مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۴، اردیبهشت ۱۳۹۴، ۱۳۶-۱۲۵

بررسی اثـر نانـوذرات نقـره بر بیـوفیلم‌های ناشی از استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

حانیه مرتضوی[۱]، محبوبه نخعی مقدم[۲]، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی[۳]

دریافت مقاله: ۹۳/۴/۴ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۳/۷/۲۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۱۱/۲۶ پذیرش مقاله: ۹۴/۱/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس پلی‌ساکارید خارج سلولی تولید می‌کند که به عنوان بیوفیلم شناخته می‌شود. بیوفیلم در ایجاد عفونت‌های این باکتری بسیار مؤثر است و می‌تواند روی وسایل پزشکی که در بدن به کار گرفته می‌شوند، ایجاد شود. هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثر نانوذرات نقره کلوئیدی بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و بیوفیلم ناشی از آن بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی تجربی، آزمایشات بر روی ۱۳ ایزوله بالینی و یک سویه استاندارد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (ATCC 12228) انجام شد. حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) و کشندگی (MBC) نانوذرات با روش رقت در آگار تعیین شد. آزمایشات ایجاد بیوفیلم با روش میکروتیتر پلیت و رنگ آمیزی با سافرانین انجام شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه تجزیه تحلیل شدند.

یافته‌ها: میانگین MIC و MBC نانوذرات برای ایزوله‌های بیمارستانی به ترتیب ۱۹/۶۱±۳۵۰ و ppm ۶۴/۰۵±۷۰۷/۶۹ بود و نانوذره در غلظت‌های پایین اثر باکتریواستاتیک داشت. نانوذره در غلظت ppm ۰/۵ اثر ضد بیوفیلمی داشت و با افزایش غلظت تا ppm ۴ اثر ضد بیوفیلمی آن افزایش یافت. همچنین، نانوذره در غلظت‌های بالاتر از ppm ۱۵۰ توانایی از بین بردن بیوفیلم تشکیل شده را داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق نشان داد نانوذرات کلوئیدی نقره توانایی مهار تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس را دارند و می‌توان پیشنهاد داد که از این ترکیبات در تهیه روکش‌های پروتزها و وسایل مصنوعی که در بدن تعبیه می‌شوند و یا پوشاندن سطوح مراکز درمانی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، بیوفیلم، میکروتیتر پلیت

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استادیار،گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
تلفن: ۰۵۱-۳۸۴۳۵۰۵۰، دورنگار: ۰۵۱-۳۸۴۳۵۰۵۰، پست الکترونیکی: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir
۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.2.3.3]

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی از جمله مهمترین مشکلات گریبان‌گیر تمامی بیمارستان‌ها در سراسر دنیا هستند و در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه، هر دو یکی از دلایل مهم مرگ و میر محسوب می‌شوند. شیوع استافیلوکوک‌ها در عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان گسترش زیادی پیدا کرده است و این باکتری یکی از فراوان‌ترین عوامل شایع عفونت‌های خون، چشم، گوش، بینی، قلب و عروقی است. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس پلی‌ساکارید خارج سلولی تولید می‌کند که باعث تشکیل بیوفیلم می‌شود. بیوفیلم در ایجاد عفونت‌های این باکتری بسیار مؤثر است [۱]. بیوفیلم یک مجموعه میکروبی متصل به سطح و محصور در ماتریکس است که سبب قدرتمندی باکتری می‌شود. 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 [۳-۲].

فن‌آوری مدرن امکان استفاده از وسایل جدید پزشکی که در بدن به کار می‌روند (ایمپلنت، لنزهای چشمی، دریچه‌های مصنوعی قلب، کاتتر و ...) را فراهم کرده است. باکتری‌های مختلف که توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند به این وسایل متصل می‌شوند و عفونت ایجاد می‌کنند. آزاد شدن این باکتری‌ها به درون خون باعث یک عفونت منتشره می‌شود که درمان آن به واسطه وجود بیوفیلم مشکل است، چون دفاع میزبان و درمان دارویی را با اختلال روبرو می‌کند [۴]. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به طور فرصت طلب عفونت‌های بیمارستانی یا اکتسابی ایجاد می‌کند که نوع بیمارستانی آن خطر بیشتری برای بیماران دارد. این باکتری توانایی ایجاد بیوفیلم بر روی وسایل، سطوح و تجهیزات پزشکی را دارد [۱] و سبب ایجاد عفونت در مبتلایان به دیالیز، اندوکاردیت (عفونت لایه داخلی قلب) به ویژه در بیماران مبتلا به نقص‌های دریچه قلب یا سپتی سمی در بیماران بستری در بیمارستان می‌شود. آنتی‌بیوتیک انتخابی برای درمان ونکومایسین به همراه ریفامپین یا آمینوگلیکوزید است، اما مشکل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شدن باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها مانند پنی‌سیلین، آموکسی‌سیلین و متی‌سیلین می‌باشد [۱]. بنابراین نیاز به روش‌های جدید درمانی برای مبارزه با استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس است. گسترش علم نانوتکنولوژی در دهه گذشته، فرصت‌هایی را برای کشف اثرات ضدمیکروبی نانوذرات فلزی فراهم آورده است [۵].

نانومواد جایگاه ویژه‌ای در پزشکی به خصوص در تشخیص و درمان بیماری‌های گوناگون دارند. آنتی‌بیوتیک‌ها، تنها تعداد بسیار کمی از عوامل مسبب بیماری‌های مختلف را از بین می‌برند، در حالی که با استفاده از نانوذرات می‌توانیم طیف وسیعی از باکتری‌ها را از بین ببریم. نقره در ابعاد بزرگتر فلزی خاصیت واکنش‌دهی 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 [۶]. استفاده از نقره کلوئیدی اولین بار توسط lee در سال ۱۸۸۹ برای پزشکی به کار

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.2.3.3]

گرفته شد. در جنگ جهانی اول از نقره برای پانسمان زخم و به عنوان ماده ضد عفونی کننده استفاده می‌شد، اما بعدها پنی‌سیلین جایگزین آن شد. در حدود ۱۰۰۰ سال پیش از میلاد مسیح، نقره برای تصفیه آب آشامیدنی و در حدود سال ۱۷۰۰ میلادی، نیترات نقره برای بهبود بیماری‌های مقاربتی و بزاقی استفاده شده است [۸-۷].

با توجه به مطالعات پیشین مبنی بر وجود خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات نقره بر آن شدیم تا اثراین نانوذرات را بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و بیوفیلم ناشی از آن، مورد مطالعه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی تجربی، آزمایشات بر روی ۱۳ ایزوله استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس غیر تکراری و متناوب که از نمونه‌های پوست، خون و ادرار بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان ۱۷ شهریور شهر مشهد در سال ۱۳۹۲ جمع آوری شده بودند، انجام گرفت. باکتری‌ها بر اساس مورفولوژی کلنی، مورفولوژی میکروسکوپی و آزمایشات بیوشیمیایی افتراقی شامل کاتالاز، کواگولاز، تخمیر مانیتول، DNase، حساسیت به نووبیوسین مورد شناسایی قرار گرفتند. در این تحقیق از یک سویه استاندارد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (ATTC ۱۲۲۲۸) نیز استفاده شد.

نانوذره نقره با قطر میانگین ۲۰ نانومتر به صورت محلول کلوئیدی از شرکت Nanosunny (ساخت کشور آمریکا) در مشهد خریداری و قطر نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی اندازه‌گیری و از سوسپانسیون نانوذره رقت‌های سری آماده شد.

آزمایشات حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) نانوذرات در محیط مولر هینتون آگار با روش Agar dilution مطابق با استانداردهای CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) انجام شد. سوسپانسیون نانوذرات نقره با غلظت‌های مختلف تهیه و به محیط مذاب 45^oC در چاهک‌های میکروپلیت ۲۴ خانه‌ای از جنس پلی استیرنی اضافه شد. طوری که غلظت نانوذره در چاهک‌ها ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ... ، ۸۰۰ ppm بود. به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد باکتریایی تلقیح شد. رشد و عدم رشد باکتری در غلظت‌های مختلف نانوذره بعد از گذشت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای 37^oC تعیین گردید. برای تعیین MBC، از سطح چاهک‌های فاقد رشد به پلیت‌های فاقد نانوذرات تلقیح و در گرمخانه 37^oC به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. تشکیل کلنی بر سطح پلیت، زنده بودن باکتری‌ها را تأیید می‌کند و عدم تشکیل کلنی باکتری نشان می‌دهد که باکتری در آن غلظت (MBC) کشته شده است. برای اطمینان، آزمایشات سه بار تکرار شدند.

در ابتدا توانایی تشکیل بیوفیلم توسط هر کدام از ۱۳ ایزوله بالینی و همینطور سویه استاندارد با روش اصلاح شده میکروتیتر پلیت بررسی شد [۹]. از جمله اصلاحات انجام شده، استفاده از آب مقطر برای شستشو به جای فسفات بافر نمکی و زمان گرمخانه‌گذاری بیشتر بود. برای این منظور به تمام چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، ۱۸۰ میکرولیتر محیط تریپتون سوی براث یا TSB (Tryptone Soy Broth) و سپس به هر چاهک ۱۰

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.2.3.3]

میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد. در نهایت به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون خالص باکتریایی با OD_{620} =۰/۰۱ (Optical Density) اضافه گردید، طوری که حجم محتویات هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر شد. از چاهک‌های ردیف اول به عنوان شاهد منفی (بلانک) استفاده شد که حاوی فقط ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB بدون باکتری بود. سپس میکروپلیت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷°C قرار گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت میکروپلیت از گرمخانه خارج و محتویات آن به آرامی‌خالی شد و چاهک‌ها سه بار با آب مقطر شسته شدند. برای تثبیت بیوفیلم از ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه و برای رنگ‌آمیزی از ۲۰۰ میکرولیتر سافرانین ۰/۰۲۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. بعد از خالی کردن محتویات چاهک‌ها، میکروپلیت چندین بار با آب مقطر شست و شو و در نهایت خشک گردید. ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ به عنوان حلال اضافه گردید و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه جذب چاهک‌ها توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. آزمایش برای جدایه استاندارد و هر کدام از باکتری‌ها سه بار تکرارگردید.

اثرات ضد بیوفیلمی نانوذرات کلوئیدی نقره با روش میکروتیتر پلیت اصلاح شده بررسی شد [۹]. برای این منظور ابتدا به تمام چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ۱۸۰ میکرولیتر از محیط TSB و سپس به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های سری نانوذرات کلوئیدی نقره اضافه گردید. در نهایت به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون خالص باکتریایی (OD_{620}=۰/۰۱) تلقیح شد. طوری که حجم هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر و غلظت نانوذرات کلوئیدی نقره در چاهک‌ها به ترتیب ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ppm ۱۶۰ بود. چاهک‌های ردیف اول به عنوان شاهد حاوی ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت TSB، ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و چاهک‌های بلانک فقط حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط TSB و فاقد باکتری بودند. بعد از این که میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت، باکتری‌ها مشابه روش قبلی تثبیت و رنگ آمیزی شدند. آزمایش‌ها سه بار تکرار و پس از خواندن جذب، میانگین داده‌ها مقایسه شد.

برای بررسی اثر نانوذرات نقره بر بیوفیلم تشکیل شده ابتدا به تمام چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، ۱۸۰ میکرولیتر از محیط TSB و سپس ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی با غلظت استاندارد اضافه شد. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷°C قرار گرفت و از چاهک‌های شاهد نیز استفاده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت میکروپلیت از گرمخانه خارج و به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از رقت‌های سوسپانسیون کلوئیدی نقره اضافه گردید. غلظت‌های نهایی در هر چاهک با غلظت ۱۶۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ و ppm ۴۰۰ بود. بعد از گذشت ۳ ساعت محتویات میکروپلیت به آرامی خارج و چاهک‌ها سه بار با آب مقطر شست و شو شدند [۱۰]. بعد از تثبیت محتویات چاهک‌ها با اتانول و رنگ آمیزی با سافرانین، مشابه روش‌های قبلی، جذب رنگ حل شده در اسید استیک توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. این آزمایش نیز برای هر باکتری سه بار تکرار و میانگین‌ها در نظر گرفته شدند.

در این تحقیق از آماره‌های توصیفی میانگین، انحراف معیار و نمودار برای توصیف داده‌ها استفاده شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ مورد تجزیه و تحلیل

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.2.3.3]

قرار گرفتند. اختلاف بین مقادیر OD و میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) مقایسه شدند و سطح معنی داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از آزمایش‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی مختلف بر روی ایزوله‌ها نشان داد که باکتری‌های جدا شده، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بودند.

حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) نانوذره کلوئیدی نقره برای سویه استاندارد ppm ۱۰۰ بود که در این غلظت اثر باکتریواستاتیک داشت و در غلظت‌های بالاتر، ppm ۴۰۰، اثر باکتری کشی داشت. MIC و MBC برای ایزوله‌های بیمارستانی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به ترتیب ۴۳۴/۶ و ppm ۷۳۸/۵ بود که در مقایسه با سویه استاندارد مقادیر آنها بیشتر بود. همچنین، MBC نانوذرات نقره از MIC بیشتر است که نشان می‌دهد نانوذرات کلوئیدی نقره در غلظت MIC فقط از رشد باکتری‌ها ممانعت می‌کنند و در غلظت‌های بالاتر باکتری را می‌کشند.

آزمایش توانایی تشکیل بیوفیلم در ایزوله‌های بالینی و سویه استاندارد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از طریق اندازه گیری جذب نوری توسط دستگاه الایزاریدر بعد از گذشت ۲۴ ساعت مورد سنجش قرار گرفت و نتایج به دست آمده در جدول ۱ دسته بندی شد.

جدول ۱- جذب نوری (OD) باکتری های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به دنبال تشکیل بیوفیلم بعد از ۲۴ ساعت

باکتری	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	انحراف معیار ± میانگین	شاهد
سویه استاندارد	۰/۷۲۰	۰/۷۱۹	۰/۷۱۵	۰/۷۱۸±۰/۰۰۱۵	۰/۳۲۵
ایزوله۱	۰/۷۴۴	۰/۷۴۰	۰/۷۴۵	۰/۷۴۳±۰/۰۰۱۵	۰/۳۲۴
ایزوله۲	۰/۶۱۴	۰/۶۱۸	۰/۶۱۲	۰/۶۱۴±۰/۰۰۱۷	۰/۳۲۵
ایزوله۳	۰/۵۸۳	۰/۵۸۱	۰/۵۷۹	۰/۵۸۱±۰/۰۰۱۱	۰/۳۲۷
ایزوله۴	۰/۵۷۱	۰/۵۷۴	۰/۵۷۳	۰/۵۷۲±۰/۰۰۰۸	۰/۳۲۷
ایزوله۵	۱/۶۹۰	۱/۷۳۰	۱/۷۰۰	۱/۷۰۶±۰/۰۱۲۰	۰/۳۲۶
ایزوله۶	۰/۴۸۳	۰/۴۸۸	۰/۴۸۹	۰/۴۸۶±۰/۰۰۱۸	۰/۳۲۵
ایزوله۷	۱/۰۸۹	۱/۰۸۰	۱/۰۸۵	۱/۰۸۴±۰/۰۰۲۶	۰/۳۲۴
ایزوله۸	۰/۴۰۸	۰/۴۰۵	۰/۴۰۱	۰/۴۰۴±۰/۰۰۲۰	۰/۳۲۳
ایزوله۹	۰/۹۶۸	۰/۹۶۳	۰/۹۶۰	۰/۹۶۳±۰/۰۰۲۳	۰/۳۲۶
ایزوله۱۰	۰/۴۰۳	۰/۴۰۸	۰/۴۰۷	۰/۴۰۶±۰/۰۰۱۵	۰/۳۲۷
ایزوله۱۱	۰/۸۹۹	۰/۸۹۸	۰/۸۹۶	۰/۸۹۷±۰/۰۰۰۸	۰/۳۲۴
ایزوله۱۲	۰/۶۸۰	۰/۶۸۴	۰/۶۸۳	۰/۶۸۲±۰/۰۰۱۲	۰/۳۲۳
ایزوله۱۳	۰/۶۸۰	۰/۶۸۸	۰/۶۸۵	۰/۶۸۴±۰/۰۰۲۳	۰/۳۲۱

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.2.3.3]

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، ایزوله‌های شماره ۶، ۸ و ۱۰ نسبت به سایر ایزوله‌ها بیوفیلم ضعیف تری در طی ۲۴ ساعت تشکیل دادند، ولی در مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت یعنی زمان بیشتر بیوفیلم بیشتری تشکیل دادند. میانگین جذب نوری بعد از ۴۸ ساعت، برای ایزوله‌های ۶، ۸ و ۱۰ به ترتیب ۰/۶۸۶±۰/۰۰۱۴، ۰/۷۰۲±۰/۰۰۲۷ و ۰/۷۲۶±۰/۰۰۱۷ و بعد از ۷۲ ساعت برای همین ایزوله‌ها به ترتیب ۰/۸۸۵±۰/۰۰۳۵، ۰/۸۸۴±۰/۰۰۲۳ و ۰/۹۶۶±۰/۰۰۱۴ بود.

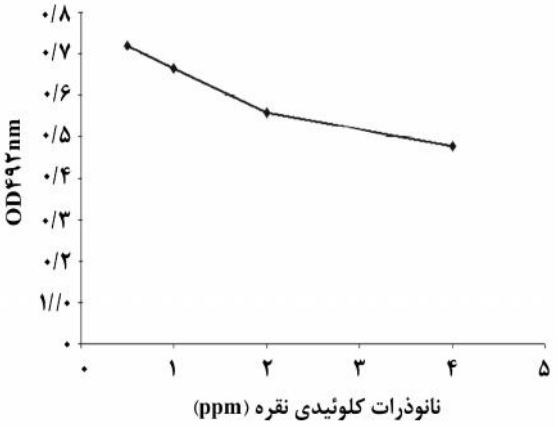
تشکیل بیوفیلم در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بررسی شد. میانگین جذب نوری (OD) در طول موج ۴۹۲ نانومتر پس از سه بار تکرار آزمایشات سنجش توانایی نانوذرات در ممانعت از تشکیل بیوفیلم در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که جدول ۲ نشان می‌دهد، جذب نوری به دنبال افزایش غلظت نانوذره در چاهک‌ها در مقایسه با کنترل مثبت کم شده که نشان دهنده آن است که میزان تشکیل بیوفیلم در حضور نانوذره کاهش یافته است. نمودار ۱ نشان می‌دهد با افزایش غلظت نانوذره نقره اثر ضد بیوفیلمی آن نیز افزایش می‌یابد.

جدول ۲- میانگین جذب نوری (OD) باکتری‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به دنبال تشکیل بیوفیلم در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات محلول کلوئیدی نقره

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	کنترل منفی	کنترل مثبت	غلظت نانوذره نقره (ppm) ۰/۵	۱	۲	۴
سویه استاندارد (ATCC=12228)	۰/۳۲۱	۰/۷۱۷	۰/۷۰۶	۰/۶۹۶	۰/۶۶۲	۰/۴۰۲
ایزوله۱	۰/۳۲۵	۰/۷۴۴	۰/۷۲۵	۰/۶۳۷	۰/۵۳۷	۰/۳۵۶
ایزوله۲	۰/۳۲۳	۰/۶۱۵	۰/۶۰۳	۰/۵۹۳	۰/۴۸۳	۰/۳۹۶
ایزوله۳	۰/۳۲۵	۰/۵۸۱	۰/۵۷۳	۰/۵۵۹	۰/۳۹۶	۰/۳۸۵
ایزوله۴	۰/۳۳۲	۰/۵۷۳	۰/۵۵۵	۰/۵۴۳	۰/۴۶۶	۰/۳۶۶
ایزوله۵	۰/۳۳۳	۱/۷۰۰	۱/۵۲۷	۱/۳۳۳	۱/۲۲۲	۱/۱۰۷
ایزوله۶	۰/۳۳۱	۰/۴۸۸	۰/۴۷۲	۰/۴۰۲	۰/۳۹۴	۰/۳۶۰
ایزوله۷	۰/۳۲۰	۱/۰۸۵	۱/۰۶۸	۱/۰۰۷	۰/۹۸۷	۰/۷۵۴
ایزوله۸	۰/۳۲۴	۰/۴۰۶	۰/۳۹۸	۰/۳۷۲	۰/۳۵۶	۰/۳۵۵
ایزوله۹	۰/۳۲۸	۰/۹۶۴	۰/۹۴۳	۰/۸۸۹	۰/۷۹۸	۰/۵۹۰
ایزوله۱۰	۰/۳۲۵	۰/۴۰۶	۰/۳۹۰	۰/۳۷۱	۰/۳۶۴	۰/۳۶۶
ایزوله۱۱	۰/۳۳۱	۰/۸۹۵	۰/۸۷۷	۰/۷۴۱	۰/۶۹۴	۰/۵۰۱
ایزوله۱۲	۰/۳۳۱	۰/۶۸۳	۰/۶۶۴	۰/۶۰۰	۰/۳۷۵	۰/۳۶۹
ایزوله۱۳	۰/۳۳۳	۰/۵۹۷	۰/۵۸۰	۰/۴۴۹	۰/۳۸۲	۰/۳۸۰
انحراف‌معیار±میانگین	۰/۳۲۷±۰/۰۰۰۷	۰/۷۳۲±۰/۰۴۵۸	۰/۷۱۹±۰/۰۴۵	۰/۶۶۴±۰/۰۴۱	۰/۵۸۰±۰/۰۴۰	۰/۴۷۷±۰/۰۳۲

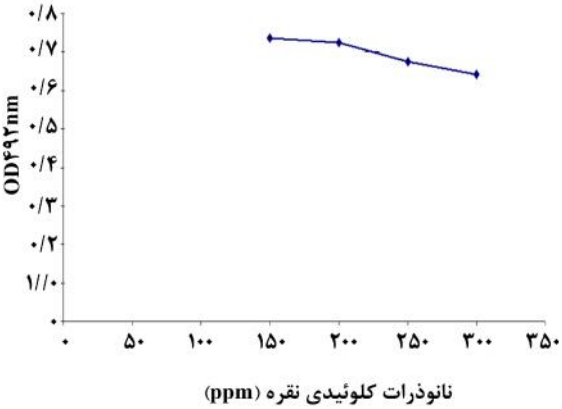
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.2.3.3]



نمودار ۱- اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات کلوئیدی نقره بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

برای سنجش توانایی نانوذرات در از بین بردن بیوفیلم تشکیل شده بعد از تشکیل بیوفیلم به مدت ۲۴ ساعت، چاهک‌ها به مدت ۳ ساعت با غلظت‌های مختلف نانوذرات تیمار شدند. نتایج نشان داد محلول کلوئیدی نانوذرات نقره در غلظت‌هایی که توانایی مهار تشکیل بیوفیلم را دارند، نمی‌توانند بیوفیلم تشکیل شده را از بین ببرند، بلکه در غلظت‌های بالاتر (بالاتر از ۱۵۰ ppm)، بیوفیلم تشکیل شده را از بین می‌برد. با افزایش غلظت نانوذره، اثر ضد بیوفیلمی آن افزایش داشت و اختلاف جذب نوری برای غلظت‌های مختلف به تفکیک ایزوله‌ها معنی دار بود ($p<۰/۰۱$).



نمودار ۲- اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات کلوئیدی نقره بر بیوفیلم تشکیل شده باکتری‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بر اساس میزان جذب نوری

غلظت‌های ۱۵۰ ppm، ۲۰۰ ppm، ۲۵۰ ppm و ۳۰۰ ppm به ترتیب باعث کاهش درصد OD به میزان ۲/۱٪، ۵٪، ۸/۲٪ و ۱۲٪ شد. نمودار ۲ اثر غلظت‌های مختلف نانوذره را بر بیوفیلم تشکیل شده نشان می‌دهد.

بحث

نانوذرات نقره به دلیل خواص ضد میکروبی بی‌نظیر و سمیت کم برای سلول‌های پستانداران به یکی از رایجترین نانوذرات در محصولات مصرفی تبدیل گشته‌اند. در میان نانومواد دارای خاصیت ضدمیکروبی، نانوذرات نقره به صورت گسترده استفاده می‌شوند. این ذرات به عنوان عوامل ضد میکروبی در بیش از ۱۰۰ محصول مصرفی از مکمل‌های غذایی گرفته تا پوشش دهندگان سطوح به کار رفته‌اند [۱۱].

در پژوهش حاضر اثر نانوذرات نقره در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به خوبی نشان داد نانوذرات کلوئیدی نقره می‌توانند مانع تشکیل بیوفیلم این باکتری شوند. نانوذره نقره در غلظت ppm ۰/۵≥ مانع تشکیل بیوفیلم شد و در غلظت‌های بالاتر (ppm ۱۵۰≥) توانست بیوفیلم تشکیل شده را از بین ببرد.

محققین در بررسی اثر آنتی‌بیوتیک‌های کینولونی بر بیوفیلم‌های تولید شده بوسیله سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری دریافتند که این باکتری‌ها در حالت بیوفیلم مقاومت بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند [۱۲]. Chaudhari و همکارانش نشان دادند نانوذرات نقره با میانگین قطر ۳۹ نانومتر و غلظت mM ۱ می‌توانند سبب کاهش تشکیل بیوفیلم ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس شوند [۱۳].

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-08]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.2.3.3]

Shahrokh و همکارش تأثیر محلول کلوئیدی نانوذرات نقره را بر تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه قرار دادند. آنها گزارش کردند محلول کلوئیدی نانوذره نقره، در غلظت نهایی ppm ۲ می‌تواند تشکیل بیوفیلم این باکتری را کاهش دهد [۱۴]. نتایج آنها مشابه با پژوهش حاضر است که محلول کلوئیدی نانوذره نقره در غلظت نهایی ppm ۴-۲ توانست باعث کاهش تشکیل بیوفیلم باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس شود.

در تحقیقی دیگر بیوفیلم تشکیل شده باکتری‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و سودوموناس آئروژینوزا با غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره به مدت ۲ ساعت تیمار گردید و محققین گزارش کردند که نانوذره نقره در غلظت ۱۰۰ نانومولار توانایی از بین بردن بیوفیلم تشکیل شده این باکتری‌ها را دارد [۱۵].

Kim گزارش کرد که نانوذرات نقره با قطر حدود ۲۰ نانومتر می‌توانند مانع رشد استافیلوکوکوس اورئوس شوند و MIC نانوذرات را ۳۳ نانومولار گزارش کردند [۱۶]. Niakan و همکاران، MIC و MBC نانوذرات نقره کلوئیدی با قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر را برای سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۱۰ و ppm ۵۰۰ و MIC و MBC را برای استافیلوکوکوس اورئوس برابر و حدود ppm ۱۰ گزارش کردند [۱۷]. در پژوهش حاضر حداقل غلظت نانوذرات کلوئیدی نقره با قطر ۲۰ نانومتر که مانع رشد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس شد، برای سویه استاندارد ppm ۱۰۰ و برای ایزوله‌های بالینی ppm ۴۳۴/۶ بود و در این غلظت‌ها نانوذره اثر باکتریواستاتیک داشت.

همانطور که نتایج تحقیق حاضر و سایر تحقیقات نشان می‌دهد، نانوذرات نقره اثرات ضد باکتریایی علیه باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس دارند. اختلاف در مقادیر MIC و MBC می‌تواند مربوط به قطر نانوره، غلظت و نوع آن باشد. هر نوع از مواد نانو با توجه به ویژگی‌هایی مانند اندازه، شکل، نوع ترکیب سورفکتانت، پایدار کننده و روش تهیه منحصر به خود هستند و این ویژگی‌های نانوذرات بر خاصیت ضدمیکروبی آنها اثر دارد. در منابع مختلف اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره به ناپایدار کردن پتانسیل غشایی (که نتیجه آن کاهش سطح آدنوزین تری‌فسفات درون سلولی است)، اتصال به گروه‌های عاملی پروتئین‌ها (از بین رفتن خواص اصلی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها)، نفوذ به درون سلول‌ها، غیر فعال کردن آنزیم‌ها و تولید هیدروژن پراکسید و در نهایت مرگ باکتری نسبت داده شده است. نانوذرات نقره خصوصیات ضد باکتریایی بارزی را نسبت به سایر نمک‌های نقره از خود نشان می‌دهند که به دلیل سطح بالای آنها می‌باشد که تماس مؤثرتری را با میکروارگانیسم برای آن‌ها فراهم می‌آورد [۱۹-۱۸]. نانوذرات نقره با چسبیدن به سلول باکتری، تشکیل بیوفیلم را به تأخیر می‌اندازند که این عمل باعث می‌شود گروهی از باکتری‌ها نتوانند تثبیت شوند و تکثیر یابند. تشکیل کلونی، رشد سلول باکتری و تشکیل ماتریکس‌های بیوفیلمی فشرده میکروبی، باکتری‌ها را در مقابل سیستم دفاعی میزبان مقاوم می‌کند که نانوذرات از تشکیل این عوامل دفاعی میکروب در برابر سیستم ایمنی میزبان جلوگیری می‌کنند. نانوذرات آنزیم‌ها و DNA باکتری‌ها را غیر فعال می‌نمایند [۲۲-۲۰].

با توجه به مطالب ذکر شده می‌توان نانوذرات نقره را جایگزین مناسبی برای از بین بردن باکتری‌های موجود در بیوفیلم در نظر گرفت. نانوذرات کلوئیدی نقره توانایی مهار تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس را دارند و می‌توان پیشنهاد داد که از این ترکیبات در تهیه

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.2.3.3]

روکش‌های پروتزها و وسایل مصنوعی که در بدن تعبیه می‌شوند و یا پوشاندن سطوح حساس برای ایجاد بیوفیلم‌های میکروبی در بیمارستان‌ها و مراکز درمانی استفاده شود. مهمترین محدودیت این تحقیق محدودیت زمانی بود.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد نانوذرات کلوئیدی نقره می‌تواند از تشکیل بیوفیلم باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جلوگیری نماید و در غلظت‌های بالاتر توانایی از بین بردن بیوفیلم از قبل تشکیل شده را دارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شده است که بدین وسیله از مسئولین محترم این دانشگاه تشکر و قدردانی می‌شود.

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. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7(8): 555-67.

[3] Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *J Future Microb* 2010; 5(6): 917-33.

[4] Darabi N, Roudbar Mohammadi S, Naderi Manesh H, Mostafai A, Vahidi M. Antifungal effect of Zinc oxide nanoparticles of the standard strains of *Candida albicans* biofim growth on catheters. *Journal of Army University of Medical Sciences I.R.Iran* 2012; 10(3): 207-12. [Farsi]

[5] Blinova I, Ivask A, Heinlaan M, Mortimer M, Kahru A. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *J Environ Pollut* 2010; 158(1): 41-7.

[6] Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: A nanoproduct in medical application. *Toxi Lett* 2008; 176(1): 1-12.

[7] Schmid G. Nanoparticles from theory to application, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, 2004; 192-4.

[8] Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 2009; 27(1): 76-83.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.2.3.3]

[9] Saderi H, Owlia P, Hashemi S. The Effect of essential oil of *Matricaria chamomilla* L. on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Med Microbiol* 2007; 1(2):9-14. [Farsi]

[10] Pompilio A, Pomponio S, Di Vincenzo V, Crocetta V, Nicoletti M, Piovano M, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. *Future Microbiol* 2013; 8(2): 281-92.

[11] Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Res* 2008; 42(18): 4591-602.

[12] Tavakkoli M, Soudi M, Malekzadeh F, Hajy Zarghany G. Effects of quinolones on biofilm formed by *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients with urinary tract infection. *Iran J Med Microbiol* 2008; 2(1): 23-30. [Farsi]

[13] Chaudhari PR, Masurkar SA, Shidore VB, Kamble SP. Effect of biosynthesized silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* biofilm quenching and prevention of biofilm formation. *Nano-Micro Lett* 2012; 4(1): 34-9.

[14] Shahrokh S, Emtiazei G. A comparative study of the effects of colloidal nanosilver and industrial biocide E-265 on bacterial respiration and biofilm formation using microtiterplate method. *J Water Wastewater* 2013; 24 (85): 26-33. [Farsi]

[15] Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. *Colloids Surf B* 79(2): 340-4.

[16] Kim JS. Antibacterial activity of Ag+ ion-containing silver nanoparticles prepared using the reduction method. *Ind J Eng Chem Res* 2007; 13(4): 718-22.

[17] Niakan M, Abassi F, Hamedi R, Aliasghar E. Antibacterial effect of nanosilver colloidal particles and its omparison with dental disinfectant solution against two strains of bacteria. *Daneshvar Medicine* 2012; 19(96): 65-72 [Farsi]

[18] Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 2000; 52(4): 662-8.

[19] Mirjalili M, Yaghmaei N, Mirjalili M. Antibacterial properties of nano silver finish cellulose fabric. *J Nanostructure Chem* 2013; 3:43.

[20] Imani S, Zagari Z, Rezaei-Zarchi S, Zand A, Dorodiyan M, Bariabarghoyi H, et al. Antibacterial effect of CrO and $CoFe_2O_4$ nanoparticles upon *Staphylococcus aureus*. *JFUMS (J Fasa Univ Med Sci)* 2011; 1(3): 175-81. [Farsi]

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.2.3.3]

[21] Jons GL, Muller CT, O'Reilly M, Stickler DJ. Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(2): 266-72.

[22] Schrand AM, Rahman MF, Hussain SM, Schlager JJ, Smith DA, Syed AF. Matal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2010; 2(5): 544-68.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.2.3.3]

Study of the Effect of Silver Nanoparticles on Biofilms Formation by *Staphylococcus epidermidis*

H. Mortazavi[1], M. Nakhaei Moghaddam [2], Kh. Nejad Shahrokhabadi[3]

Received: 25/06/2014 Sent for Revision: 20/10/2014 Received Revised Manuscript: 15/02/2015 Accepted: 08/04/2015

Background and Objective: *Staphylococcus epidermidis* produces extracellular polysaccharide which is known as a biofilm. Biofilm is highly effective in establishing of this bacterium infections and can be formed on medical devices that are used in the body. The purpose of this study was to evaluate the effects of silver colloidal nanoparticles on bacterial growth and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis.*

Materials and Methods: In this empirical and cross-sectional study, experiments were performed on 13 clinical isolated specimens of *Staphylococcus epidermidis* and a reference strain (ATCC 12228). The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of nanoparticles were determined by the agar dilution method. The experiments of biofilm formation were done by micro titer plate method and stained by Safranin. Data were analyzed using ANOVA.

Results: The mean MIC and MBC of nanoparticles for clinical isolated specimens were 350 ± 19.61 ppm and 707.69 ± 64.05 ppm, respectively and nanoparticles had bacteriostatic effect at low concentrations . Nanoparticles showed the anti-biofilm activity at the concentration of 0.5 ppm and this effect enhanced with increasing concentration up to 4 ppm. Nanoparticles at higher concentrations of 150 ppm had the ability to eliminate the pre-formed biofilm.

Conclusion: The results showed that colloidal silver nanoparticles have the ability to inhibit the *S. epidermidis* biofilm formation. It is offered to use these compounds to coat prosthetic devices which are placed in the body or to cover environmental surfaces in medical centers.

Key words: *Staphylococcus epidermidis*, Biofilm, Micro titer plate

Funding: This research was funded personally.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: This research was conducted in accordance with ethical principles on clinical specimens.

How to cite this article: Mortazavi H, Nakhaei Moghaddam M, Nejad Shahrokhabadi Kh. Study of the Effect of Silver Nano particles on Biofilms Formation by Staphylococcus Epidermidis. J RafsanjanUniv Med Sci 2015; 14(2): 125-36. [Farsi]

1- MSc Student, Dept. of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2- Assistant Prof., Dept. of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
(Corresponding Author) Tel: (051) 38435050, Fax: (051) 38435050, E-mail: m.nakhaei@mshdiau.ac.ir
3- Assistant Prof., Dept. of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1394.14.2.3.3]