/۵)
۰ (۰٪)	۵۲ (۷۲٪/۳)	۰ (۰٪)	۵۲ (۷۲٪/۳)	بیوفیلم ضعیف ۵۲ (۷۲٪/۲)
۳ (۴٪)	۶۹ (۹۶٪)	۵ (۷٪)	۶۷ (۹۳٪)	۷۲ (۱۰۰٪)



شکل ۳: اثر نانوذره بر تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتربلیت

معنی‌داری نیز در تاثیر نانوذره بر تشکیل بیوفیلم در جدایه-های MRCoNS و MSCoNS مشاهده نشد.

توانایی تشکیل بیوفیلم در غلظت‌های sub MIC نانوذره نقره با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در جدول ۶ نشان داده شده است. اختلاف

جدول ۶- تاثیر نانوذره نقره بر تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بر اساس MRCoNS و MSCoNS

P-Value	تعداد کل	بیوفیلم ضعیف	فاقد بیوفیلم	الگوی مقاومت
	۱۰۰٪ (۲۴)	۴٪/۱ (۱)	۹۵٪/۱۸ (۲۳)	MRCoNS
۰/۲۴	۱۰۰٪ (۶۶)	۳٪/۰۳ (۲)	۹۶٪/۹ (۶۴)	MSCoNS
	٪ ۱۰۰ (۹۰)	۳٪/۳ (۳)	۹۶٪/۱۶ (۸۷)	کل

## بحث

امروزه نانوذرات نقره به علت کمک در افزایش بازدهی داروها، عوارض جانبی پایین و قیمت مناسب توجه بسیاری را در داروسازی، پزشکی و دامپزشکی، صنایع غذایی و تصفیه آب به خود جلب کرده است. نانوذرات نقره با چسبیدن به سطح غشای باکتری‌ها و ممانعت از اتصال باکتری‌ها بهم تشکیل بیوفیلم را به تأخیر می‌اندازند. علاوه بر این نانوذره نقره می‌تواند آنزیم‌ها و DNA باکتری را غیر فعال و در نتیجه مانع از تکثیر آن شود (۱،۱۱).

تاکنون تحقیقات متعددی مبتنی بر واکنش‌های احتمالی بین نانوذرات نقره بر بیوفیلم ناشی از میکروارگانیسم‌های مختلف انجام گرفته است (۱۲-۱۴). در تحقیق حاضر اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره بر روی توانایی تشکیل بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مورد بررسی قرار گرفت. بررسی آثار ضد باکتریایی نانوذرات در این تحقیق با دو روش انتشار در چاهک و میکروداپلوشن صورت گرفت. طبق مطالعه ما، نانوذره نقره قادر به ممانعت از تشکیل بیوفیلم در غلظت‌های sub-MIC بوده و در غلظت MIC (۱۵/۶۲ ppm) توانست بیوفیلم تشکیل شده را از بین ببرد. نتایج حاصل از مطالعه ما گزارشات قبلی کالیسوارال و همکاران را تایید می‌کند. این محققین مشاهده کردند که نانوذره نقره به طور قابل توجهی تعداد سلول‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم را در غلظت ۱۰۰ نانومولار کاهش می‌دهد (۱۵). مطالعه مشابهی در این زمینه توسط مرتضوی و همکاران (۱۰) روی این باکتری صورت گرفته بود، نشان داد که در نانوذره نقره در اندازه ۲۰ نانومتر در غلظت بیش از ۰/۰۵ ppm مانع از تشکیل بیوفیلم و در غلظت‌های بالاتر از ۱۵۰ ppm توانست بیوفیلم تشکیل شده را از بین ببرد. اختلاف در غلظت بین این دو مطالعه می‌تواند به علت اختلاف در اندازه نانوذره استفاده شده باشد. طبق مطالعات صورت گرفته در خصوص رابطه بین اندازه نانوذرات در میزان اثر بخشی آن، می‌توان گفت ذرات کوچک با افزایش سطح نسبت به حجم دارای فعالیت ضد میکروبی بیشتری هستند. پس هر چه اندازه نانوذره کوچک‌تر باشد، می‌تواند قدرت اثر بخشی بیشتری داشته باشد (۱۶، ۱۷).

میزان اثر بخشی نانوذرات علاوه بر اندازه آن، به حساسیت ارگانیسم مورد مطالعه نیز بستگی دارد، باکتری‌های گرم منفی به علت وجود لیپوپلی‌ساکارید مستحکم در غشای خارجی ساختمان دیواره خود نسبت به باکتری‌های گرم مثبت، در مقابل بار مثبت نانوذرات مقاومت بیشتری از خود نشان می‌-

دهند. پورین‌ها در باکتری‌های گرم منفی سبب جذب و انتشار فلزات به غشای خارجی و فضای پری‌پلاسمیک شده و با اتصال فلزات به گروه‌های عاملی کربنات و فسفات از ورود آن‌ها به سلول جلوگیری می‌شود (۱۸). همان‌طور که در نتایج MIC مطالعه سلمانی و همکاران دیده شد که *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به *اشرشیا کلی* از حساسیت بیشتری نسبت به ذرات نانو نقره برخوردار است (۱۹). همچنین در مطالعه Cho et al. در سال ۲۰۰۵، MIC برای *استافیلوکوکوس اورئوس* ۵ ppm و برای *اشرشیا کلی* ۱۰ ppm گزارش شد (۲۰).

برای شناسایی بیوفیلم روش‌های متفاوتی وجود دارد. یکی از این روش‌ها، روش کمی میکروتیتراپلست است که کاربرد وسیعی دارد و در بسیاری از مطالعات برای بررسی بیوفیلم *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نیز از این روش استفاده نموده‌اند که میزان‌های متفاوتی از توانایی تشکیل بیوفیلم را برای این باکتری ارائه نموده‌اند. روش MTP علاوه بر اینکه توانایی تشکیل بیوفیلم جداپه‌ها را تشخیص می‌دهد می‌تواند میزان تشکیل بیوفیلم را به صورت کمی اندازه گیری کند. با استفاده از این روش، در مطالعه حاضر ۷۲ جدایه (۸۰٪) بیوفیلم تشکیل دادند و ۱۸ جدایه (۲۰٪) از نظر تشکیل بیوفیلم منفی بودند. میزان اثر بخشی نانوذره نقره با میزان غلظت آن رابطه مستقیم دارد. در مطالعه حاضر برای بررسی اثر بخشی ذرات نانوذره در ممانعت از تشکیل بیوفیلم از غلظت‌های sub-MIC استفاده شد. نتایج نشان داد که غلظت sub-MIC1 (۳/۹ ppm) مانع از تشکیل و پیشرفت بیوفیلم در ۹۳ درصد از نمونه‌ها بود و غلظت sub-MIC2 (۷/۸ ppm) در ۹۶ درصد از نمونه‌ها از تشکیل بیوفیلم جلوگیری کرد. به طور مشابهی، نتایج حاصل از مطالعه مرتضوی و همکاران نشان داد که غلظت ۲-۴ ppm مانع از تشکیل بیوفیلم ناشی از *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* می‌شود (۱۰). همچنین در مطالعه شاهرخ و همکارانش نانو ذره کلونیدی در غلظت ۲ ppm مانع از تشکیل بیوفیلم ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* شد که با مطالعه ما مطابقت دارد (۱۸).

در این تحقیق برای بررسی خاصیت باکتریوسیدالی نانوذرات در برابر سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، از سویه‌های مقاوم به اگزاسیلین استفاده شد. تست مقاومت به اگزاسیلین بر روی ۹۰

### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد نانوذرات کلوئیدی در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* دارای اثر باکتری‌کشی و ممانعت‌کننده از رشد است و در غلظت‌های پایین‌تر از MIC می‌تواند از تشکیل بیوفیلم ناشی از این باکتری ممانعت کند. با توجه اثر ضد باکتری قوی نانوذرات، این مواد می‌توانند در کنار آنتی‌بیوتیک‌ها جهت افزایش اثربخشی داروها استفاده شوند.

### تشکر و قدردانی

از دانشگاه آزاداسلامی واحد گرگان، آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های آموزشی-درمانی که در جمع‌آوری نمونه‌ها همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

نمونه انجام شد که ۲۴ سویه مقاوم بودند. اما رابطه معنی‌داری بین مقاومت به اگزاسیلین و مقاومت به نانوذرات نقره مشاهده نشد که مطابق نتایج حاصل از مطالعه لارا و همکاران می‌باشد. در این مطالعه از سویه‌های مقاوم شامل *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک، *شرشیا کلی* مقاوم به آمپی‌سیلین و *استرپتوکوکوس پیوژنز* مقاوم به اریترومايسین استفاده شد. اختلاف معنی‌داری بین مقاومت به آنتی‌بیوتیک و اثر بخشی نانوذرات مشاهده نشد و سویه‌های حساس و مقاوم به آنتی-بیوتیک توسط نانوذرات تحت تأثیر قرار گرفته که نشان می‌دهد پروتئین‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک که مانع از اثر بخشی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند بر روی نانوذرات اثری ندارند (۲۱).

## REFERENCES

1. Nguyen TH, Park MD, Otto M. Host Response to *Staphylococcus epidermidis* Colonization and Infections. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017 Mar 21;7:90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28377905>
2. Büttner H, Mack D, Rohde H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2015;5:14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25741476>
3. Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol* [Internet]. 2010 Jan;89(1):103–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19913940>
4. Le KY, Park MD, Otto M. Immune Evasion Mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Infection. *Front Microbiol* [Internet]. 2018;9:359. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29541068>
5. Fazly Bazzaz BS, Khameneh B, Zarei H, Golmohammadzadeh S. Antibacterial efficacy of rifampin loaded solid lipid nanoparticles against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Microb Pathog* [Internet]. 2016 Apr;93:137–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853754>
6. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* [Internet]. 1999 May 21;284(5418):1318–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334980>

7. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine* [Internet]. 2016 Apr;12(3):789–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26724539>
8. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2009 Jan;27(1):76–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854209>
9. Gurunathan S, Choi Y-J, Kim J-H. Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles on Endometritis Caused by *Prevotella melaninogenica* and *Arcanobacterium pyogenes* in Dairy Cattle. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Apr 16;19(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29659523>
10. Mortazavi H, Nakhaei Moghaddam M, Nejad Shahrokh Abadi K. Study of the Effect of Silver Nanoparticles on Biofilms Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *RUMS\_JOURNAL* [Internet]. 2015 May 1;14(2):125–36. Available from: <http://journal.rums.ac.ir/article-1-2196-en.html>
11. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab J Chem* [Internet]. 2019 Nov;12(7):908–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535217300990>
12. Ortiz-Gila MÁ, Nuñez-Anita RE, Arenas-Arrocena MC, Martínez-Álvarez O, Emiliano-Ramírez J, Fuente-Hernández J de la, et al. Silver nanoparticles for the inhibition of *Staphylococcus aureus*. *Entreciencias Diálogos en la Soc del Conoc* [Internet]. 2015 Aug 1;3(7):133–42. Available from: <http://revistas.unam.mx/index.php/entreciencias/article/view/62081>
13. Nabipour Y, Rostamzad A, Ahmadi S. The evaluation of antimicrobial properties of Zink and Silver nanoparticles on pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (Full Text in Persian). *J Ilam Univ Med Sci*. 2015;23(5):173–81.
14. Ansari M, Khan H, Khan A, Cameotra S, Alzohairy M. Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol* [Internet]. 2015;33(1):101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25560011>
15. Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SRK, Deepak V, Gurunathan S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2010 Sep 1;79(2):340–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493674>
16. Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan D, Shah SI. Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* [Internet]. 2005 Feb 1;5(2):244–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15853142>
17. Valodkar M, Bhadoria A, Pohnerkar J, Mohan M, Thakore S. Morphology and antibacterial activity of carbohydrate-stabilized silver nanoparticles. *Carbohydr Res* [Internet]. 2010 Aug 16;345(12):1767–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20591419>
18. Shahrokh S, Emtiazi G. A comparative study of the effects of colloidal nanosilver and industrial biocide E-265 on bacterial respiration and biofilm formation using microtiterplate method (Full Text in Persian). *WATER AND WASTEWATER* [Internet]. 2013;24(85):26–33. Available from: <https://www.sid.ir/En/Journal/ViewPaper.aspx?ID=290090>



19. Salmani M. Survey of Silver Nanoparticles Antibacterial Activity Against Gram-Positive and Gram-negative Bacteria in Vitro (Full Text in Persian). J Toloo-e-behdasht [Internet]. 2017 May 1;16(1):74–84. Available from: <http://tbj.ssu.ac.ir/article-1-1636-en.html>
20. Cho K-H, Park J-E, Osaka T, Park S-G. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochim Acta [Internet]. 2005 Nov;51(5):956–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013468605006948>
21. Lara HH, Ayala-Núñez N V., Ixtepan Turrent L del C, Rodríguez Padilla C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. World J Microbiol Biotechnol [Internet]. 2010 Apr 22;26(4):615–21. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-009-0211-3>