فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۶- شماره ۱- بهار ۱۴۰۰

مقاله تحقیقی

اثر نانوذره نقره بر آب گریزی سطحی و تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس، اسینتوباکتر بومانی، سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلی*

علیرضا فرازنده، فاطمه نوربخش*، سحر هنرمند جهرمی

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

***مسئول مکاتبات**: آدرس الکترونیکی: niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۱۱ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۷/۲۲

چکیده

بیوفیلم ها تجمعات میکروبی هستند که به یک سوبسترا به عنوان سطح چسبیده و در یک ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی احاطه می شوند. باکتری های تشکیل دهنده بیوفیلم در برابر عوامل ضد میکروبی و آنتی بیوتیک ها بسیار مقاوم می شوند. هدف از این مطالعه اثر نانوذره نقره بر آب گریزی سطحی و تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس، اسینتوباکتر بومانی، سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلی* می باشد. این مطالعه بر روی ۴۰ سویه باکتریایی شامل سویه های *سودوموناس ائروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی* و *اسینتوباکتر بومانی* ایزوله شده از بیمارستان میلاد تهران انجام شد که سویه های مورد بررسی توسط تست های بیوشیمیایی شناسایی شدند. همچنین تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیترپلیت، آبگریزی سطحی به روش MATH و حساسیت سویه ها نسبت به نانوذره نقره مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش تمامی سویه های مورد بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند و هیچ سویه ای با بیوفیلم منفی در مطالعه مشاهده نشد. بیشترین تاثیر نانوذره نقره در این مطالعه بر روی سویه ها در غلظت های ۰/۵، ۱ و ۲ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. همچنین تنها ۲۰٪ از سویه های سودوموناس ائروژینوزا در این پژوهش با آب گریزی سطحی متوسط مشاهده شدند و مابقی باکتری ها آبگریزی سطحی ضعیف داشتند. نانوذرات نقره در غلظت های پایین با اثر سمیت کم توانایی کاهش تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی، سودوموناس ائروژینوزا* و *اسینتوباکتر بومانی* را داشتند. باکتری های مورد مطالعه آب گریزی سطحی ضعیف داشتند.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، اسینتوباکتر بومانی*، آبگریزی سطحی، بیوفیلم، نانوذره نقره

مقدمه

در محیط طبیعی، باکتری ها همکاری و هماهنگی اجتماعی چشمگیر، متنوع و پیچیده دارند. اکثر باکتری ها

قابلیت تغییر از شیوه زندگی تک سلولی به چند سلول مانند کلنی های میکروبی و بیوفیلم ها را دارند (۱). بیوفیلم باکتریایی، اجتماع میکروبی پیچیده است که درون ماتریکس پلی‌ساکاریدی و یا پروتئینی محصور شده است (۲). این جوامع بسیار سازمان یافته، سطح بالایی از مورفوتیپ ها و ناهمگونی فنوتیپی و ژنوتیپی را تشکیل می دهند که در آن تعامل و همکاری بین گونه ها و درون گونه ها، یک پدیده شایع است (۳). در اجتماع بیوفیلم، باکتری ها متابولیسم خود را به حالت تعلیق در می آورند و خود را در پوسته ساخته شده از پلی ساکاریدها و پروتئین ها می پوشانند، که از اجتماع بیوفیلم در برابر اثرات سمی عوامل ضد باکتری محافظت می کند. در ساختار بیوفیلم، هماهنگی و همکاری از طریق تبادل درون و بین متابولیتها، مولکولهای سیگنالینگ، ماده ژنتیکی و ترکیبات دفاعی صورت می گیرد (۳).

بیشتر آنتی بیوتیکها، باکتریهای در حال رشد فعال را هدف قرار داده و قادر به نفوذ به لایه محافظ بیوفیلمها نیستند(۴). کاملاً مشهود است که چندین گونه از باکتری ها در اجتماع بیوفیلم چندگونه ای و در بین همگرایی ها برای بقا، همزیستی و تعامل دارند. در هماهنگی که چندین گونه با هم دارند، تعامل آنها اغلب از طریق ترکیبات خارج سلول انجام می شود (۳).

رشد یک میکروب می تواند تحت تأثیر مولکولهای کوچکی باشد، که توسط گونه های دیگر ترشح می شوند (۵). ماتریکس خارج سلولی یا اگزوپلی ساکارید (ESP[1]) که بیش از ۹۰ درصد وزن خشک بیوفیلم را تشکیل می دهد؛ باعث تسهیل اتصال به سطوح ، تشکیل میکروکلنی و مقاومت به مواد ضدمیکروبی می شود (۴). اطلاعات قابل توجهی در مورد نقش آبگریز سطح باکتریها در هنگام اتصال سلولهای باکتریایی تک پلانکتونی به هر سطح و توسعه مجموعه بیوفیلم شناخته شده است.

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین عوامل بیماریزای باکتریایی است که قادر به ایجاد عفونت های حیوانات و انسان است (۶). اسینتوباکتر بومانی پاتوژن فرصت طلبی است که به عنوان یکی از مهمترین عوامل بیماری زای عفونت های بیمارستانی شناسایی شده است (۷). *اسینتوباکتر بومانی* مقاومت چندداروییی ایجاد کرده که یکی از مکانیسم های موثر در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی، تشکیل بیوفیلم است (۸). *سودوموناس آئروژینوزا* یک باکتری گرم منفی است و یکی از مهمترین باکتری های ایزوله شده از بیماران می باشد. این باکتری عامل سوم از عفونت های ریوی و شایع ترین دلیل مرگ بیماران سیستیک فیبروزیس می باشد. از مکانیسم های بیماری زایی این باکتری توانایی تولید بیوفیلم و مقاومت سطح بالا به اغلب آنتی بیوتیک ها می باشد (۹). *اشریشیاکلی* نیز از مهمترین عوامل عفونت های ادراری می باشد که در جوامع مختلف بیش از ۸۰ درصد موارد عفونت ها حاد دستگاه ادراری را *اشریشیاکلی* شامل می شود (۱۰).

چسبیدن باکتری به سطح سلولهای حیوانی یک مرحله مهم در روند عفونت است (۱۱) و تصور می شود اثرات متقابل آبگریز در چسبندگی باکتریها به بافتهای میزبان نقش دارد (۱۲و۱۳). چسبندگی باکتریها به سایر سطوح باکتریایی تحت تأثیر تغییر انرژی آزاد بین سطحی و مطابق با روند اتصال است. بنابراین، هدف قرار دادن خاصیت چسبندگی به صورت باکتریهای پلانکتونی، ممکن است یک استراتژی مؤثر برای جلوگیری از تشکیل ساختار بیوفیلم ایجاد کند (۱۳).

امروزه محققان در حال جستجوی راه حل های جدید برای درمان باکتری های مقاوم به دارو هستند. یکی از زمینه های کاربردی نانوبیوتکنولوژی استفاده از نانوذرات در درمان عفونت های میکروبی می باشد (۱۴). اخیراً ، برخی از مطالعات نشان داده اند که نانوذرات فلزی قادر به جلوگیری از تشکیل بیوفیلم در میکروارگانیسم ها هستند (۱۵). همچنین، فعالیت ضد میکروبی برخی از نانوذرات فلزی مانند روی، تیتانیوم، نقره، مس و آلومینیوم در کاهش رشد میکروارگانیسم های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶). نتایج مطالعات نشان می دهد که یون های فلزات سنگین و NP اکسید فلز، که دارای ویژگی های ضد

[1] Exopolysaccharide

باکتریایی هستند، می توانند از تشکیل بیوفیلم های باکتریایی جلوگیری کنند (۱۷).

هدف از این پژوهش بررسی هیدروفوبیسیته سطحی و تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اسینتوباکتربومانی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیاکلی* و اثر نانوپارتیکل نقره بر آن است.

روش انجام پژوهش

نمونه گیری

این مطالعه بر روی ۴۰ سویه باکتریایی شامل ۱۰ سویه *سودوموناس ائروژینوزا*، ۱۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس، ۱۰ سویه اشریشیاکلی و ۱۰ سویه اسینتوباکتر بومانی ایزوله شده از نمونه های بالینی بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان میلاد تهران در تاریخ اردیبهشت تا تیر ۱۳۹۹ انجام گرفت. ایزوله های جمع آوری شده جهت تایید هویت به آزمایشگاه دانشگاه انتقال داده شد. نمونه ها در محیط BHI براث به محیط آزمایشگاه انتقال داده و سپس هر نمونه روی محیط بلاد آگار کشت داده شدند. سپس کشت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری شدند. و از کشت های تازه جهت تست های افتراقی مانند رنگ آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، تست کوآگولاز و کشت در محیط مانیتول سالت آگار، SIM، MRVP، TSI، سیمون سیترات و اکسیداز انجام شد.

بررسی میزان توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه های جمع آوری شده به روش میکروتیتر پلیت

ابتدا محیط کشت[2](TSB) حاوی ۲٪ گلوکز تهیه و استریل گردید. برای تهیه سوسپانسیون باکتری، سویه های مورد مطالعه در مقداری از محیط TSB حاوی ۲٪ گلوکز به کدورت نیم مک فارلند رسانده شد. در انتها در یک پلیت ۹۶ خانه به هر چاهک سوسپانسیون باکتری یاد شده اضافه شد. ۳چاهک کنترل منفی که در آن باکتری اضافه نشده بود (عدم رشد باکتری در نتیجه عدم تشکیل بیوفیلم) و ۳ چاهک کنترل مثبت که حاوی باکتری بود (رشد باکتری و تشکیل بیوفیلم) در پلیت استفاده شد. سپس پلیت ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید (۷).

روش رنگ آمیزی برای مطالعه بیوفیلم

ابتدا محیط کشت ها از داخل چاهک ها دور ریخته شد. چاهک ها ۱ الی ۲ بار با بافر PBS شستشو داده شد. بعد از شستشوی مرحله قبل و خالی کردن چاهک ها به چاهک ها متانول مطلق افزوده و در دمای اتاق انکوبه گردید سپس متانول دور ریخته شد و پلیت ثابت گذاشته شد تا الکل از آن حذف شود. به چاهک ها کریستال ویوله ۱٪ اضافه گردید و در دمای اتاق انکوبه شد. با آب مقطر چاهک ها شستشو داده شد تا رنگ اضافی حذف گردد. در انتها چاهک ها خالی گردید. به هر یک از چاهک ها استیک اسید گلاسیال ۳۳٪ افزوده شد و بعداز گذشت ۲۰ دقیقه پلیت با دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد(۷) برای بررسی نتایج از روش (ODc)[3] استفاده گردید. به منظور بررسی طبق فرمول زیر محاسبه انجام گرفت (۷).

ODc= میانگین OD چاهک های کنترل منفی + (3 × انحراف معیار چاهک های کنترل منفی)

بعد از محاسبه ی ODc یا کات اف، OD چاهک های مورد مطالعه طبق جدول زیر دسته بندی گردید.

جدول ۱: دسته بندی انواع بیوفیلم بر اساس روش میکروتیتر پلیت.

قدرت تشکیل بیوفیلم	OD مشاهده شده
بیوفیلم قوی	OD>4×ODc
بیوفیلم متوسط	2×ODc<OD≤4×ODc
بیوفیلم ضعیف	ODc<OD≤2×ODc
بیوفیلم منفی	OD≤ODc

[2] Tryptic Soy Broth

[3] Optical density cut-off

آزمون میکرو دایلوشن براث برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

نانوذره مورد مطالعه از شرکت سیگیما آمریکا با کاتالوگ شماره 730793 خریداری شد. نانوذره تهیه شده به صورت سوسپانسیون، کلوئیدی و با ابعاد ۱۰ تا ۲۰ نانومتر بود.

برای تعیین MIC از روش سریال دایلوشن به صورت سه تکرار در محیط کشت مولرهینتون براث (MHB) انجام شد. بدین صورت که ابتدا به تمامی چاهک های مورد مطالعه ۱۰۰ میکرولیتر از محیط MHB افزوده شد. سپس به چاهک های ردیف اول ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نانو ذره با غلظت ۵۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر اضافه شد و به روش سریال دایلوشن تا آخرین چاهک مورد مطالعه رقیق سازی انجام گردید. در انتها۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^6 (۱/۱۰۰ کدورت نیم مک فارلند) به تمامی چاهک های مورد مطالعه افزوده شد. برای هر پلیت یک چاهک کنترل مثبت (محیط کشت و سوسپانسیون باکتری) و یک چاهک کنترل منفی (محیط کشت و نانوذره) استفاده شد.

در ادامه پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعداز گذشت این مدت، خوانش میکروپلیت ها توسط دستگاه الیزا در طول موج ۶۲۰ نانومتر انجام گردید.

برای بررسی اثر نانوذره نقره بر روی روند تشکیل بیوفیلم از غلظت های ۱/۲ غلظت MIC، MIC، ۲ و ۴ برابر غلظت MIC نانوذره نقره بر روی هر سویه انجام شد.

تعیین آب گریزی سطحی باکتریایی به روش MATH[4] (چسبندگی باکتری به هیدروکربن اکتان)

باکتری های مورد مطالعه در محیط TSA کشت داده و مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. از کشت تازه باکتری ها در محیط TSA یک لوپ کامل برداشته به لوله حاوی ۱۰ mL محیط مایع لوریا برتانی براث اضافه شد که باید کدورت لوله معادل ۰/۵ مک فارلند باشد. سپس لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۲۰۰ قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت لوله های ۱۰ mL به دو لوله ۵ mL تقسیم شد که شامل لوله A و B می باشند.

لوله A حاوی ۵ mL محلول سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند را به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب با بافر PBS به آرامی شستشو داده شد و در مرحله بعد سوسپانسیون باکتریایی در لوله حاوی رسوب با بافر PBS ، معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و سپس جذب نوری آن با دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۴۰-۶۶۰ نانومتر خوانده شد این جذب نوری، به عنوان جذب نوری اولیه یا A گزارش گردید.

به لوله B حاوی۵ mL محلول سوسپانسیون باکتریایی که معادل ۰/۵ مک فارلند بود به مقدار ۱ mL محلول هیدروکربن اکتان اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه به آرامی ورتکس گردید سپس لوله ها به مدت ۱۵ دقیقه تا ۱ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد تا زمانی که ۲ فاز تشکیل شود سپس فاز رویی دور ریخته شد و جذب نوری با دستگاه اسپکترفتومتر با طول موج ۶۴۰-۶۶۰ نانومتر خوانده شد و به عنوان ، جذب نوری ثانویه یا B گزارش شد. سپس از فرمول زیر و جدول ۲ برای محاسبه درصد اتصال سلولی به هیدرو کربن اکتان استفاده گردید(۱۸).

درصداتصال سلول به هیدرو کربن$I=[(A-B)/A]*100\%$

جدول ۱ - درصد اتصال سلولی به هیدرو کربن و قدرت آب گریزی سطحی.

درصد	هیدروفوبیسیته
I > 50%	Strong
20 - 50%	Moderate
I < 20%	Weak

نتایج تشکیل بیوفیلم سویه‌های مورد مطالعه

در این مرحله بیوفیلم مربوط به سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *اسینتوباکتر بومانی* مورد بررسی قرار گرفت و

[4]Microbial Adhesion To Hydrocarbon

براساس خوانش توسط دستگاه الایزا ریدر و محاسبه ی نتایج OD cut off، سویه‌ها به گروه‌های دارای بیوفیلم قوی، متوسط، ضعیف و فاقد بیوفیلم تقسیم شدند (نمودار ۱).

نتایج غلظت های ممانعت کننده از رشد نانوذره نقره بر روی سویه های مورد مطالعه

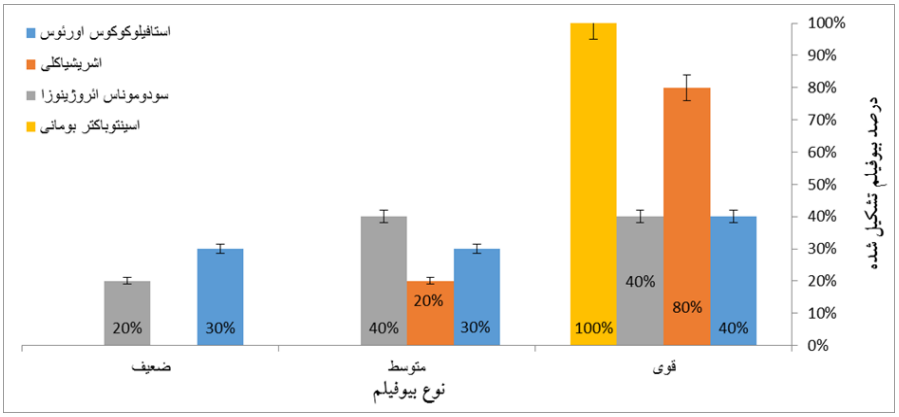
اثر ضد بیوفیلمی نانوذره نقره بر روی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس*

در مطالعه حاضر برای بررسی مهار تشکیل بیوفیلم در سویه های مورد مطالعه از غلظت های MIC، ۱/۲، ۲ و ۴ برابر غلظت MIC بر روی روند تشکیل بیوفیلم مورد مطالعه قرار گرفتند. با تاثیر غلظت های مختلف نانوذره نقره حدود ۲۰-۵۰٪ سویه ها نسبت به گروه کنترل خود بیوفیلم منفی داشتند. همچنین با افزایش غلظت نانوذره نقره در این مطالعه از شدت تشکیل بیوفیلم کاسته شد (نمودار ۲). در مطالعه حاضر ارتباط معناداری بین کاهش تولید بیوفیلم با تاثیر غلظت های مختلف نانوذره نقره در گروه های تیمار و کنترل سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد ($P<0.05$).

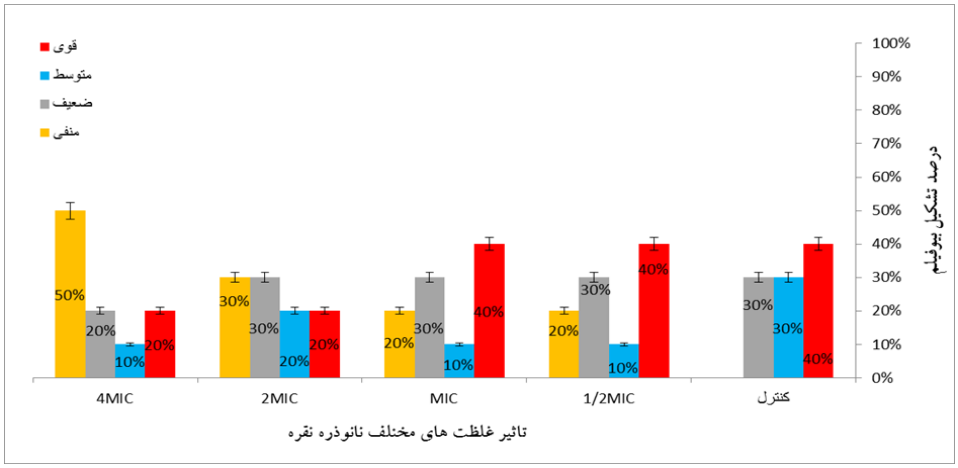
نتایج اثر ضد بیوفیلمی نانوذره نقره بر روی سویه های *اشریشیاکلی*

با توجه به نمودار ۳ با افزایش غلظت نانوذره نقره علاوه بر کاهش میزان قدرت تشکیل بیوفیلم نسبت به گروه کنترل، سویه هایی با تشکیل بیوفیلم ضعیف و منفی نیز مشاهده شدند. همچنین ارتباط معناداری بین کاهش تولید بیوفیلم با تاثیر غلظت های MIC، ۲ و ۴ برابر غلظت MIC نانوذره نقره در گروه های تیمار و کنترل سویه های *اشریشیاکلی* مشاهده شد($P<0.05$).

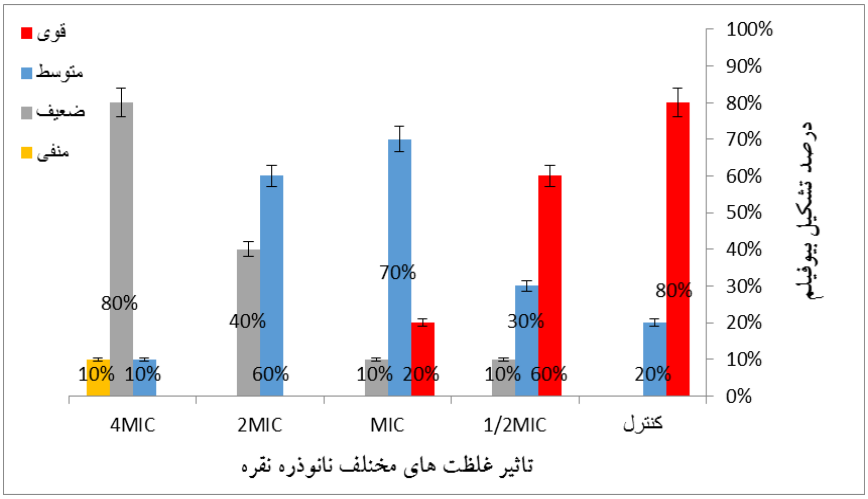
.



نمودار ۱ - فراوانی تشکیل بیوفیلم در سویه های باکتریایی.



نمودار ۲ - اثر ضد بیوفیلمی غلظت های مختلف نانوذره نقره بر روی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس*.



نمودار ۳ - ثر ضد بیوفیلمی غلظت های مختلف نانوذره نقره بر روی سویه های *اشریشیا کلی*.

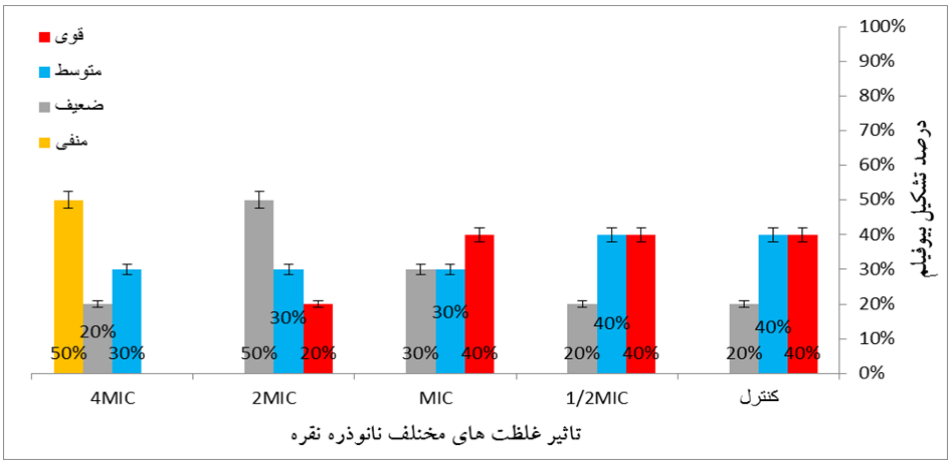
نتایج اثر ضد بیوفیلمی نانوذره نقره بر روی سویه های *سودوموناس ائروژینوزا*

در غلظت MIC ۱/۲، سویه های سودوموناس ائروژینوزا نسبت به گروه کنترل تغییری در روند تشکیل بیوفیلم نداشتند. اما با افزایش غلظت نانوذره نقره از شدت تشکیل بیوفیلم سویه ها کاسته شد بطوریکه در غلظت ۴MIC، ۵۰٪ سویه ها بیوفیلم تشکیل ندادند (نمودار۴). در مطالعه حاضر ارتباط معناداری بین کاهش تولید بیوفیلم با تاثیر غلظت های ۲ و ۴ برابر غلظت MIC نانوذره نقره در گروه های تیمار و کنترل سویه های *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده شد($P<0.05$).

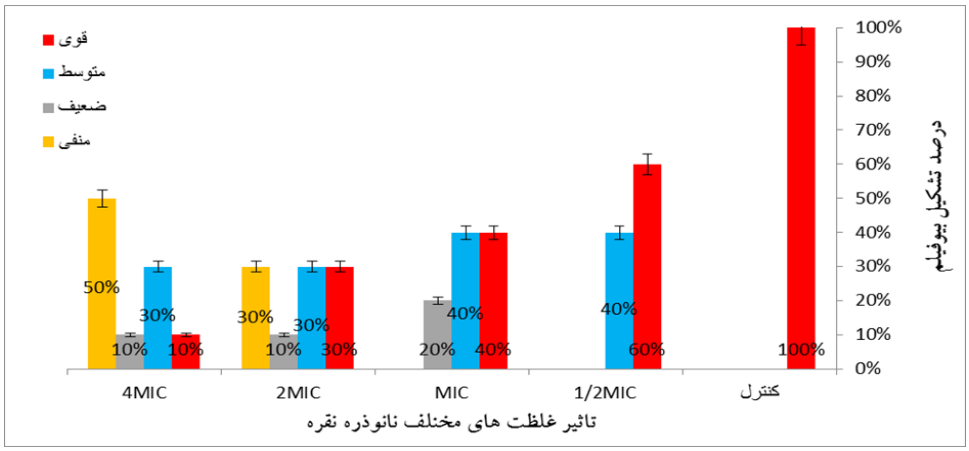
نتایج اثر ضد بیوفیلمی نانوذره نقره بر روی سویه های *اسینتوباکتر بومانی*

در سویه های *اسینتوباکتر بومانی* نیز با افزایش غلظت نانوذره نقره میزان تشکیل بیوفیلم کاهش یافته است. چنانچه با اثر غلظت های ۲ و ۴ برابر غلظت MIC، ۳۰ تا ۵۰ درصد سویه ها بیوفیلم تشکیل ندادند (نمودار ۵). در مطالعه حاضر ارتباط معناداری بین کاهش تولید بیوفیلم با تاثیر غلظت های مختلف نانوذره نقره در گروه های تیمار و

کنترل سویه های اسینتوباکتر بومانی مشاهده شد (P<0.05).



نمودار ۴ : اثر ضد بیوفیلمی غلظت های مختلف نانوذره نقره بر روی سویه های *سودوموناس ائروژینوزا*



نمودار ۵ : اثر ضد بیوفیلمی غلظت های مختلف نانوذره نقره بر روی سویه های اسینتوباکتر بومانی.

نتایج میزان آب گریزی سطحی در سویه های مورد مطالعه

در بررسی آب گریزی سطحی به روشMATH ، تمامی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *اسینتوباکتر بومانی* آب گریزی سطحی ضعیف نشان دادند و فقط ۲۰٪ از سویه های *سودوموناس ائروژینوزا* آب گریزی سطحی متوسط داشتند. با تاثیر غلظت های MIC، ۱/۲، ۲ و ۴ برابر غلظت MIC نانوذره نقره بر آب گریزی سطحی متوسط سویه های *سودوموناس ائروژینوزا* تغییری مشاهده نشد.

بحث

بیوفیلم ها تجمعات میکروبی هستند که به یک سوبسترا به عنوان سطح چسبیده و در یک ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی احاطه می شوند(۱۹). اولین مرحله تشکیل بیوفیلم اتصال باکتریایی است که به شرایط محیطی، خصوصیات سطح تماس و پلی مرهای خارج سلولی ترشح شده توسط باکتری ها بستگی دارد (۱۹و۲۰). این خصوصیات بر اساس برهم کنش های الکترواستاتیک، واندروالس، هیدروفوبیک که تحت عنوان آب گریزی سطحی تعریف می شوند، مدیریت می گردد. باکتری های تشکیل دهنده بیوفیلم در برابر عوامل ضد میکروبی و آنتی بیوتیک

ها بسیار مقاوم می شوند به طوری که این امر منجر به نگرانی هایی در جامعه پزشکی شده است (۱۸). نانوذرات نقره امید تازه‌ای برای درمان باکتری بیماریزای انسانی که مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها توسعه یافته می باشد (۲۲و۲۳).. نانوذرات نقره پتانسیل غشایی پلاسما را ناپایدار می‌کند که نتیجه آن کاهش سطح ATP (آدنوزین تری فسفات) درون سلول می‌باشد همچنین موجب از هم گسستن اجزای موجود در غشاء خارجی باکتری می‌شود و باعث آزاد شدن مولکول‌هایی نظیر لیپو پلی ساکارید و پورین‌ها از غشاء سیتوپلاسمی میگردد. اتصال نقره به گروه‌های عاملی پروتئین‌ها و ایجاد پیوند با آن‌ها، باعث دناتوراسیون و از بین رفتن عملکرد اصلی پروتئین‌ها می‌شود وموجب مرگ باکتری می‌گردد (۲۴و۲۵).

در مطالعه حاضر بیوفیلم سویه های مورد بررسی توسط روش میکروتیترپلیت مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد تمامی سویه های مورد بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم را داشته و در هیچ یک از سویه ها عدم تولید بیوفیلم مشاهده نشدند. در گروه تشکیل دهنده بیوفیلم قوی، سویه های *اسینتوباکتر بومانی* با ۱۰۰٪ فراوانی و در رتبه بعدی سویه های *اشریشیا کلی* با ۸۰٪ و سویه های *سودوموناس ائروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با ۴۰٪ فراوانی مشاهده شدند.

Khoramian در مطالعه ای توانایی تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از تورم پستان گاو دامداری‌های اطراف تهران را مورد بررسی قرار داد. ۸۷/۸٪ سویه های مورد بررسی قابلیت تشکیل بیوفیلم داشتند و تنها ۱۲/۲ درصد جدایه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند(۲۶). Bano و همکاران، سویه های بالینی *اسینتوباکتر بومانی* را از نظر تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که در ۶۳٪ سویه های مطالعه شده تشکیل دهنده بیوفیلم بودند(۲۷). ارباب سلیمانی و همکاران نشان دادند که ۶۰ درصد جدایه های *اشریشیا کلی* از نظر توانایی تشکیل بیوفیلم، بسیار قوی بودند (۲۸).

در مطالعه حاضر تاثیر غلظت های ۵۱۲ تا ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذره نقره به صورت غلظت های متوالی بررسی شد. نانوذره نقره در غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر ۵۲/۵٪ (۲۱ سویه)، در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی لیتر ۴۵٪ (۱۸ سویه) و در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر ۲/۵٪ (۱ سویه) اثر بازدارندگی داشت. Morones و همکاران فعالیت آنتی باکتریای نانوذرات نقره را بر روی ۴ نوع باکتری گرم منفی (*سودوموناس ائروژینوزا*، *سالمونلاتیفی*، *ویبریوکلرا* و *اشرشیا کلی*) بررسی کردند، آنها دریافتند که نانوذرات نقره به سطح دیواره سلولی باکتری ها متصل و باعث تخریب غشا شده و نفوذپذیری غشا را با آزادسازی یون نقره مختل می کند(۲۵) .Sondi و همکاران نشان دادند که نانوذرات نقره بر روی سلول های باکتری *اشریشیا کلی* انباشته می شوند و برخی به داخل سلول نفوذ می کنند که تفاوت در توزیع نانوذرات در داخل سلول می تواند ناشی از اندازه نانو ذرات باشد (۲۹). در گزارشی دیگر Shrivastava و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Guzman و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره روی باکتری های مختلف مانند *اشریشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اعلام داشته اند که هر چند فعالیت نانوذرات وابسته به غلظت است ولی برای باکتری های گرم منفی به نسبت گرم مثبت این اثر چشمگیرتر بوده است (۳۰و۳۱). 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 فیزیکوشیمیایی نانوذرات مرتبط است (۳۲).

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه مشخص شد که با تاثیر غلظت های MIC، ۱/۲، ۲ و ۴ برابر غلظت MIC نانوذره نقره بر روی روند تشکیل بیوفیلم با افزایش غلظت نانوذره از میزان تشکیل بیوفیلم در سویه های مورد مطالعه کاسته می شود. به عنوان مثال ۲۰٪ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* تشکیل دهنده بیوفیلم، در اثر مواجه با غلظت ۱/۲MIC، ۳۰٪ سویه های *اسینتوباکتر*

بومانی در حضور غلظت 2MIC، ۱۰٪ سویه های *اشریشیا کلی* و ۵۰٪ سویه های *سودوموناس ائروژینوزا* در حضور غلظت 4MIC نانوذره نقره، بیوفیلم منفی مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست امده نانوذره نقره در غلظت های پایین تر اثر مهاری بیشتری بر تشکیل بیوفیلم سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به باکتری های گرم منفی مورد مطالعه داشته است.

Hendiani اثرات نانوذرات نقره به تنهایی و در ترکیب با کشنده های زیستی و ایمی پنم بر ضد بیوفیلم های *اسینتوباکتربومانی* و فرم پلانکتونی را بررسی کرد. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره به تنهایی می توانند سبب مهار تشکیل بیوفیلم شوند اما اثر آن ها در ترکیب با ایمی پنم بر اشکال بیوفیلم ها و شکل پلانکتونی *اسینتوباکتربومانی* موثرتر است (۳۳). مرتضوی نشان داد نانوذرات کلوئیدی نقره می توانند در غلظت کمتر از ۰/۵ میکروگرم مانع تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* شوند و در غلظت های بالاتر(۱۵۰< میکروگرم بر میلی لیتر) توانست بیوفیلم تشکیل شده را از بین ببرد (۳۴). طی مطالعه ای Kalishwaralal و همکاران نشان دادند که نانوذرات نقره علیه *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* فعالیت ضدبیوفیلمی دارند. نتایج حاصله نشان داد که نانوذرات نقره با متوسط اندازه ۵۰ نانومتر در غلظت ۱۰۰ نانومولار می توانند تشکیل بیوفیلم را تقریبا به یک میزان در باکتری های گرم منفی و گرم مثبت مهار کنند (۳۵). نانوذرات نقره با چسبیدن به سلول باکتری، تشکیل بیوفیلم را به تأخیر می اندازند که این عمل باعث می شود گروهی از باکتری ها نتوانند تثبیت شوند و تکثیر یابند. تشکیل کلونی، رشد سلول باکتری و تشکیل ماتریکس های بیوفیلمی فشرده میکروبی، باکتری ها را در مقابل سیستم دفاعی میزبان مقاوم می کند که نانوذرات از تشکیل این عوامل دفاعی میکروب در برابر سیستم ایمنی میزبان جلوگیری می کنند. نانوذرات آنزیم ها و DNA باکتری ها را غیر فعال می نمایند (۳۶و۳۷).

با توجه به بررسی آب گریزی سطحی سویه ها در پژوهش حاضر به روش MATH مشخص گردید از میان ۴۰ ایزوله مورد مطالعه تنها ۲ سویه از باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* دارای آب گریزی سطحی متوسط بوده و سایر سویه ها آب گریزی سطحی ضعیف داشتند. همچنین با تاثیر غلظت های مختلف نانوذره نقره بر آب گریزی سطحی متوسط سویه های *سودوموناس ائروژینوزا* تغییری در این مطالعه مشاهده نشد.

ارباب سلیمانی و همکاران طی مطالعه ای نشان دادند که باکتری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن، با آب گریزی سطحی ۲۳٪ توانایی تشکیل بیوفیلم را دارد (۲۸). Gogra و همکاران میانگین درصد آب گریزی سطحی برای جدایه های *اشریشیا کلی* را ۶۴/۹۷ ٪ گزارش کردند (۳۸). Kaira و همکاران در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که ۲۷/۶۴٪ سویه های یوروپاتوژن مورد بررسی دارای قدرت آب گریزی سطحی بودند (۳۹). Gogra و همکاران طی مطالعه ای میانگین درصد آب گریزی سطحی سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس*(۸۰٪)، *اشریشیا کلی*(۶۵٪) و *اسپرژیلوس نایجر*(۶۰٪) را ۶۸/۳۳٪ محاسبه کردند (۳۸).

نتیجه گیری

با توجه به مطالب ذکر شده میتوان نانوذرات نقره را جایگزین مناسبی برای از بین بردن باکتری موجود در بیوفیلم در نظر گرفت. نانوذرات کلوئیدی نقره در غلظت های پایین با اثر سمیت کم توانایی مهار تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، *سودومونای ائروژینوزا* و *اسینتوباکتر بومانی* را داشتند. باکتری های مورد بررسی در این مطالعه آب گریزی سطحی ضعیفی داشتند که نشان می دهد در روش به کار رفته در این مطالعه آب گریزی سطحی نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم ندارد و احتمالا عوامل در تشکیل بیوفیلم موثرند. با توجه به این امر می توان پیشنهاد داد که از این ترکیبات در تهیه روکش های پروتزها و وسایل و یا پوشاندن سطوح حساس برای ممانعت از ایجاد بیوفیلم های میکروبی در بیمارستان ها، مراکز درمانی، مراکز تهیه و بسته بندی مواد غذایی و آرایشی و بهداشتی استفاده شود.

تقدیر وتشکر

مطالعه حاضر در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی انجام گردید. از کارشناس محترم بخش میکروبیولوژی آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی بدین وسیله تشکر می گردد.

منابع مورد استفاده

1- Berlanga, M., Guerrero, R., 2016. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. Microb Cell Fact . 15,165-175.
2- Flemming, H., Wingender, J., Szewzyk, U., 2016. Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Rev Microbiol. 14,563-575.
3- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., et al. 2015. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. Front Microbiol. 6,841-866.
4- Limoli, D., Jones, C., Wozniak, D., 2015. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. Microbiol Spectr . 1,30-33
5- Shank, E. A., Kolter, R., 2020. New developments in microbial interspecies signalling. Curr Opin Microbiol. 12,205-214.
6- Liu, Y., Zhang, J., & Ji, Y., 2020. Environmental factors modulate biofilm formation by Staphylococcus aureus. Science Progress. 103(1) 1–14.
7- Abdi-ali, A., Hendiani, S., Mohammadi, P., Gharavi, S., 2014. Assessment of biofilm formation and resistance to imipenem and ciprofloxacin among clinical isolates of acinetobacte rbaumannii in Tehran. Jundishapour J Microbiol. 7(1),8606.
8- Pourhajibagher, M., Hashemi, F.B., Pourakbari, B., Aziemzadeh, M., Bahador, A., 2016. Antimicrobial resistance of acinetobacter baumannii to imipenem in Iran a systematic review and meta-analysis. Open Microbiol J. 10, 32-42.
9- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., Lewenza, Sh., 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms. PLOS pathogens. 4(1): 1-11.
10- Lüthje, P., Brauner, A., 2014. Virulence factors of uropathogenic E. coli and their interaction with the host. Adv Microb Physiol. 65(4):337-372.
11- Misawa, Y., Kelley, K.A., Wang, X., 2015. Staphylococcus aureus colonization of the mouse gastrointestinal tract is modulated by wall teichoic acid, capsule, and surface proteins. 11(7), 1-21.
12- Harapanahalli, A.K., Chen, Y., Li, J., 2015. Influence of adhesion force on icaa and cida gene expression and production of matrix components in Staphylococcus aureus biofilms. Appl Environ Microbiol. 15, 3378-69.
13- Das, M.C., Sandhu, P., Gupta, P., 2016. Attenuation of Pseudomonas aeruginosa biofilm formation by Vitexin: A combinatorial study with azithromycin and gentamicin. Sci Rep. 6, 233-47.
14- Donelli, G., Vuotto, C., 2014. Biofilm based infections in long term care facilities. Future Microbiol. 9, 88-175.
15- Kanematsu, H., Ikigai, H., Yoshitake, M., 2009. Evaluation of various metallic coatings on steel to mitigate biofilm formation. Int J Mol Sci. 10(2) :559 -71.
16- Li, Y., Leung, P., Yao, L., Song, Q.W., 2006. Newton E. Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles. J Hosp Infect. 62(1): 58 -63.
17- Sadiq, I.M., Chowdhury, B., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., 2009. Antimicrobial sensitivity of Escherichia coli to alumina nanoparticles. Nanomedicine. 5(3) :282 -6.
18- Ramage, G., Martínez, J.P., López-Ribot, J.L., 2006. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS yeast research. 6(7):979-86.
19- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 284(5418):1318-22.

20- Kolwzan, B., 2011. Analysis of biofilms-their formation and functioning. Ochrona Srodowiska. 33(4):3-14.
21- Myszka, K., Czaczyk, K., 2011. Bacterial biofilms on food contact surfaces-a review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. 61(3):173-80.
22- Lozovskis, P., Jankauskaitė, V., Guobienė, A., Kareivienė, V., Vitkauskienė, A., 2020. Effect of graphene oxide and silver nanoparticles hybrid composite on P.aeruginosa strains with acquired resistance genes. International Journal of Nanomedicine. 15:5147.
23- Ciriminna, R., Albo, Y., Pagliaro, M., 2020. New antivirals and antibacterials based on silver nanoparticles. ChemMedChem. 15(17), 1619-1623.
24- Hwang, E.T., Lee, J.H., Chae, Y.J., Kim, Y.S., Kim, B.C., Sang, B.I., et al. 2008. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. Small. Methal nanoparticle in Pharma. 4(6):746-50.
25- Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., et al.2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 16(10):23-46.
26- Khoramian, B., Emaneini, M.E., Bolourchi, M., Eslampour, M.A., Niasari-Naslaji, A., Aligholi, M., Barin, A., Sattari, S., Hovareshti, P., 2010. Evaluation of the biofilm-forming ability of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis in Iran. Journal of Comparative Pathology. 4,109-114.
27- Rodríguez-Baño, J., Marti, S., Soto, S., Fernández-Cuenca, F., Cisneros, J.M., Pachón, J., et al. 2008. Biofilm formation in Acinetobacter baumannii: associated features and clinical implications. Clinical microbiology and infection. 14(3):276-8.
28- Arbab Soleimani, N., Amini, Z., Tajbakhsh, E., 2014. The study of attachment factor and biofilm formation of uropathogenic Escherichia coli isolated from patient with urinary tract infection of Semnan Province. Pajoohande. 18(6):332-6.
29- Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. Journal of colloid and interface science. 275(1):177-82.
30- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., Dash, D., 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. Nanotechnology. 2007;18(22):225103.
31- Guzman, M., Dille, J., Godet, S., 2012. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 8(1):3, 45-47.
32- Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., de Aberasturi. D.J., de Larramendi, I.R., Rojo, T., et al. 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. Trends in biotechnology. 30(10):499-511.
33- Hendiani, S., Abdiali, A., Mohammadi, P., Kharrazi, S., 2015. Synthesis of silver nanoparticles and its synergistic effects in combination with imipenem and two biocides against biofilm producing Acinetobacter baumannii. Nanomed J. 1,28-29.
34- Mortazavi, H., Nakhaei Moghaddam, M., Nejad Shahrokh Abadi, K., 2015. Study of the Effect of Silver Nanoparticles on Biofilms Formation by Staphylococcus epidermidis. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 14(2):125-136.
35- Kalishwaralal, K., BarathManiKanth, S., Pandian, S.R.K., Deepak, V., Gurunathan, S., 2010. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 79(2):340-4.
36- Imani, S., Zagari, Z., Rezaei-Zarchi, S., Zand, A.M., Dorodiyan, M., Bariabarghoyi, H., et al. 2011. Antibacterial effect of CrO and CoFe2O4 nanoparticles upon Staphylococcus aureus. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 1(3):175-81.
37- Schrand, A.M., Rahman, M.F., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Smith, D.A., Syed, A.F., 2010. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. Wiley interdisciplinary reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2(5):544-68.
38- Gogra, A.B., Yao, J., Sandy, E.H., Zheng, S., Zaray, G., Koroma, B.M., et al. 2010. Cell surface hydrophobicity (CSH) of Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Aspergillus niger and the biodegradation of

diethyl phthalate (DEP) via microcalorimetry. Journal of American Science. 6(7):78-88.
39- Kaira, S., Pai, C., 2018. Study of uropathogenic Escherichia coli with special reference to its virulence factors. Int J Community Med Public Health. 1(1):177-81.