

## بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات اکسید آهن اصلاح شده با آلزینات بر بیوفیلم باکتری سودوموناس آئروژینوزا

- آلاله جابری جهرمی: گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
- شهره زارع کاریزی\*: گروه ژنتیک و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
- راحله صفایی جوان: گروه بیوشیمی بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۸

### چکیده

سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی است و متاسفانه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری به واسطه وجود ژن‌های مقاومت، حضور پمپ‌های افلاکس و تشکیل بیوفیلم بسیار بالا می‌باشد. از اهداف این مطالعه بررسی اثرات نانوذره اکسید آهن اصلاح شده با آلزینات در برابر بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. در این مطالعه نانوذره اکسید آهن اصلاح شده با پوشش آلزینات به روش هم رسوبی سنتز شد. ویژگی‌های ساختاری نانوذرات توسط روش‌های XRD، FT-IR، DLS و SEM تعیین شد. اثر ضد میکروبی نانوذرات توسط بررسی حداقل غلظت مهاري به روش میکرو دایلوژن برات پس از ارزیابی شدت بیوفیلم سويه‌های بالینی به روش میکرو تیرپلیت ارزیابی گردید. نانوذره اکسید آهن با پوشش آلزینات در غلظت‌های ۰/۲۵۶ تا ۹۰ میکروگرم در میلی‌لیتر توانست تشکیل بیوفیلم را در سويه‌های بالینی سودوموناس مهار کند. مطالعه حاضر روشن نمود، می‌توان از نانوذرات اکسید آهن اصلاح شده با آلزینات به عنوان یک عامل ضد باکتریایی جهت مهار تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا استفاده نمود.

**کلمات کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلم، نانوذرات، مقاومت آنتی‌بیوتیکی



**مقدمه**

شده ناپایدار بوده و به دلیل انرژی سطحی بالایی که دارند، به سادگی تجمع پیدا می‌کنند. تجمع نانوذرات پراکندگی آن‌ها در محیط‌های آبی را تحت تاثیر قرار می‌دهد، از طرفی احتمال انجام فرآیند اکسیداسیون در حضور اکسیژن نیز وجود دارد (Wu و همکاران، ۲۰۱۶؛ Nosrati و همکاران، ۲۰۱۷). روش‌های مختلفی برای اصلاح ساختار نانوذرات اکسید آهن استفاده می‌شود. این روش‌ها شامل استفاده از مواد شیمیایی مانند سیتریک اسید، اولئیک اسید و پلیمرها و استفاده از مولکول‌های زیستی مانند کیتوسان، آلبومین و دکستران می‌باشد. این اصلاحات اثرات قابل توجهی بر زیست‌سازگاری نانوذرات اکسید آهن دارد، هم‌چنین مولکول‌های مختلفی که به نانوذرات اضافه می‌شوند می‌توانند قابلیت جدیدی به نانوذرات اضافه نمایند (Kango و همکاران، ۲۰۱۳). از ماکرومولکول‌های دیگری که برای اصلاح ساختار و ویژگی‌های نانوذرات اکسید آهن استفاده شده است، آلژینات می‌باشد. این ماکرومولکول باعث پایدار شدن نانوذرات اکسید آهن شده و خاصیت مغناطیسی آن‌ها را حفظ می‌کند (Alshehri و همکاران، ۲۰۱۷). هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات اکسید آهن اصلاح شده با آلژینات و ارزیابی اثر آن بر مهار بیوفیلم باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

**مواد و روش‌ها**

**جمع‌آوری نمونه‌های بالینی و شناسایی ایزوله‌ها:** این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۷ و در دانشگاه آزاد واحد پیشوا- ورامین بر روی ۳۰ جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا انجام گردید. نمونه‌های جدا شده شامل نمونه‌های خون، ادرار، زخم، ترشحات و خلط بود که از بیماران بستری در بیمارستان سینا تهران جمع‌آوری شدند. شناسایی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی مانند رنگ‌آمیزی گرم، رشد در محیط مک کانکی آگار، آزمون‌های اکسیداز و کاتالاز، واکنش در محیط TSI، تست OF، بررسی تحرک، تولید اندول و گاز، رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و تولید پیگمان پیوسیانین در محیط مولر هینتون آگار انجام شد.

**ارزیابی میزان بیوفیلم باکتریایی:** جهت بررسی وضعیت تولید بیوفیلم توسط جدایه‌ها از روش کمی میکروتیتر پلیت استفاده گردید. برای این منظور کشت شبانه‌روزی از جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا در محیط تریپتیکاز سوی آگار همراه با گلوکز ۲ درصد انجام شد. سپس یک لوپ پر از باکتری‌های رشد کرده از روی محیط کشت برداشته شده و درون لوله آزمایش درپوش‌دار حاوی محیط تریپتیکاز سوی برات تلقیح داده شد تا زمانی که سوسپانسیون باکتریایی کدورتی معادل نیم مک‌فارلند داشته باشد. ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده به‌درون چاهک پلیت ۹۶ خانه منتقل

بیوفیلم‌ها تجمعات غیر متحرک میکروبی هستند که روی تجهیزات پزشکی و بیمارستانی پدید می‌آیند و از طریق تولید و ترشح مواد پلیمری خارج سلولی خود را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و سیستم ایمنی میزبان و سایر استرس‌های محیطی محافظت می‌کنند (Sharma و همکاران، ۲۰۱۹). سودوموناس آئروژینوزا یکی از باکتری‌هایی است که به‌واسطه تشکیل بیوفیلم قوی همواره مشکلات فراوانی را در مراکز درمانی و بهداشتی ایجاد کرده است (Frieri و همکاران، ۲۰۱۷). بیوفیلم‌ها در نتیجه مکانیسم‌های پیچیده‌ای شامل مقاومت ذاتی، اکتسابی و سازشی یکی از دلایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا مطرح شده‌اند. از مهم‌ترین ویژگی‌هایی که در نتیجه تشکیل بیوفیلم در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نقش دارند شامل بیان متفاوت چندین شبکه ژنی، ماتریکس خارج سلولی و ناهمگونی متابولیک در زیر جمعیت‌های یک کلنی بیوفیلم می‌باشد (Taylor و همکاران، ۲۰۱۴). در حالی که بیوفیلم‌های سودوموناس آئروژینوزا در برابر تنش‌ها و بحران‌های بیرونی به‌شدت مقاوم هستند، می‌توان با جلوگیری از اتصال آن‌ها به سطوح مختلف، مهار سیستم کوئروم سنسینگ، هم‌چنین القا پراکندگی سلول‌های بیوفیلم با آن‌ها مبارزه کرد (Rasamiravaka و همکاران، ۲۰۱۵). یکی دیگر از روش‌هایی که اخیراً جهت مقابله با بیوفیلم باکتری‌ها مطرح شده نانوذرات می‌باشد. تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که نانوذرات دارای طیف وسیعی از خواص ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی هستند. نانوذرات اکسیدروی باعث مهار استافیلوکوکوس می‌شوند و نانوذرات نقره دارای فعالیت ضد میکروبی وابسته به غلظت بر علیه باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلای می‌باشند (Ramalingam و همکاران، ۲۰۱۶). فعالیت ضد میکروبی نانوذرات معمولاً توسط سه مکانیسم عمده توضیح داده می‌شود که شامل القا استرس اکسیداتیو، رهاسازی یون‌های فلزی و مکانیسم غیراکسیداتیو می‌شود. این سه مکانیسم می‌توانند به‌صورت منفرد از هم و یا به‌صورت تجمعی عمل کنند (Jung و همکاران، ۲۰۰۸). نانوذرات اکسید آهن دارای ویژگی‌هایی هم‌چون زیست‌سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و ایمنی خوراکی هستند و در صورت بلع توسط سیستم گوارش انسان مشکلی به‌وجود نمی‌آورند. استفاده از این نانوذرات جهت مصارف انسانی توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) تایید شده است. البته به‌منظور استفاده‌های زیستی و پزشکی نیاز به اصلاح ساختار سطحی این نانوذرات است، تا هم پایداری آن‌ها در محیط‌های فیزیولوژیک افزایش یابد و هم حلالیت آن‌ها در محیط‌های آبی بیش‌تر شود (Huang و همکاران، ۲۰۱۴). سنتز نانوذرات اکسید آهن معمولاً پربازده بوده و تکرارپذیری بالایی دارد. اما نانوذرات اکسید آهن سنتز

شده و پودر سیاه رنگی که  $Fe_3O_4$  یا همان نانو ذره اکسید آهن می باشد (Morovati و همکاران، ۲۰۱۶).

**اصلاح نانوذرات اکسید آهن با آلزینات:** جهت اصلاح ساختار سطحی نانوذرات اکسید آهن از آلزینات استفاده گردید. به این منظور ۰/۱ گرم سدیم آلزینات با وزن مولکولی ۱۲ کیلو دالتون و ویسکوزیته متوسط به ۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شده و به کمک شیکر حل گردید. پس از به دست آمدن محلول کدر و یک دست، pH آن روی ۷ تنظیم گردید. ۲ گرم نانو ذره اکسید آهن را به ۶۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه نموده و با حداکثر قدرت دستگاه به مدت ۳۰ دقیقه سونیکیت گردید. در مرحله بعد بشر حاوی نانو ذره سونیکیت شده بر روی شیکر قرار داده شد و محلول سدیم آلزینات به صورت تدریجی به آن اضافه گردید و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت با بالاترین دور دستگاه هم خورد. در نهایت نانوذرات اصلاح شده با سدیم آلزینات توسط یک میدان مغناطیسی خارجی از مخلوط جمع آوری گردید و چندین بار با آب مقطر و اتانول شستشو داده شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد خشک گردید (El-Shamy و همکاران، ۲۰۱۹).

**ارزیابی ساختاری نانوذرات سنتز شده:** برای بررسی ساختار کلی نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM=canning Electron Microscope) (شرکت TeScan مدل Mira III)، به منظور تعیین توزیع نانوذرات از روش پراکندگی نور پویا (DLS=Dynamic Light Scattering) (شرکت Malvern مدل Zetasizer Nano S)، جهت تعیین ساختار کریستالی نانوذرات از تکنیک تابش اشعه ایکس (X-Ray Diffraction) (شرکت PANalytical مدل X'Pert PRO MPD) و برای تعیین ساختار و شناسایی ترکیبات آلی از طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR= Fourier Transform Infrared Spectroscopy) (شرکت Bruker مدل Tensor27) استفاده شد.

**تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) نانوذرات اکسید آهن اصلاح شده با آلزینات:** جهت مشخص نمودن حداقل غلظت مهاری مربوط به نانوذرات اکسید آهن اصلاح شده از روش میکرو دیالووشن در محیط کشت مولر هینتون برات استفاده گردید. برای این منظور با توجه به مطالعات قبلی (زمانی و همکاران، ۱۳۹۸) از طریق رقیق سازی سریالی، ۷۵ میکرو لیتر از سوسپانسیون نانوذرات اکسید آهن اصلاح شده با غلظت های ۰/۲۵۶، ۰/۱۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر داخل چاهک های پلیت ۹۶ خانه قرار گرفت. سپس ۷۵ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتریایی با کدورت برابر نیم مک فارلند از هر کدام از جدایه ها به چاهک ها افزوده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. پس از ۲۴ ساعت نتایج قرائت شد. در نهایت

شده و پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت با استفاده از انکوباتور شیکردار گرمخانه گذاری شدند. پس از پایان زمان گرمخانه گذاری، چاهک ها خالی شده و دو مرتبه با استفاده از محلول بافر فسفات سالین با pH برابر ۷ شستشو داده شدند. پس از این مرحله پلیت ها در هوای آزاد خشک شده و به مدت ۱۵ دقیقه و با استفاده از متانول ۹۶ درصد تثبیت شدند. جهت رنگ آمیزی از رنگ کریستال ویوله ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه استفاده شد و در نهایت چاهک ها خالی شده و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. جهت بررسی میزان بیوفیلم تشکیل شده، هر چاهک با ۱۰۰ میکرو لیتر محلول اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد پر شده و میزان جذب هر چاهک در طول ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید (McCartney و همکاران، ۱۹۸۹). سوبه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا با کد ATCC 27853 به عنوان شاهد مثبت و ۲۰۰ میکرو لیتر محیط تریپتیکاز سوی برات همراه با ۲ درصد گلوکز به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. این مراحل برای تمامی جدایه ها به صورت سه بار تکرار انجام شد و میزان تشکیل بیوفیلم برای هر جدایه بر اساس جدول ۱ مشخص گردید (رفوئی و همکاران، ۱۳۹۷).

جدول ۱: میزان جذب نوری در انواع بیوفیلم باکتریایی

نوع بیوفیلم	میزان جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر
بیوفیلم قوی (مثبت)	$OD_{570} \geq 1$
بیوفیلم متوسط	$0.1 < OD_{570} < 1$
بیوفیلم منفی (منفی)	$OD_{570} \leq 0.1$

**سنتز نانوذرات اکسید آهن:** مقدار ۲/۳۰۷ گرم  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  و ۳/۹۷ گرم  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده، سپس به یک بالن ۵۰۰ میلی لیتری سه دهانه منتقل شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه سونیکاتور قرار داده شد. مقدار ۷/۴۷ میلی لیتر آمونیاک غلیظ را در یک بالن به حجم ۱۰۰ رسانده و درون قیف جدا کننده (دکانتور) ریخته و قیف به یکی از دهانه های بالن وصل گردید. یک مبرد (کندانسور) همراه با جریان آب به دهانه اصلی بالن سه دهانه متصل کرده و بالن را در حمام پارافین ۸۵ درجه قرار داده و رفلاکس تشکیل گردید. در ادامه آمونیاک با سرعت ۲ قطره بر ثانیه به محلول اضافه شد. پس از اتمام آمونیاک، این رفلاکس به مدت ۲ ساعت در دمای ۸۵ درجه قرار داده شد. سپس محلول را داخل کریستالیزور ریخته و به دلیل خاصیت مغناطیسی نانوذرات اکسید آهن با قرار دادن آهنربا زیر کریستالیزور، محلول به دو فاز تبدیل شد. مایع رویی دور ریخته شد. رسوب به دست آمده ۲ بار توسط آب مقطر و ۲ بار توسط اتانول شسته شد. به منظور خشک شدن، نمونه به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. محلول خشک شده تراشیده



برای هر باکتری، MIC به عنوان کمترین غلظت از نانوذره که مانع رشد آن باکتری شده بود، تعیین شد.

### بررسی اثر نانوذرات اکسید آهن اصلاح شده بر مهار بیوفیلم:

جهت بررسی اثر نانوذرات اکسید آهن اصلاح شده بر قدرت تولید بیوفیلم، از کشت جدایه‌ها در محیط تریپتیکاز سوی برات با کدورتی معادل نیم مک فارلند استفاده گردید. بدین منظور هر میکروپلیت برای دو جدایه استفاده گردید و برای هر جدایه از استوک نانوذره اصلاح شده با غلظت ۴ برابر حداقل غلظت مهار کنندگی استفاده گردید (MIC ۴). در هر ردیف میکروپلیت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت تریپتیکاز سوی برات درون چاهک‌ها ریخته شد، سپس در چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر از استوک نانوذره با غلظت ۴ برابر MIC اضافه شده و عمل رقیق‌سازی سری دوتایی انجام گرفت تا در نهایت غلظت نانوذره در چاهک‌ها به ترتیب برابر با ۲MIC، ۱MIC، ۱/۲MIC و ۱/۴MIC شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری نیم مک فارلند اضافه شد. برای هر جدایه ۵ چاهک از میکروپلیت به عنوان کنترل نانوذره در نظر گرفته شد که تنها محیط کشت و غلظت‌های مختلف نانوذره در چاهک‌ها ریخته شد. هم‌چنین ۵ چاهک هم به عنوان کنترل رشد باکتری در نظر گرفته شد که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند جدایه و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بود. در نهایت میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و میزان تشکیل بیوفیلم به روش ذکر شده اندازه‌گیری شد. برای محاسبه میزان مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها در حضور غلظت‌های مختلف نانو ذره از فرمول زیر استفاده گردید. در نهایت میزان مهار تشکیل بیوفیلم برای هر غلظت از نانوذره بر اساس اختلاف جذب نمونه مورد آزمایش نسبت به جذب نمونه کنترل شد محاسبه شده و برای ۳۰ ایزوله مورد بررسی به صورت میانگین گزارش گردید (شکل ۸). تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گردید و نتایج به دست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند (عباس‌والی و همکاران، ۱۳۹۶).

$$100 \times \frac{\text{جذب نمونه حاوی باکتری و نانوذره} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل رشد هر باکتری}} = \text{درصد مهار تشکیل بیوفیلم}$$

## نتایج

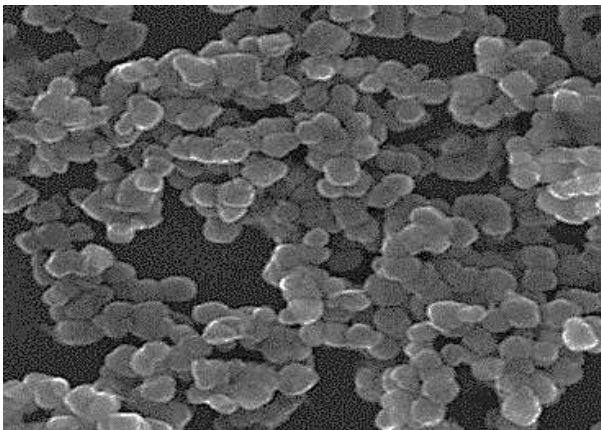
### نتایج توصیفی و تحلیلی نانوذره اکسید آهن قبل و پس از

پوشش‌دار شدن: نتایج مربوط به بررسی مورفولوژی نانوذرات اکسید آهن با استفاده از تکنیک SEM در آمده است. در تحقیق حاضر نانوذرات دارای ساختار مکعبی با سطحی صاف و هموار هستند. شکل ۲: نمودار توزیع اندازه نانوذرات سنتز شده را نشان می‌دهد، اندازه میانگین

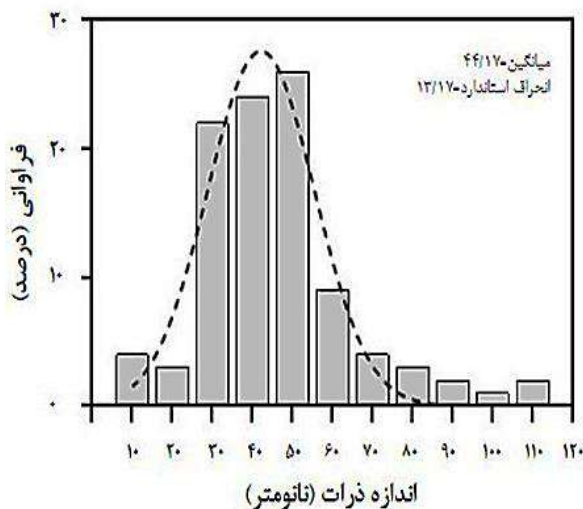
نانوذرات بدون پوشش در حدود ۴۲ نانومتر می‌باشد. شکل‌های ۳ و ۴ به ترتیب تصویر میکروسکوپ نانوذرات اکسید آهن اصلاح شده با پلیمر آلزینات و توزیع اندازه نانوذرات اصلاح شده را نشان می‌دهد. ساختار مکعبی شکل نانوذرات پس از اصلاح ساختار تغییر نکرد، اندازه نانوذرات نیز تغییر چندانی نداشت، ولی پوشش پلیمری باعث تجمع و چسبندگی نسبی نانوذرات گردید که در تصویر SEM قابل رویت است. الگوهای پراش پرتو ایکس نانوذرات تهیه شده به روش رسوب-دهی پیک‌های قابل رویت به ترتیب مربوط به صفحات بلوری ۲۲۰، ۳۱۱، ۴۰۰، ۴۲۲، ۵۱۱ و ۴۴۰ را دارا می‌باشد و با تطابق پیک‌های این صفحات و زوایای پراش مربوط به آن‌ها با کارت شماره ۰۶۲۹-۱۹ کمیته مشترک پراش نگاری استاندارد پودرها مگنتیت بودن ذرات تایید شد (شکل ۵). نتیجه مربوط به پراش پرتو ایکس پس از اصلاح نانوذرات نیز در **Error! Reference source not found.** ارایه شده است. با ایجاد این لایه سطحی پلیمری، الگوی پراش پرتو ایکس تفاوتی پیدا نکرده است تنها از شدت پیک‌ها کاسته شده است. این امر نشان‌دهنده وجود ترکیب جدیدی در این ساختار می‌باشد. بدین معنی که وجود هسته مغناطیسی مگنتیت را تایید می‌کند و وجود لایه‌های پلیمری روی سطح نانوذرات را با کاسته شدن از شدت پیک‌های موجود و هم‌چنین حضور پراش‌های نامنظم در موقعیت‌های زیر ۲۰ درجه نشان می‌دهد (El-Shamy و همکاران، ۲۰۱۹). سنتز نانوذرات مغناطیسی به عنوان نتیجه اتصال Fe-O در Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> و هم‌چنین حضور لایه آلزینات روی سطوح مغناطیسی توسط طیف FT-IR مشخص شد. حضور هسته Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> توسط جذب کششی قوی در محدوده ۵۷۹cm<sup>-1</sup> که مربوط به پیوند Fe-O است مشخص می‌شود که حضور پیک در ناحیه محدوده ۵۳۱/۶۶cm<sup>-1</sup> در طیف حاصل، حضور نانوذرات مگنتیت را تایید می‌کند. پیک در محدوده ۳۴۰۳/۶۳cm<sup>-1</sup> مربوط به ارتعاش گروه OH می‌باشد، هر دو این پیک‌ها در طیف نانوذره قبل اصلاح مشاهده گردید. هم‌چنین در طیف FT-IR نانوذرات آهن اصلاح شده با آلزینات هم‌چنان حضور هسته مغناطیسی در پیک ۵۳۰/۸۸cm<sup>-1</sup> تایید می‌گردد. پیک در محدوده ۳۳۹۴/۱۶cm<sup>-1</sup> متعلق به گروه‌های OH (ارتعاش کششی) است. پیک ظاهر شده در ۱۶۲۷/۵۹cm<sup>-1</sup> مربوط به ارتعاش کششی گروه‌های کربوکسیل (COO<sup>-</sup>) می‌باشد. نوار مشاهده شده در ناحیه ۱۳۰۰ نیز مربوط به باند C-O در گروه‌های کربوکسید اسید در ساختار پلیمر می‌باشد، این دو پیک مربوط به آلزینات بوده و فقط در نانوذره اصلاح شده مشاهده می‌شود (شکل ۷).

میزان تشکیل بیوفیلم و ارتباط آن با MIC: در میان جدایه‌های مورد مطالعه در ۵۷ درصد (۱۷ جدایه) تشکیل‌دهنده بیوفیلم قوی و ۴۳ درصد (۱۳ جدایه) تشکیل‌دهنده بیوفیلم ضعیف بودند. از میان ۱۷ جدایه با میزان تشکیل بیوفیلم قوی ۶ جدایه با حداقل

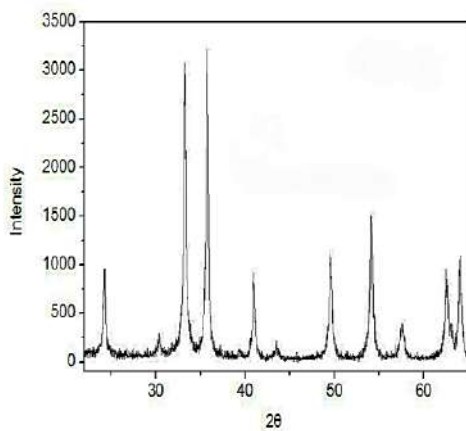




شکل ۳: تصویر میکروسکوپ نانوذرات اکسید آهن اصلاح شده با پلیمر آلژینات



شکل ۴: نمودار توزیع اندازه نانوذرات اکسید آهن اصلاح شده با پلیمر آلژینات

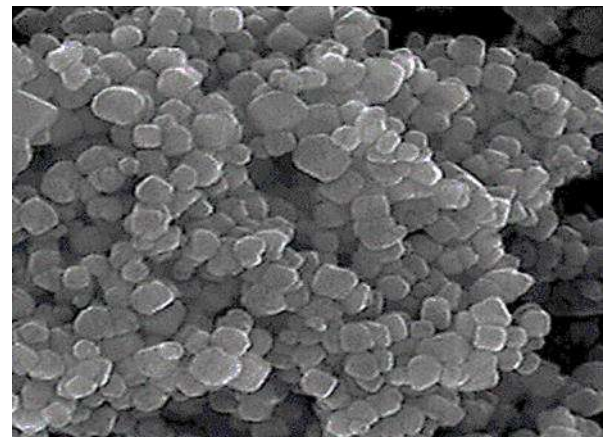


شکل ۵: نتیجه آزمون XRD از نانوذرات اکسید آهن اصلاح نشده

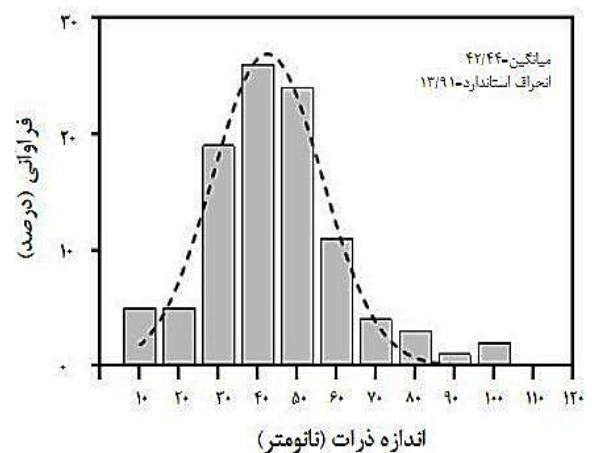
غلظت مهار ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۸ جدایه با حداقل غلظت مهار ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۳ جدایه با حداقل غلظت مهار ۹۰ میکروگرم در میلی‌لیتر وجود داشت. هم‌چنین در میان ۱۳ جدایه با میزان تشکیل بیوفیلم ضعیف ۳، ۴ و ۶ جدایه با حداقل غلظت مهار کنندگی ۰/۲۵۶، ۲ و ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر وجود داشت. نتایج کامل مربوط به ارتباط قدرت تشکیل بیوفیلم و حداقل غلظت مهار کنندگی در جدول ۲ آورده شده است.

#### تاثیر نانوذره اکسید آهن اصلاح شده بر مهار تشکیل بیوفیلم:

میانگین تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های مورد مطالعه در حضور هر یک از ۵ غلظت نانوذره اصلاح شده در شکل ۸ نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشخص است با کاهش غلظت نانوذره استفاده شده، درصد تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌ها افزایش یافته است. میزان کاهش تشکیل بیوفیلم با کتریبایی در حضور غلظت‌های برابر با ۲MIC، ۱/۲MIC، ۱/۴MIC و ۱/۸MIC به ترتیب ۹۳، ۹۱، ۴۲، ۴۰ و ۳۷ درصد بود.



شکل ۱: تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی نانوذرات اکسید آهن



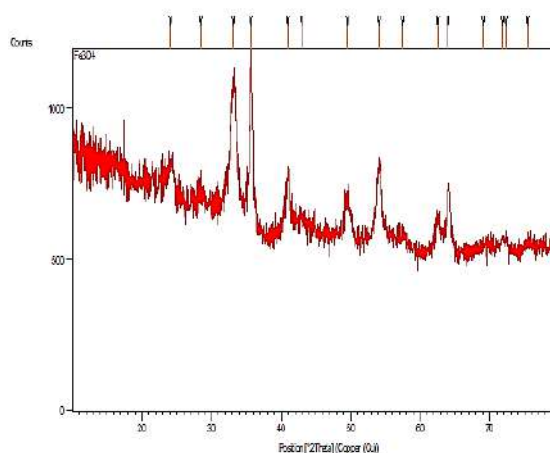
شکل ۲: نمودار توزیع اندازه نانوذرات اکسید آهن سنتز شده



جدول ۲: حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات سنتز شده و ارتباط

آن با وضعیت تشکیل بیوفیلم در بین جدایه‌های بالینی

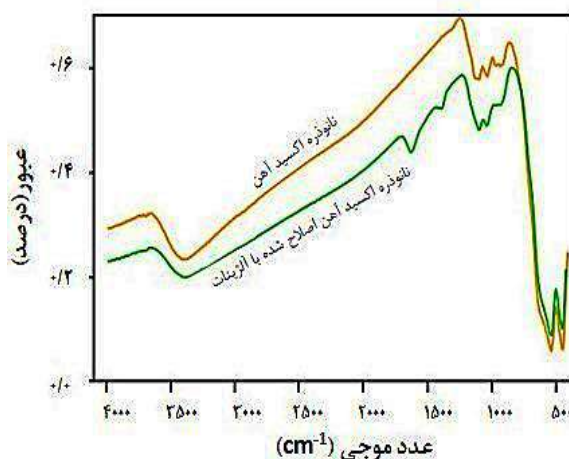
وضعیت تشکیل بیوفیلم	تعداد جدایه‌ها	حداقل غلظت مهارکنندگی (میکروگرم در میلی‌لیتر)
ضعیف	۳	۰/۲۵۶
ضعیف	۴	۲
ضعیف	۶	۱۵
قوی	۶	۶۰
قوی	۸	۸۰
قوی	۳	۹۰



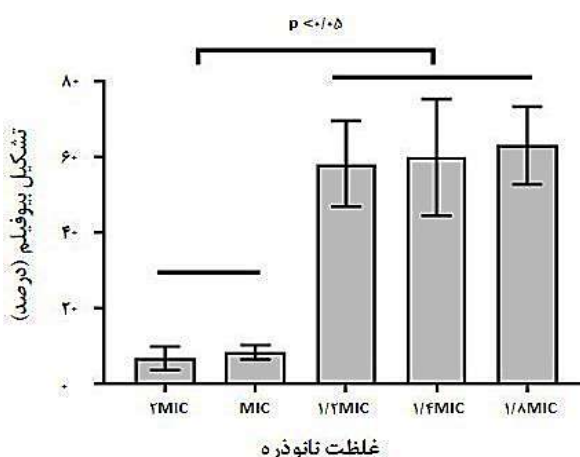
شکل ۶: نتیجه آزمون XRD از نانوذرات اکسید آهن اصلاح شده با آلزینات

## بحث

مواد ضد میکروبی بر پایه نانوذرات، به‌عنوان سد دفاعی جدیدی بر علیه مقاومت دارویی باکتری‌ها مطرح بوده و استفاده از این مواد در حال گسترش می‌باشد. نانوذرات مختلف مکانیسم‌های متفاوتی را جهت مقابله با مقاومت دارویی باکتری‌ها به کار می‌برند. براساس مطالعات موجود نانوذرات از طریق چند فرایند اصلی منجر به ایجاد اثرات ضد میکروبی می‌شوند که شامل تخریب دیواره سلولی باکتری، تولید گونه‌های بازفعال اکسیژن، نفوذ در دیواره سلولی باکتری و القا اثرات درون سلولی مثل واکنش با DNA و پروتئین‌ها می‌شود (Wang و همکاران، ۲۰۱۷). در اکثر موارد نانوذرات قادر به اعمال مکانیسم ضدباکتریایی خود از طریق ارتباط مستقیم با دیواره باکتری و بدون نیاز به نفوذ به درون سلول هستند، از این رو باکتری‌ها نمی‌توانند مکانیسم‌های مقاومتی خود را در مورد نانوذرات به کار گیرند (Applerot و همکاران، ۲۰۱۲). نانوذرات تولید شده از یون‌های مربوط به گروه فلزات واسطه مثل آهن، کبالت، نیکل و ترکیبات آن‌ها، به‌عنوان نانوذرات مغناطیسی شناخته می‌شوند. نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن شامل مگنتیت ( $Fe_3O_4$ )، مگمیت ( $\gamma-Fe_2O_3$ )، هماتیت ( $\alpha-Fe_2O_3$ ) و ژئوتیت ( $FeO(OH)$ ) می‌باشند (Bucak و همکاران، ۲۰۱۲). در مطالعه حاضر هدف تولید نانوذرات مگنتیت بود، که پس از سنتز و ارزیابی نانوذرات توسط نتایج XRD مگنتیت بودن آن‌ها تایید گردید. با توجه به اندازه بسیار کوچک این نانوذرات و بالا بودن نسبت سطح به حجم در آن‌ها دارای انرژی آزاد سطحی قابل توجهی می‌باشند (Sen و Bruce، ۲۰۰۵). برای کاهش این انرژی سطحی و افزایش پایداری نانوذرات اکسید آهن، نیاز به ایجاد اتصالات سطحی و اصلاحات ساختاری توسط برخی مواد می‌باشد. پلیمرهای مختلفی از جمله پلی استایرن و پلی اتیلن گلیکول جهت پوشش دهی و اصلاح سطح نانوذرات اکسید آهن مورد استفاده قرار گرفته‌اند که هر کدام دارای خواص ویژه‌ای بوده و بر روی خواص



شکل ۷: نمودار نتیجه آزمایش FT-IR مربوط به نانوذره اکسید آهن قبل و پس از اصلاح با آلزینات



شکل ۸: نمودار میزان تشکیل بیوفیلم در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن اصلاح شده با آلزینات



مختلفی مانند سویه باکتری، غلظت یون فلزی و مرحله رشد میکربی (به صورت پلانکتونی یا در مرحله اتصال) بستگی دارد (Ali و Akbari، ۲۰۱۷؛ Prodan و همکاران، ۲۰۱۳). برخی مطالعات نشان داده‌اند که اثر ضدباکتری نانوذرات اکسید آهن سوپرمگنتیک از طریق آزادسازی رادیکال‌های فعال اکسیژن صورت می‌گیرد. این فرآیند منجر به القای استرس اکسیداتیو در سلول باکتری و کاهش سطح eDNA در بیوفیلم می‌شود (Ali و Akbari، ۲۰۱۷). در یک مطالعه دیگر اثر ضدباکتری آنتی‌بیوتیک اریترومیسین در ترکیب با نانوذره اکسید آهن جهت درمان و مقابله با عفونت‌زایی باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه بررسی شد. براساس نتایج این مطالعه استفاده از آنتی‌بیوتیک اریترومیسین به همراه نانوذره اکسید آهن سبب افزایش خاصیت ضدباکتری این آنتی‌بیوتیک گردید. به نظر می‌رسد آهن موجود در نانوذره اکسید آهن از یک طرف می‌تواند به عنوان تنها منبع آهن برای باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه، باعث رشد این باکتری‌ها شده و از طرف دیگر می‌تواند منجر به افزایش واکنش بین باکتری و ترکیب آنتی‌بیوتیک و نانوذره گردد (Carrillo و Caamano، ۲۰۱۶). در بررسی انجام شده توسط Ansari و همکاران (۲۰۱۷) بر چگونگی اثر نانوذرات اکسید آهن بر رشد باکتری‌های باسیلوس سرئوس و کلسیلا پنومونیه، فعالیت ضدباکتری قابل توجهی علیه این دو باکتری مشاهده شد. مکانیسم مولکولی فعالیت ضدباکتری نانوذرات اکسید آهن به درستی شناخته نشده است. اما به نظر می‌رسد یکی دیگر از مکانیسم‌های ضدباکتریایی این نانوذره واکنش یون‌های آهن با پروتئین‌ها و DNA و تغییر در ساختار این مولکول‌ها می‌باشد که در نهایت منجر به مرگ سلول باکتری می‌گردند. در مقایسه فعالیت ضد میکروبی نانوذره‌های اکسید فلزی ZnO، CuO و Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (به ترتیب با اندازه ۱۸، ۲۲ و ۲۶ نانومتر) علیه باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سابیتیلیس) و گرم منفی (سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلای) نانوذره ZnO و پس از آن نانوذره CuO، بیش‌ترین و نانوذره Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> کم‌ترین اثر ضد میکروبی علیه این میکروارگانیسم‌ها از خود نشان دادند. از این رو این احتمال وجود دارد که اندازه نانوذره می‌تواند در فعالیت آنتی‌باکتریال آن اثرگذار باشد. در واقع فعالیت ضد میکروبی نانوذره‌ها، با کاهش اندازه ذرات و بنابراین افزایش نسبت سطح به حجم ذرات، افزایش می‌یابد. هم‌چنین بررسی هاله عدم رشد ایجاد شده توسط هر نانوذره بر محیط کشت باکتری‌ها، نشان داده است که باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت، نسبت به این نانوذرات مقاومت بیش‌تری از خود نشان می‌دهند (Azam و همکاران، ۲۰۱۲). Masadeh و همکاران (۲۰۱۵) اثر نانوذرات اکسید آهن و اکسیدسزیم (CeO<sub>2</sub>) و هم‌چنین آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف سیپروفلوکساسین را، بر علیه گروهی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را بررسی کردند.

و رفتار نانوذره نیز تاثیر مستقیم دارند. از جمله در چندین مطالعه از رسوب‌گذاری مستقیم نمک‌های فلزی درون منافذ متخلخل پلی‌استارین استفاده شده است، در نتیجه ذرات به دست آمده دارای اندازه مناسب و دامنه قدرت مغناطیسی خوبی بودند (Gupta و Gupta، ۲۰۰۵؛ Berry و همکاران، ۲۰۰۳). در مطالعه دیگر اصلاح ساختار سطحی نانوذرات توسط پلی‌وینیل الکل انجام شد. در این مطالعه از رسوب گذاری ذرات اکسید آهن در محلول آبی پلی‌وینیل الکل استفاده شد و پخش نانوذرات به صورت همگون و پایدار بود (Chatterjee و همکاران، ۲۰۰۱). در مطالعه حاضر نیز سنتز نانوذرات اکسید آهن و اصلاح ساختاری آن‌ها توسط آلزینات به روش هم‌رسوبی انجام شد. این روش نسبت به سایر روش‌های سنتز نانوذرات مانند روش‌های هیدروترمال و تجزیه حرارتی، دما و زمان کم‌تری نیاز دارد. هم‌چنین حلال استفاده شده در این روش آب بوده و مشکلات زیستی ندارد. دیگر مزیت این روش تکرار پذیر بودن آن در مقایسه با سایر روش‌های سنتز نانوذره می‌باشد. پس از سنتز و اصلاح ساختار، بررسی طیف FT-IR و هم‌چنین تصاویر SEM شکل و ماهیت نانوذرات پوشش‌دار شده با آلزینات را تایید کردند. استراتژی‌های مختلفی در زمینه نانوتکنولوژی جهت مقابله با بیوفیلم‌ها به کار گرفته می‌شوند. در یک پژوهش که در سال ۲۰۱۷ انجام شد، تاثیر اثر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و نانوذره اکسید آهن سوپر مگنتیک (SIONPs=Superparamagnetic iron oxide nanoparticles) بر شکل‌گیری بیوفیلم در ۲۰ سویه از باکتری سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد. غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این نانوذره حجم توده بیوفیلم ۱۱ ایزوله باکتری سودوموناس آئروژینوزا را کاهش داد، در حالی که در ۹ سویه باعث تحریک شکل‌گیری بیوفیلم شد (Akbari و Ali، ۲۰۱۷). در مطالعه Prodan و همکاران، غلظت بالای نانوذرات اکسید آهن سوپر مگنتیک (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، سبب تحریک رشد و اتصال میکروارگانیسم‌ها به سطوح شده و در نهایت منجر به شکل‌گیری بیوفیلم در آن‌ها گردید. از طرف دیگر، غلظت‌های پایین‌تر از این نانوذره فعالیت ضد بیوفیلم اندکی بر حالت پلانکتونی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه نشان داد. به هر حال غلظت‌های نسبتاً پایین از نانوذره اکسید آهن رشد باکتری‌ها را مهار کرده است و این نتایج پتانسیل استفاده از این نانوذره در طراحی مواد و سطوح ضد باکتری و ضد بیوفیلم جهت کاربردهای زیست پزشکی را نشان می‌دهد. هم‌چنین این ویژگی یک مزیت مهم برای کاهش اثرات سمی بر بافت‌ها و سلول‌های میزبان یوکاریوتی می‌باشد (Prodan و همکاران، ۲۰۱۳). به نظر می‌رسد توانایی باکتری‌ها در استفاده از اکسید آهن به عنوان منبع یون‌های آهن مورد نیاز جهت متابولیسم و بیماری‌زایی خود، منجر به تشکیل بیوفیلم می‌شود. نتایج به دست آمده از دو پژوهش ذکر شده نشان می‌دهد که فعالیت ضد باکتری نانوذرات اکسید آهن به عوامل



دیگر نانوذره‌ها غلظت بالایی از نانوذره اکسید آهن، جهت ایجاد اثر ضد باکتریایی مورد نیاز است. ترکیب نانوذرات اکسید آهن با آنتی بیوتیک اریترومیسین باعث مهار رشد باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه و کاهش باکتری‌های زنده شده است. نانوذره اکسید آهن سبب ورود آنتی بیوتیک اریترومیسین به باکتری می‌گردد. این موضوع نشان می‌دهد که این نانوذره‌ها به عنوان حامل‌هایی عمل کرده که دارو را به باکتری رسانده و سبب مهار رشد آن‌ها می‌شوند (Carrillo و Caamano, ۲۰۱۶). در مطالعه حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات اکسید آهن برای جدایه‌های مختلف متفاوت بوده و در گستره ۰/۲۵۶ تا ۹۰ میکروگرم در میلی لیتر در نوسان داشت. Mazdeh و همکاران (۲۰۱۹) مطالعه مشابهی را با استفاده از نانوذره اکسید آهن با پوشش کیتوسان روی بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا انجام دادند. در مطالعه مذکور نانوذره آهن با پوشش کیتوسان در غلظت‌های ۰/۵۱۲ تا ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر تشکیل بیوفیلم را مهار کرد که دلیل این اختلاف می‌تواند ناشی از نوع پوشش نانوذره و یا ناشی از ماهیت جدایه‌های بالینی باشد. نکته جالب توجه این بود که از میان ۱۷ جدایه با میزان تشکیل بیوفیلم قوی همگی دارای MIC بیش از ۶۰ میکروگرم در میلی لیتر بودند، در صورتی که حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذره برای جدایه‌هایی که قدرت تولید بیوفیلم ضعیف داشتند کم‌تر از ۱۵ میکروگرم در میلی لیتر بود. در این مطالعه مشخص گردید نانوذره اکسید آهن اصلاح شده با آلژینات قادر به مهار باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. بررسی حداقل غلظت مهاری این نانوذره اثرات وابسته به غلظت آن را در از بین بردن باکتری روشن نمود. هم‌چنین این نانوذره در غلظت معادل با MIC به صورت چشمگیری قادر به مهار تولید بیوفیلم توسط سودوموناس آئروژینوزا بود. این نتایج نشان می‌دهند با توجه به زیست سازگاری نانوذرات اکسید آهن و تایید استفاده پزشکی آن‌ها توسط سازمان غذا و دارو، می‌توان به این نانوذره با دید یک راهکار درمانی برای مقابله باکتری سودوموناس آئروژینوزا نگاه کرد.

## منابع

۱. زمانی مزده، پ.؛ زارع کاریزی، ش. و صفایی جوان، ر.، ۱۳۹۸. اثر مهارکنندگی نانوذرات اکسید آهن با پوشش کیتوسان بر جدایه‌های بالینی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و ارتباط آن با قدرت بیوفیلم باکتری. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۱۱، شماره ۱، صفحات ۳۲۳ تا ۳۳۰.
۲. رفویی، ع.؛ زارع کاریزی، ش. و هنرمند، س.، ۱۳۹۷. ارزیابی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و پتانسیل تشکیل بیوفیلم در سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۱۰، شماره ۳، صفحات ۴۸۳ تا ۴۸۸.

نانوذرات اکسید آهن و اکسیدسزیم اثر مهاری بر رشد باکتری‌ها و مهار تشکیل بیوفیلم نداشته و آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین منجر به مهار رشد همه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شده است. از طرفی تیمار سویه‌ها با نانوذرات اکسید آهن و اکسیدسزیم به همراه سیپروفلوکساسین، به‌طور قابل توجهی اثر ضد باکتری این آنتی بیوتیک را کاهش داده است. این نتیجه ممکن است به این دلیل رخ داده باشد که این نانوذره‌ها با سیپروفلوکساسین واکنش داده و مانع جذب آن توسط سلول باکتری شوند. هم‌چنین ممکن است این نانوذرات به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم بر عملکرد سیپروفلوکساسین در مهار سنتز DNA باکتری تداخل ایجاد کنند. نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن (IONPs= Iron Oxide Magnetic Nanoparticles) دارای ویژگی‌های مهمی هستند که آن‌ها را جهت کاربردهای زیست پزشکی از جمله در عکس برداری (MRI (Magnetic Resonance Imaging)، تحویل دارو و عناصر ضد میکروبی قابل استفاده کرده است. این نانوذرات از نظر فیزیکی و شیمیایی پایدار هستند، با بافت زنده سازگار و از نظر محیط زیستی ایمن می‌باشند. با توجه به مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته است پیشنهادهایی جهت توضیح چگونگی فعالیت ضد میکروبی و ایجاد سمیت در سلول‌ها توسط نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن  $Fe_3O_4$  یا  $Fe_2O_3$  بیان شده است. براین اساس عملکرد این نانوذرات از طریق یک سری برهم کنش‌ها با سلول صورت می‌گیرد. از جمله دپلاریزاسیون غشا و در نتیجه از بین رفتن یکپارچگی ساختار سلول میکروارگانیسم، تولید گونه‌های بازفعال اکسیژن که منجر به پراکسیداسیون لیپید و تخریب DNA می‌شود و آزادسازی یون‌های فلزی که هومئوستاز سلولی و هماهنگی عملکرد پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Arias و همکاران، ۲۰۱۸). همان‌گونه که اشاره شد تاکنون نتایج مختلفی از اثرات ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی نانوذرات اکسید آهن گزارش شده است. در مطالعه Gokulakrishnan و همکاران (۲۰۱۲) نانوذره اکسید آهن ( $Fe_2O_3$ ) اثر مهاری بر رشد فرم پلانکتونی تعدادی از باکتری‌ها (سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا، استرپتوکوکوس پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس) داشته است. در مطالعه‌ای دیگر، نه تنها اثر مهاری نانوذره اکسید آهن بر رشد باکتری اشرشیاکلی مشاهده نشده بلکه باکتری‌های تیمار شده با این نانوذره افزایش رشد داشته‌اند (He و همکاران، ۲۰۱۱). Tran و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر نانوذرات اکسید آهن با میانگین قطر ۹ نانومتر و ساختاری زنجیره مانند به طول ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر را بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بررسی نمودند. این نانوذره در غلظت ۳ میلی گرم در میلی لیتر در مقایسه با نمونه‌های کنترل باعث کاهش تعداد سلول‌های زنده باکتری شد. پتانسیل زتای (Zeta potential) منفی نانوذره و واکنش الکترواستاتیک کم با بار منفی سطح باکتری، این موضوع را توضیح می‌دهد که چرا نسبت به

- microspheres. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. Vol. 225, pp: 21-29.
۱۷. **El-Shamy, O.A.; El-Azabawy, R.E. and El-Azabawy, O., 2019.** Synthesis and Characterization of Magnetite Alginate Nanoparticles for Enhancement of Nickel and Cobalt Ion Adsorption from Wastewater. *Journal of Nanomaterials*. Vol. 6326012, pp: 1-8.
  ۱۸. **Frieri, M.; Kumar, K. and Boutin, A., 2017.** Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*. Vol. 10, pp: 369-378.
  ۱۹. **Gokulakrishnan, R.; Ravikumar, S. and Raj, J.A., 2012.** In vitro antibacterial potential of metal oxide nanoparticles against antibiotic resistant bacterial pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. Vol. 2, pp: 411-413.
  ۲۰. **Gupta, A.K. and Gupta, M., 2005.** Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. Vol. 26, pp: 3995-4021.
  ۲۱. **Gupta, A.K. and Wells, S., 2004.** Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Transactions on Nanobioscience*. Vol. 3, pp: 66-73.
  ۲۲. **He, S.; Feng, Y.; Gu, N.; Zhang, Y. and Lin, X., 2011.** The effect of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on *Escherichia coli* genome. *Environmental Pollution*. Vol. 159, pp: 3468-3473.
  ۲۳. **Huang, K.S.; Shieh, D.B.; Yeh, C.S.; Wu, P.C. and Cheng, F.Y., 2014.** Antimicrobial applications of water-dispersible magnetic nanoparticles in biomedicine. *Current Medicinal Chemistry*. Vol. 21, pp: 3312-3322.
  ۲۴. **Jung, W.K.; Koo, H.C.; Kim, K.W.; Shin, S.; Kim, S.H. and Park, Y.H., 2008.** Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74, pp: 2171-2178.
  ۲۵. **Kango, S.; Kalia, S.; Celli, A.; Njuguna, J.; Habibi, Y. and Kumar, R., 2013.** Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic-inorganic nanocomposites-A review. *Progress in Polymer Science*. Vol. 38, pp: 1232-1261.
  ۲۶. **Liong, M.; France, B.; Bradley, K.A. and Zink, J.I., 2009.** Antimicrobial activity of silver nanocrystals encapsulated in mesoporous silica nanoparticles. *Advanced Materials*. Vol. 21, pp: 1684-1689.
  ۲۷. **Masadeh, M.M.; Karasneh, G.A.; Al-Akhras, M.A.; Albiss, B.A.; Aljarah, K.M.; Al-azzam, S.I. and Alzoubi, K.H., 2015.** Cerium oxide and iron oxide nanoparticles abolish the antibacterial activity of ciprofloxacin against gram positive and gram negative biofilm bacteria. *Cytotechnology*. Vol. 67, pp: 427-435.
  ۲۸. **Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D.; Fatma, T. and Rattan, A., 2006.** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. Vol. 24, pp: 25-29.
  ۲۹. **Mazdeh, P.Z.; Karizi, S.Z. and Javan, R.S., 2019.** The inhibitory effect of Chitosan Coated Iron oxide nanoparticles on *Pseudomonas Aeruginosa* clinical isolates and its relevance with bacterial biofilm. *Journal of Animal Environment*. Vol. 11, pp: 323-330.
  ۳۰. **McCartney, J.; Collee, J. and Mackie, T., 1989.** Practical medical microbiology. Charchill Livingstone. London, UK. 601 p.
  ۳۱. **Morovati, A.; Panahi, H.A. and Yazdani, F., 2016.** Grafting of allylimidazole and n-vinylcaprolactam as a thermosensitive polymer onto magnetic nano-particles for the extraction and determination of celecoxib in biological
  ۳. **عباس‌والی، م.؛ ابراهیمی، ع. و شهریاری، ف.، ۱۳۹۶.** بررسی اثر مهاری نانو ذره اکسید روی در تشکیل بیوفیلم برخی باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد. *مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران*. دوره ۱۱، شماره ۵، صفحات ۱۱۵ تا ۱۲۴.
  ۴. **Akbari, K.R. and Ali, A.A., 2017.** Study of antimicrobial effects of several antibiotics and iron oxide nanoparticles on biofilm producing *pseudomonas aeruginosa*. *Nanomedicine Journal*. Vol. 4, pp: 37-43.
  ۵. **Alshehri, A.M.; Wilson Jr, O.C.; Dahal, B.; Philip, J.; Luo, X. and Raub, C.B., 2017.** Magnetic nanoparticle loaded alginate beads for local micro-actuation of in vitro tissue constructs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 159, pp: 945-955.
  ۶. **Ansari, S.A.; Oves, M.; Satar, R.; Khan, A.; Ahmad, S. I.; Jafri, M.A.; Zaidi, S.K. and Alqahtani, M.H., 2017.** Antibacterial activity of iron oxide nanoparticles synthesized by co-precipitation technology against *Bacillus cereus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Polish Journal of Chemical Technology*. Vol. 19, pp: 110-115.
  ۷. **Applerot, G.; Lellouche, J.; Lipovsky, A.; Nitzan, Y.; Lubart, R.; Gedanken, A. and Banin, E., 2012.** Understanding the antibacterial mechanism of CuO nanoparticles: revealing the route of induced oxidative stress. *Small*. Vol. 8, pp: 3326-3337.
  ۸. **Arakha, M.; Pal, S.; Samantarrai, D.; Panigrahi, T.K.; Mallick, B.C.; Pramanik, K. and Jha, S., 2015.** Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. *Scientific Reports*. Vol. 5, pp: 1-12.
  ۹. **Arias, L.; Pessan, J.; Vieira, A.; Lima, T.; Delbem, A. and Monteiro, D., 2018.** Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. *Antibiotics*. Vol. 7, pp: 1-32.
  ۱۰. **Azam, A.; Ahmed, O.; Khan, H. and Memic, A., 2012.** Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*. Vol. 7, pp: 6003-6009.
  ۱۱. **Behera, S.S.; Patra, J.K.; Pramanik, K.; Panda, N. and Thatoi, H., 2012.** Characterization and evaluation of antibacterial activities of chemically synthesized iron oxide nanoparticles. *World Journal of Nano Science and Engineering*. Vol. 2, pp: 196-200.
  ۱۲. **Berry, C.C.; Wells, S.; Charles, S. and Curtis, A.S., 2003.** Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. Vol. 24, pp: 4551-4557.
  ۱۳. **Bruce, I.J. and Sen, T., 2005.** Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations. *Langmuir*. Vol. 21, pp: 7029-7035.
  ۱۴. **Bucak, S.; Yavuztürk, B. and Sezer, A.D., 2012.** Magnetic nanoparticles: synthesis, surface modifications and application in drug delivery. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. Vol. 2, pp: 165-200.
  ۱۵. **Caamano, M.A. and Carrillo, M.M., 2016.** Iron Oxide Nanoparticle Improve the Antibacterial Activity of Erythromycin. *Journal of Bacteriology and Parasitology*. Vol. 7, pp: 1-4.
  ۱۶. **Chatterjee, J.; Haik, Y. and Chen, C.J., 2001.** Modification and characterization of polystyrene-based magnetic microspheres and comparison with albumin-based magnetic



- samples. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 513, pp: 62-67.
۳۲. **Nikolić, M.; Vasić, S.; Đurđević, J.; Stefanović, O. and Čomić, L., 2014.** Antibacterial and anti-biofilm activity of ginger (*Zingiber officinale*) ethanolic extract. Kragujevac Journal of Science. Vol.36, pp: 129-137.
۳۳. **Nosrati, H.; Salehiabar, M.; Davaran, S.; Ramazani, A.; Manjili, H.K. and Danafar, H., 2017.** New advances strategies for surface functionalization of iron oxide magnetic nano particles (IONPs). Research on Chemical Intermediates. Vol. 43, pp: 7423-7442.
۳۴. **Prodan, A.M.; Iconaru, S.L.; Chifiriuc, C.M.; Bleotu, C.; Ciobanu, C.S.; Motelica, M.; Sizaret, S. and Predoi, D., 2013.** Magnetic Properties and Biological Activity Evaluation of Iron Oxide Nanoparticles. Journal of Nanomaterials. Vol. 2013, pp: 1-8.
۳۵. **Ramalingam, B.; Parandhaman, T. and Das, S.K., 2016.** Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles on surface ultrastructure and nanomechanical properties of gram-negative bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. ACS Applied Materials and Interfaces. Vol. 8, pp: 4963-4976.
۳۶. **Rasamiravaka, T.; Labtani, Q.; Duez, P. and El Jaziri, M., 2015.** The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. BioMed Research International. Vol. 759348, pp: 1-17.
۳۷. **Sharma, D.; Misba, L. and Khan, A.U., 2019.** Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. Antimicrobial Resistance and Infection Control. Vol. 8, pp: 1-10.
۳۸. **Singh, N.; Jenkins, G.; Asadi, R. and Doak, S.H., 2010.** Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). Nano reviews. Vol. 5358, pp: 1-17.
۳۹. **Taylor, P.K.; Yeung, A.T. and Hancock, R.E., 2014.** Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. Journal of Biotechnology. Vol. 191, pp:121-130.
۴۰. **Tran, N.; Mir, A.; Mallik, D.; Sinha, A.; Nayar, S. and Webster, T.J., 2010.** Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. International Journal of Nanomedicine. Vol. 5, pp: 277-283.
۴۱. **Wang, L.; Hu, C. and Shao, L., 2017.** The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. International Journal of Nanomedicine. Vol. 12, pp: 1227-1249.
۴۲. **Wu, W.; Jiang, C.Z. and Roy, V.A., 2016.** Designed synthesis and surface engineering strategies of magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Nanoscale. Vol. 8, pp: 19421-19474.



## Evaluation of the Antibacterial Effects of Iron Oxide-Alginate Nanoparticles on Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm

- **Alaleh Jaberi Jahromi:** Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biological Science, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
- **Shohreh Zare Karizi\*:** Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biological Science, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
- **Raheleh Safaei Javan:** Department of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Biological Science, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Received: December 2019

Accepted: March 2020

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Nanoparticles, Antibiotic resistant

### Abstract

*Pseudomonas aeruginosa*, is one of the important causes of nosocomial infections. Unfortunately, this bacterium has very high level of antibiotic resistance due to the presence of resistance genes, the efflux pumps and the formation of biofilms. The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of magnetite-alginate nanoparticles (M-AlgNPs) on *P. aeruginosa* biofilm. M-AlgNPs were synthesized utilizing a coprecipitation method. The structural properties of the synthesized nanoparticles were investigated by using Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM), Dynamic Light Scattering (DLS) and X-ray Diffraction (XRD). Antibacterial activity was tested by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using microdilution method and biofilm formation was measured using microtiter plate tests. M-AlgNPs at a concentration of 0.256 to 90 µg/ml inhibited biofilm formation in clinical strains of *Pseudomonas*. The present investigation revealed that application of M-AlgNPs as antibacterial agents may be effective in inhibiting biofilm formation of *P. aeruginosa*.

---

\* Corresponding Author's email: Shohrehzare@yahoo.com

