

Evaluating Anti-Bacterial Effect of Doped Silver Nanoparticles on Iron Oxide Nanocrystal in *Staphylococcus Epidermidis* Isolated from Nosocomial Infection

Hanieh Bayat¹, Reza Habibipour^{2*}, Narges Ghobadi³, Fatemeh Golipour⁴

1. M.Sc, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
3. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
4. M.Sc, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

Received: 2018/11/17

Accepted: 2019/04/23

Abstract

Introduction: Staphylococcus epidermidis is an opportunistic pathogen and of the most important cause of infectious diseases. The prevalence of these infections, as well as the increase of antibiotic-resistant species, has become a solicitous issue. Using nanoparticles to combat bacterial infections can replace antibiotics. In this study, the antibacterial properties of doped silver nanoparticles on Iron oxide nanocrystal on isolated Staphylococcus epidermidis bacteria from nosocomial infection was studied.

Materials and Methods: Firstly, Nanoparticles were prepared by chemical coprecipitation method and were prepared at concentrations of 0, 20, 40, 60, 80 and 100 ppm to determine bactericidal properties. The effect of nanoparticles on isolated and standard strains of Staphylococcus epidermidis at 24, 48 and 72 hours were investigated by microplate titer. Data were analyzed by SPSS -18 software at a 0.01 margin of error.

Results: The results showed that time, bacterial type and concentration factors had a significant effect on the growth inhibition of Staphylococcus epidermidis, though the concentration and type of bacterial variables had more significant effects. The most antibacterial effect of doped silver nanoparticles on iron oxide nanocrystals was at 100ppm concentration over a 48-hour time on standard isolate.

Conclusion: Doped Silver nanoparticles on Iron nanocrystals affect the growth of Staphylococcus epidermidis and reduce its growth rate. This effect, in comparison to the effects of silver nanoparticles in a single state, which has already been investigated by researchers, is far more advanced and the combination of Metal nanoparticles together cause to improve their effectiveness.

***Corresponding Author:** Reza Habibipour

Address: Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

Tel: +983137932567

E-mail: habiby.reza@gmail.com, habibipour@iauh.ac.ir

Keywords: Silver Nanoparticles, Iron Nanocrystals, Staphylococcus epidermidis, Nosocomial Infection

How to cite this article: Bayat H., Habibipour R., Ghobadi N., Golipour F. Evaluating Anti-Bacterial Effect of Doped Silver Nanoparticles on Iron Oxide Nanocrystal in *Staphylococcus Epidermidis* Isolated from Nosocomial Infection, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2021; 28(4):713-727.

Introduction

Nosocomial infections have always been a threat to hospitalized patients, a problem that plagues the world and both groups in developing countries. The importance of these infections has been doubled by the development of antibiotic-resistant strains. *Staphylococcus coagulase-negative* bacteria are one of the most important causes of nosocomial infections, around 55% to 75% of nosocomial infections are related to these bacteria. This bacterium is the natural flora of the human body and can opportunistically cause infections in people with defective immune systems. It is also able to produce extracellular superficial polysaccharides and biofilm. Its biofilm usually forms on hospital equipment in medical settings and plays a key role in contaminating the environment and hospital equipment.

Today, due to the increasing use of implants and artificial limbs in hospitals, they are exposed to coagulase-negative staphylococcal infections, especially *Staphylococcus epidermidis*. It is difficult to treat these bacteria due to the presence of biofilms. The main reason is that they interfere with host defense and drug therapy. Also, the surface of proteins in these bacteria and the capsules around them can make the bacteria more resistant to antimicrobial agents and stabilize in the environment. Increasing antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci along with the increase in infections caused by them has become a health concern.

By development in nanotechnology and the production of nanoparticles, new solutions have been proposed to deal with pathogens. Evidence of research in nanotechnology area suggests that nanoparticles can kill a wide range of bacteria. On the other hand, investigation on the antimicrobial effects of silver and iron oxide nanoparticles when are used together on a wide range of microorganisms have been proven that, can be lead to a possible increase in their antimicrobial activity compared to the individual state, expanding their performance, using lower concentrations of nanoparticles in the combined state than in the single state and thus reducing the amount of toxicity and preventing the occurrence of microbial resistance to each of the nanoparticles in the single state. Therefore, in this study, the effect of silver nanoparticles in

combination with iron oxide nanocrystals (silver doped with iron nanocrystals) on *Staphylococcus epidermidis* was investigated.

Methodology

Collection and identification of samples

Samples were collected from several medical centers in Hamadan. These samples included swabs from the surface of pus, blood, trachea aspiration, and urine. The isolated *Staphylococcus epidermidis* were identified in the laboratory using hot staining and standard biochemical tests. In addition, in all tests, the standard staphylococcus epidermidis ATCC 12228 prepared from Pasteur Institute of Tehran was used for control and comparison.

Synthesis of doped silver nanoparticles on iron nanocrystals

Iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles were prepared using the chemical co-precipitation method of divalent and trivalent iron chloride salts. First, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.5 mmol) and $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 mmol) were prepared in a solution of 0.01 M hydrochloric acid.

Methods of the effect of silver dop nanoparticles on iron nanocrystals on *Staphylococcus epidermidis*

In order to measure the antibacterial effect of silver nanoparticles doped with iron nanocrystals, microplate titration method and violet crystal colorimetric were used. For this purpose, 96-house microplate was used. Initially, for each staphylococcus epidermidis bacterium isolated and standard, a bacterial suspension with turbidity according to half-McFarland suspension was prepared separately, then from silver nanoparticles doped with iron nanocrystals, concentrations of 0, 20, 40, 60, 80, 100 ppm were prepared.

Microplate was then injected into each of 96 microplate wells with 180 μl of broth, 20 μl of bacterial suspension with turbidity equivalent to half McFarland suspension and 100 μl of nanoparticles. Each of these concentrations was added to the wells separately for three times. It is worth mentioning that among the wells, three wells were considered as positive control and another three wells were considered as negative control.

The above steps were performed separately for each of the isolated and standard bacteria. They were then incubated for 24 hours at 37 °C and after 24 hours the process was continued by violet crystal colorimetric method. For this purpose, after draining the contents of all wells, they were washed three times with 300 µl of physiological saline. Then 300 µl of methanol was inoculated into the wells and remained in the wells for 30 minutes. Afterwards, the methanol was drained. After the microplate dried at room temperature, 150 µl of 0.1 violet crystal was added to the well and let it remain in the well for 5 minutes, then the paint was drained and the microplate was washed with city water. Finally, 150 microliters acetic acid solution (33%) was added to the wells and the microplate was placed in an ELISA reader to evaluate the light absorption of the well was placed. In this study, the light absorption of wells at 630 nm with absorption of 80 or more was read.

Methods of investigating the effect kinetics of nanoparticles

In order to investigate the kinetics of the effects of concentrations on the target bacterium, the previous stage treatments were repeated under completely similar conditions and the same treated microplates were incubated at 48 and 72 hours, then stained and read in an elizator. Separate steps were performed for each of the

isolated and standard bacteria of *Staphylococcus epidermidis*.

Data analysis

Four-way analysis between subjects ANOVA was used to analyze the data obtained from the ELISA reader. The dependent variable was the amount of OD or the amount of turbidity. It is worth mentioning that the Tukey post hoc test was used to compare the mean turbidity of the average turbidity by the proposed factors and to extract the relevant tables and graphs, SPSS 18 software was used.

Results

An IR device was used to investigate the synthesis and functionalization of nanoparticles. The FT-IR spectra of iron and silver nanoparticles doped on iron oxide are shown in Figure 1. The absorption peak in the region of 581 cm⁻¹ is related to iron nanoparticles due to the vibration in the Fe-O bond, which is the synthesis of iron nanocrystals in the magnetite phase.

When silver ions are doped on iron nanoparticles, due to the coating effect, the intensity of this peak decreases. The presence of an adsorption peak in the region of about 3500 cm⁻¹ indicates the presence of OH⁻ in the structure of nanoparticles.

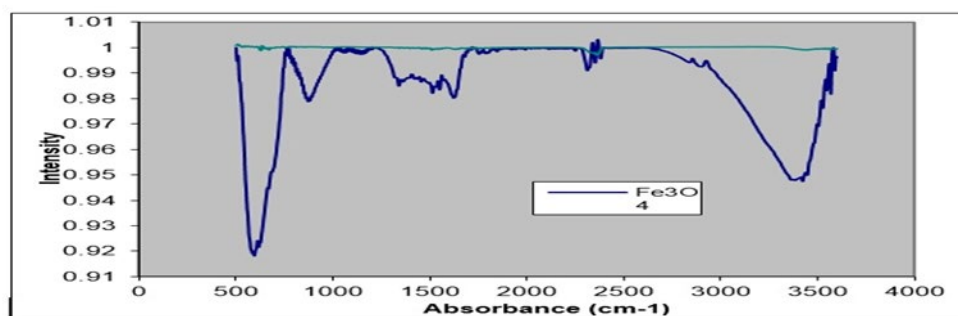


Figure 1. FT-IR absorption spectra of iron nanoparticles and silver nanoparticles

Figure 2 shows the X-ray diffraction pattern in iron oxide nanoparticles. The reflective peaks θ_2 shown in Figure 2, show the reflection at angles of 0.30, 35.6, 43.8, 2.54, 57.2, and 62.5. The Miller indices for these reflections are 511, 422, 400, 220, and 440. As shown in Figure 2, the doping of silver ions has no effect on the crystal structure as well as the mode of reflection

of nanoparticles, only reducing the intensity of some peaks become reflective. The correlation of Miller indices obtained for iron oxide nanoparticles with the database shows that the crystal structure of these nanocrystals is similar to magnetite crystals which have a cubic spinel structure.

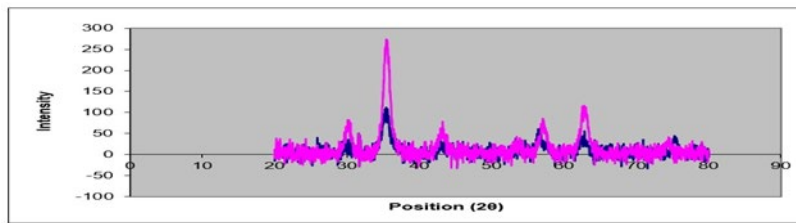


Figure 2. X-ray diffraction of iron oxide and silver nanoparticles doped on iron oxide

Scanning electron microscopy (SEM) was used to study the surface structure of nanoparticles. SEM of doped silver on iron nanoparticles is shown in Figure 3. As shown in this figure, the doping of silver ions causes a

slight collapse of its spherical structure by increasing baroelectric and asymmetric magnetic interactions as well as changes in the free energy of the surface of iron nanoparticles.

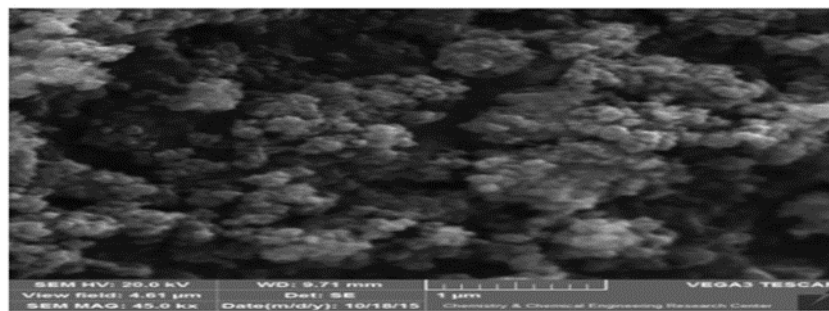


Figure 3. Scanning electron microscope image of silver nanoparticles doped on iron oxide

The results of the effect of concentration factor on the turbidity of *Staphylococcus epidermidis* showed that the concentration variable has a significant effect on the growth rate of bacteria at an error level of 1%. Therefore, it can be concluded that there is a direct relationship between the concentration and the percentage of bacterial removal. Turbidity was observed at a concentration of 100 ppm.

Figure 4 shows a binary comparison of the six surfaces of the nanoparticle concentration factor. As was shown in Figure 4, a significant difference can be seen. According to the diagram, there are only three pairs whose differences are not significant. In the picture, these pairs are placed in a colored box.

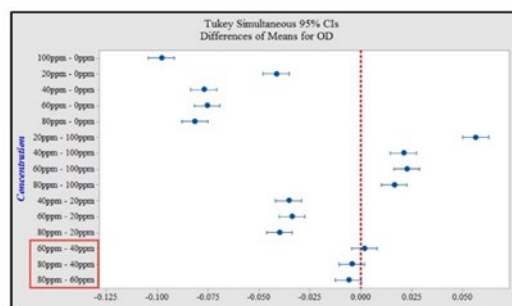


Figure 4. Two-by-two comparison of six levels of nanoparticle concentration factor using confidence interval and Tukey test

The results of the effect of bacterial type factor on turbidity in *Staphylococcus epidermidis* showed bacterial type has a significant effect on the average turbidity and

growth rate of bacteria at 1% error level. It is evident that the effect of nanoparticles on bacteria isolation and standard are different and the growth rate of standard bacteria in the

presence of nanoparticles was lower than of the isolation type.

The results of the time factor effect on turbidity in *Staphylococcus epidermidis* showed that the time has a significant effect on the growth of bacteria at an error level of 1%. In addition, the maximum effect of nanoparticles is in the remaining time of 48 hours and the growth rate of bacteria is further reduced in this time.

As shown in diagram 1, the effect of interaction between concentration and type of

bacteria on turbidity in *Staphylococcus epidermidis* is significant at 1% error level. In comparison with the two types of isolated and standard bacteria, the effect of 100 ppm concentration on the standard bacterium was greater than the effect of the same concentration on the isolated bacterium. On the other hands, the standard bacterium grew less at this concentration than the isolated bacterium.

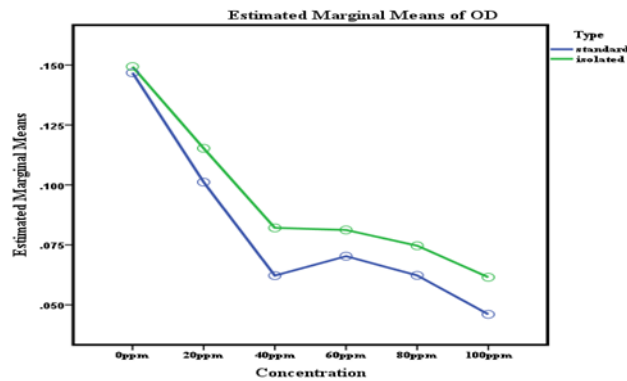


Diagram 1. Average turbidity by combination of levels of concentration factors and bacteria type

The results of the study on the interaction effect of bacterial type factors and retention time on the turbidity in *Staphylococcus epidermidis* are shown in Diagram 2. The interaction effect of

these factors is significant at an error level of 1%. The use of standard bacteria with a duration of 48 hours will lead to the lowest rate of bacterial growth.

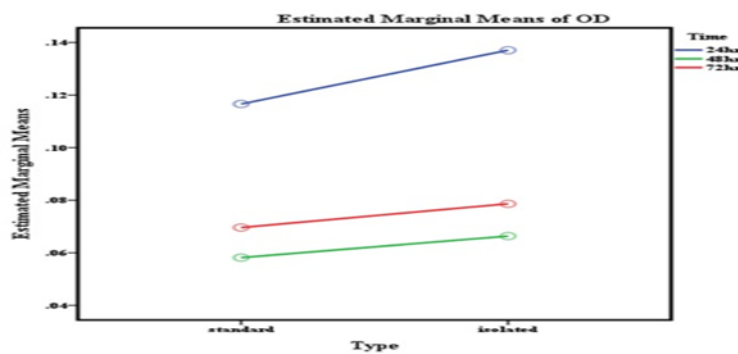


Diagram 2. Average turbidity combined with the levels of bacterial type and time factors

The results of effect of interaction between concentration, type of bacteria and time on the turbidity of *Staphylococcus epidermidis* showed that the interaction effect of the factors was not significant at the 1% error level.

Discussion

Studies have suggested various mechanisms to justify nanoparticle toxicity. It was also

mentioned that nanoparticles could release radicals alone or with the help of high-energy rays, which in turn causes the death of various microorganisms. On the other hand, nanoparticles can release high-energy ions caused damage the cell.

In various sources, the antibacterial effect of silver nanoparticles is related to the destabilization of the membrane potential, binding to functional groups of proteins,

penetration into cells, inactivation of enzymes and production of hydrogen peroxide, and finally the death of microorganisms. It is proven that iron oxide nanoparticles can attach to the wall of microbial cells and surface adhesives through electrostatic or hydrophobic forces, binding these nanoparticles to the cell wall of bacteria in membrane function, they disrupt cells and increase their permeability.

Iron oxide nanoparticles have approximately the same effects as silver nanoparticles. Iron oxide nanoparticles also interfere with the binding of microorganisms to the host cell by occupying surface adhesive factors, forming a biofilm. This delay prevents the bacteria from stabilizing and multiplying. Colony formation, bacterial cell growth, and the formation of compact microbial biofilm matrices make bacteria resistant to the host immune system, which nanoparticles prevent the formation of these microbial defense agents against the host immune system.

The results of the present study showed the combination of silver and iron oxide nanoparticles can improve their performance, which is consistent with the results of other researchers that change the antimicrobial effect of nanoparticles in the combined state. According to the investigations of Rezaei et al., if iron oxide nanoparticles are combined with other metal nanoparticles, its toxicity is altered.

Jafari et al. and Yang et al. showed antimicrobial chemicals that are identical in the two groups can have similar antimicrobial mechanisms. Microbials with different mechanisms of action may enhance or reduce each other's antimicrobial effect in combination.

The results of determining the antimicrobial properties of silver and iron oxide nanoparticles in the combined state (silver doped on iron nanocrystals) indicated there is a direct relationship between the concentration and percentage of bacterial removal. These results are compatible with the research were done by Sadeghian et al. and Dutta et al. They showed the toxicity of nanoparticles and biofilm removal of microorganisms are depended on the concentration of nanoparticles. At higher concentrations, nanoparticles can destroy pre-formed biofilms.

In the study on the interaction effect of concentration and type of bacteria, the results obtained from the present study, the difference in

the growth rate of isolated and standard bacteria in different concentrations is confirmed. Based on the results, it can be concluded that the type of bacteria is effective on the effectiveness of nanoparticles. This study is consistent with the results of Habibipour et al. that the antibacterial effect of nanoparticles depends on the type and genus of bacteria ". The difference in the numbers obtained, were due to the fact that the isolated and standard type of bacteria were the same and both were staphylococci epidermidis.

Here, the results of investigation on the toxicity by different concentrations of nanoparticles at 24, 48 and 72 hours has been compared with previous researches. These results are consistent with the results of Jabali et al., who stated that increasing the incubation time increased the antimicrobial effect of nanoparticles in all their shapes and sizes, although this amount is very small compared to the effect of shape and size.

The effect of retention time can be explained by the fact that nanoparticles at high exposure times will be more likely to penetrate the cell and destroy cell components, so that it is expressed during the residence time of silver nanoparticles emit from themselves. During the substitution reaction, these ions convert SH bands in the wall of the microorganism into SA-g bands, which results in the destruction of the microorganism.

Conclusions

The results of this study showed all three variables of concentration, type of bacteria and duration have a significant effect on inhibiting bacterial growth, however the effect of concentration significantly is highlighted. It can also be concluded that the effect of doped silver on iron nanocrystals (combination of silver nanoparticles with iron oxide nanocrystals) in inhibiting the growth of *Staphylococcus epidermidis* bacteria from single silver nanoparticles is much more than that of the previous studies. In general, it can be concluded that the composition of matched metal nanoparticles can increase their antimicrobial effect compared to the individual state of each of them.

Acknowledgment

This research is related to the master's thesis of 1995, number 59330507942008, Faculty of

Basic Sciences, Islamic Azad University, Hamadan Branch. The authors would like to thank all those who helped us in this research, especially Dr. Leila Moradi Haghgoo and Dr. Asghar Seif and Dr. Abbas Farmani.

Conflict Of Interest: Conflict of interest statement must be placed at the manuscript as below: “the authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this manuscript”.

بررسی تأثیر ضدباکتریایی نانوذرات نقره داپ شده با نانوکریستال آهن بر باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس جداشده از عفونت‌های بیمارستانی

حانیه بیات^۱، رضا حبیبی پور^{۲*}، نرگس قبادی^۲، فاطمه گلی پور^۱

۱. کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از پاتوژن‌های فرصت طلب است که اخیراً از مهم‌ترین عوامل ایجاد عفونت‌های بیمارستانی است. شیوع این دسته از عفونت‌ها در کنار افزایش گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به یک معضل نگران کننده مبدل شده است. استفاده از نانوذرات برای مقابله با عفونت‌های باکتریایی می‌تواند جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. در این تحقیق خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره داپ شده بر نانوکریستال اکسید آهن بر باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس جداشده از عفونت‌های بیمارستانی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: ابتدا نانوذرات به روش هم‌رسوبی شیمیایی ساخته شدند، سپس برای بررسی خاصیت باکتری‌کشی، غلظت‌های ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ ppm تهیه گردید و تأثیر نانوذرات بر باکتری‌های ایزوله و استاندارد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به روش میکروپلیت تیترا مطالعه شد و سپس داده‌ها با نرم‌افزار SPSS-18 در سطح خطای ۰/۰۱ بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد متغیرهای زمان، نوع باکتری و غلظت، تأثیر معنی‌دار بر مهار رشد باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس دارند که غلظت و نوع باکتری تأثیرات به‌مراتب بیشتری از خود نشان دادند. بیشترین تأثیر ضدباکتری نانوذرات نقره داپ شده با نانوکریستال آهن مربوط به غلظت ۱۰۰ ppm در زمان ماند ۴۸ ساعت بر باکتری استاندارد بود.

نتیجه‌گیری: نانوذرات نقره داپ شده با نانوکریستال آهن بر رشد باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مؤثرند و باعث کاهش رشد آن می‌شوند. این اثرگذاری نسبت به تأثیر نانوذرات نقره در حالت منفرد که قبلاً مورد بررسی محققان قرار گرفته است بیشتر می‌باشد و ترکیب نانوذرات فلزی باهم باعث بهبود اثربخشی آن‌ها شد.

* نویسنده مسئول: رضا حبیبی پور
نشانی: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
کد پستی: ۶۵۱۸۱۸۸۹۸۵
تلفن: ۰۹۱۸۳۱۶۹۷۶۰
رایانامه:

habibipour@iauh.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0002-1632-2624
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-8171-8967

کلیدواژه‌ها:

نانوذرات نقره، نانوکریستال آهن، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، عفونت بیمارستانی

مقدمه

مقاوم به آنتی‌بیوتیک دوچندان شده است (۱-۲). از جمله مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی، باکتری‌های استافیلوکوک کواگولاز منفی^۲ می‌باشند که حدود ۵۵ تا ۷۵ درصد عفونت‌های بیمارستانی را به خود اختصاص داده‌اند (۳). این باکتری فلور طبیعی بدن انسان است و می‌تواند به‌صورت فرصت طلب در افرادی که دچار نقص سیستم ایمنی هستند ایجاد

عفونت‌های بیمارستانی^۱ همواره یکی از خطرات تهدیدکننده بیماران بستری در بیمارستان‌هاست که یک مشکل گریبان‌گیر در سراسر دنیا و هر دو گروه کشورهای پیشرفته و در حال توسعه محسوب می‌شود. اهمیت این دسته از عفونت‌ها با ایجاد سویه‌های

2 Coagulase-negative staphylococci

1 Nosocomial infection

Copyright © 2021 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۸، شماره ۵، آذر و دی ۱۴۰۰، ص ۲۲۷-۷۱۳
آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

سوآپ از سطح چرک، خون، آسپیره نای و ادرار بودند. در آزمایشگاه ایزوله‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد شناسایی شدند. ضمناً در کلیه آزمون‌ها از سویه استاندارد استافیلوکوک اپیدرمیدیس ATCC 12228 تهیه شده از انستیتو پاستور تهران به‌منظور کنترل و مقایسه استفاده شد (۱۸).

سننر نانوذره نقره داپ شده بر روی نانوکریستال آهن:

نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) با استفاده از روش هم‌رسوبی شیمیایی نمک‌های دو و سه ظرفیتی کلرید آهن تهیه شد. ابتدا $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (۱/۵ میلی‌مول) و $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (۳ میلی‌مول) در یک محلول ۰/۰۱ مولار هیدروکلریک اسید تهیه شد (۱۹).

روش بررسی تأثیر نانوذرات نقره داپ بر نانوکریستال

آهن بر روی باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس: به‌منظور اندازه‌گیری میزان تأثیر ضدباکتریایی نانوذرات نقره داپ شده با نانوکریستال آهن از روش میکرو پللیت تیترو و رنگ‌سنجی با کریستال ویوله استفاده شد. به همین منظور از میکروپللیت ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید. در ابتدا برای هر یک از باکتری‌های استافیلوکوک اپیدرمیدیس ایزوله و استندارد به‌طور جداگانه سوسپانسیون باکتریایی با کدورت مطابق سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شد، سپس از نانوذرات نقره داپ شده با نانوکریستال آهن، غلظت‌های ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ ppm تهیه شد، سپس به روش میکروپللیت تیترو به هر یک از ۹۶ چاهک میکروپللیت به میزان ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت تریپتیک سوی برای ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل سوسپانسیون نیم مک فارلند و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نانوذره تلقیح شد. هر یک از غلظت‌های مذکور نانوذرات به‌طور جداگانه و به ترتیب با سه بار تکرار به چاهک‌ها اضافه شد. شایان ذکر است در میان چاهک‌ها سه چاهک به‌عنوان کنترل مثبت و سه چاهک به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

مراحل فوق برای هر یک از باکتری‌های ایزوله و استاندارد به‌طور جداگانه انجام شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از ۲۴ ساعت کار با روش رنگ‌سنجی کریستال ویوله ادامه یافت، به همین منظور پس از تخلیه محتویات تمامی چاهک‌ها سه مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر متانول به چاهک‌ها تلقیح و به مدت ۳۰ دقیقه درون چاهک‌ها باقی ماند. در ادامه متانول را تخلیه و پس از خشک شدن میکروپللیت در دمای اتاق به مقدار ۱۵۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰/۱ به چاهک اضافه

عفونت کند همچنین قادر به تولید پلی‌ساکاریدهای سطحی خارج سلولی و ایجاد بیوفیلم^۱ می‌باشد که معمولاً بیوفیلم خود را در محیط‌های بیمارستانی بر تجهیزات پزشکی تشکیل می‌دهد و در آلوده کردن محیط و ابزارهای بیمارستانی نقش اساسی ایفا می‌کند (۴-۵). امروزه بیمارستان‌ها به دلیل استفاده روزافزون از ایمپلنت‌ها و اندام‌های مصنوعی در معرض عفونت‌های استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی به‌خصوص استافیلوکوک اپیدرمیدیس قرار دارند که درمان آن‌ها به‌واسطه وجود بیوفیلم مشکل است؛ زیرا دفاع میزبان و درمان دارویی را با اختلال روبه‌رو می‌کند همچنین پروتئین‌های سطحی موجود در این باکتری‌ها و کپسول اطراف آن‌ها می‌توانند موجب مقاومت بیشتر باکتری در برابر عوامل ضد میکروبی و پلیداری آن‌ها در محیط شوند (۶). افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی در کنار افزایش عفونت‌های ناشی از آن‌ها به یک نگرانی بهداشتی مبدل شده است (۷-۸) از این رو باید تمهیدات لازم در خصوص معضلات پیش‌رو اندیشیده شود تا از بروز بیش‌ازپیش عفونت‌های بیمارستانی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جلوگیری شود. اخیراً با ظهور فناوری نانو و تولید نانوذرات راهکارهای جدیدی برای مقابله با عوامل بیماری‌زا ارائه شده است (۹-۱۱). شواهد به‌دست‌آمده از تحقیقات در زمینه نانو حاکی از آن است که نانوذرات می‌توانند طیف وسیعی از باکتری‌ها را از بین ببرند (۱۵-۱۲). از طرفی تأثیرات ضد میکروبی نانوذرات نقره و اکسید آهن بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها محرز شده است که در صورت انتخاب صحیح، ترکیب نانوذرات باهم می‌توانند منجر به افزایش احتمالی فعالیت ضد میکروبی آن‌ها نسبت به حالت منفرد، گسترده شدن عملکرد آن‌ها، استفاده از غلظت‌های پایین‌تر نانوذرات در حלת ترکیبی نسبت به حالت منفرد و در نتیجه کاهش مقدار سمیت و جلوگیری از بروز مقاومت میکروبی به هر یک از نانوذرات در حלת منفرد شود (۱۶-۱۷). از این رو در این پژوهش تأثیر نانوذره نقره به حالت ترکیب آن با نانوکریستال اکسید آهن (نقره داپ شده با نانوکریستال آهن) بر باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس بررسی شد.

۲. مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها: این طرح با کد

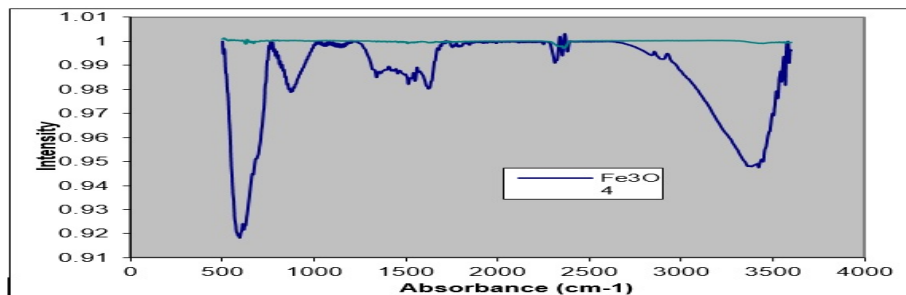
۵۹۳۳۰۵۰۷۹۴۲۰۰۸ مربوط به دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان تصویب گردید. نمونه‌ها از چندین مرکز درمانی در شهر همدان جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها شامل

وابسته در طرح مذکور، میزان OD یا میزان کدورت بود. شایان ذکر است که از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه دوبه‌دوی میانگین میزان کدورت به تفکیک عوامل مطرح‌شده و برای استخراج جداول و نمودارهای مربوطه از نرم‌افزار SPSS-۱۸ استفاده شده است.

۳. یافته‌ها

به‌منظور بررسی سنتز و عامل‌دار شدن نانوذرات، از دستگاه IR استفاده شد. طیف FT-IR نانوذرات آهن و نانوذرات نقره داب‌شده بر روی اکسید آهن در شکل ۱ نشان داده شده است. پیک جذبی ناحیه 581 cm^{-1} به دلیل وجود ارتعاش در پیوند Fe-O مربوط به نانوذره آهن است که سنتز نانوکریستال‌های آهن در فاز مگنتیت می‌باشد.

در هنگام داب شدن یون نقره بر روی نانوذرات آهن، به دلیل اثر پوششی، شدت این پیک کاهش می‌یابد. وجود پیک جذبی در ناحیه حدود 3500 cm^{-1} نشان‌دهنده حضور OH- در ساختار نانوذرات است.



شکل ۱. طیف جذبی FT-IR مربوط به نانوذرات آهن و نانوذرات نقره

همچنین مد انعکاس نانوذرات ندارد فقط باعث کاهش شدت برخی از پیک‌های انعکاسی می‌شود. تطابق اندیس‌های میلر به‌دست‌آمده برای نانوذرات اکسید آهن با پایگاه داده نشان می‌دهد که ساختار کریستالی این نانوکریستال‌ها مشابه کریستال مگنتیت بوده که دارای ساختار اسپینل مکعبی باشند.

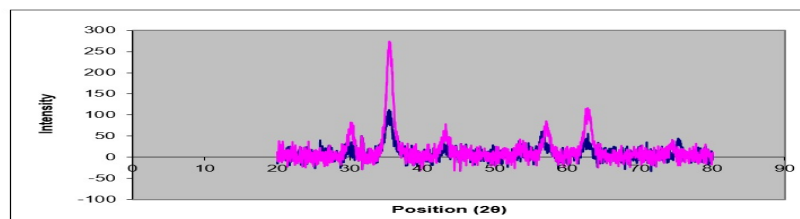
شد و به مدت ۵ دقیقه درون آن‌ها باقی ماند، سپس رنگ تخلیه و میکروپلیت با آب شهری شستشو داده شد. در پایان به چاهک‌ها محلول اسیداستیک ۳۳ درصد به مقدار ۱۵۰ میکرولیتر اضافه شد و میکروپلیت در دستگاه الیزا ریدر به‌منظور بررسی میزان جذب نوری چاهک‌ها قرار داده شد. در این بررسی میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر با نور جذبی ۸۰ یا بیشتر قرائت شد (۲۰، ۱۰).

روش بررسی سینتیک اثرگذاری غلظت‌نانو ذرات: به‌منظور بررسی سینتیک اثرگذاری غلظت‌ها بر روی باکتری موردنظر تیمارهای مرحله قبل تحت شرایط کاملاً مشابه تکرار شد و میکروپلیت‌ها تیمار شده مشابه در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه سپس رنگ‌آمیزی و در دستگاه الیزا ریدر قرائت گردید. برای هریک از باکتری‌های ایزوله و استاندارد استافیلوکوک اپیدرمیدیس مراحل به‌طور جداگانه انجام شد.

تجزیه و تحلیل اطلاعات

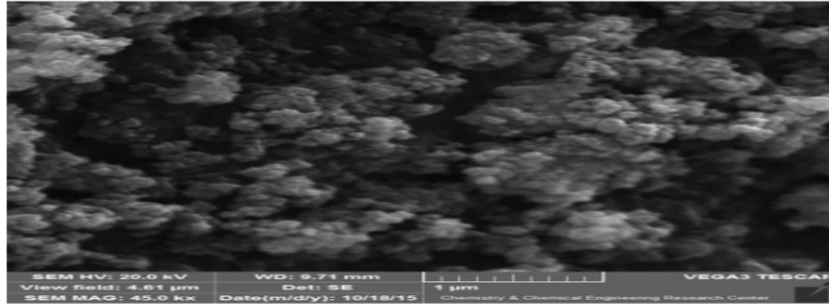
برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از قرائت دستگاه الیزا ریدر از تحلیل واریانس چهار طرفه بین آزمودنی استفاده شد. متغیر

شکل ۲ الگوی پراش پرتو X در نانوذرات اکسید آهن را نشان می‌دهد. پیک‌های انعکاسی ۲θ که در شکل ۲ نشان داده شده است انعکاس در زوایای $30/0$ ، $35/6$ ، $43/8$ ، $54/2$ ، $57/2$ ، $62/5$ را نشان می‌دهد. اندیس میلر مربوط به این انعکاس‌ها عبارتند از: ۵۱۱، ۴۲۲، ۲۲۰، ۴۰۰ و ۴۴۰. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، داب شدن یون نقره تأثیری بر ساختار کریستالی و



شکل ۲. پراش پرتو ایکس مربوط به نانوذرات اکسید آهن و نقره داب‌شده بر اکسید آهن

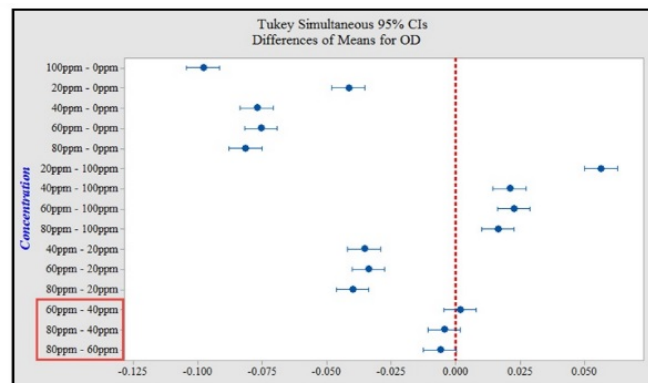
یون نقره با افزایش بارالکتریکی و نیز نامتقارن برهم‌کنش‌های مغناطیسی و همچنین تغییر در انرژی آزاد سطح نانوذره آهن، باعث رمیش جزئی ساختار کروی آن می‌شود.



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات نقره داپ شده بر اکسید آهن

شکل ۴ مقایسه دوبه‌دوی سطوح شش‌گانه عامل غلظت نانوذره را نشان می‌دهد، چنانچه فاصله اطمینان مربوطه بر روی خط منقطع نقطه صفر قرار گیرد نشان‌دهنده نبود اختلاف معنادار و در غیر این‌صورت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنادار خواهد بود. با توجه به نمودار مذکور فقط سه زوج وجود دارد که اختلاف آن‌ها معنادار نیست در تصویر این زوج‌ها داخل یک کادر رنگی قرار داده شده‌اند.

نتایج بررسی تأثیر عامل غلظت بر میزان کدورت باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس نشان داد متغیر غلظت بر میزان رشد باکتری در سطح خطای ۱ درصد دارای تأثیر معنادار است. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت بین غلظت و درصد حذف باکتری رابطه مستقیم برقرار است به این ترتیب که هر چه میزان غلظت نانوذرات بیشتر می‌شود باکتری کمتر رشد می‌یابد؛ چنان که بیشترین کدورت در غلظت ۰ ppm و کمترین کدورت در غلظت ۱۰۰ ppm دیده شد.



شکل ۴. مقایسه دوبه‌دوی سطوح شش‌گانه عامل غلظت نانوذره با استفاده از فاصله اطمینان و آزمون توکی

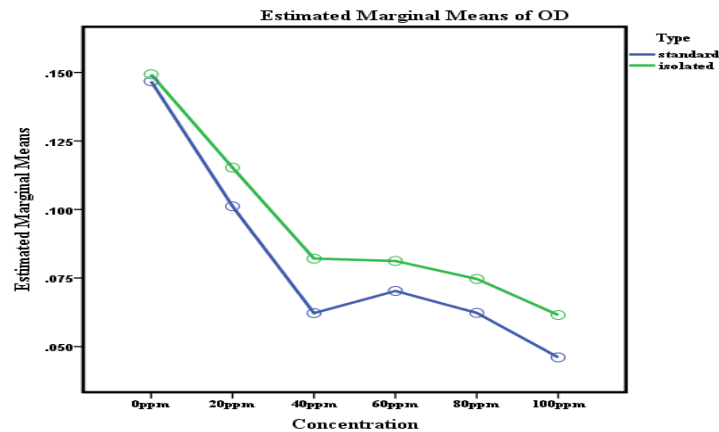
نتایج بررسی اثر عامل زمان ماند بر میزان کدورت در باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس نشان داد که متغیر زمان ماند بر روی رشد باکتری‌ها در سطح خطای ۱ درصد دارای اثری معنادار می‌باشد. چنان که بیشترین اثرگذاری نانوذرات در زمان ماند ۴۸ ساعت می‌باشد و میزان رشد باکتری‌ها در این زمان بیشتر کاهش می‌یابد.

همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است اثر تقابلی

نتایج بررسی اثر عامل نوع باکتری بر میزان کدورت در باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس نشان داد که متغیر نوع باکتری بر متوسط میزان کدورت یا به عبارت دیگر بر میزان رشد باکتری در سطح خطای ۱ درصد دارای اثر معنادار است؛ به طوری که اثر نانوذرات بر باکتری‌های ایزوله و استاندارد متفاوت است و میزان رشد باکتری استاندارد در حضور نانوذرات نسبت به نوع ایزوله کمتر بوده است.

است؛ به طوری که در مقایسه بین دو نوع باکتری ایزوله و استاندارد میزان اثر غلظت ۱۰۰ ppm بر باکتری استاندارد نسبت به میزان اثر کمتری دارد.

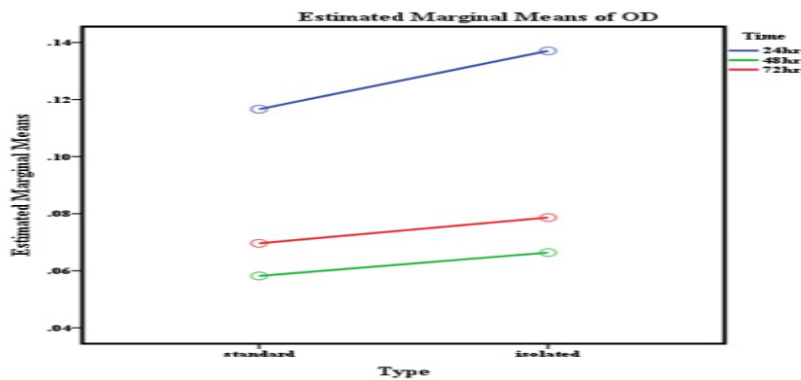
عوامل غلظت و نوع باکتری بر میزان کدورت در باکتری استفیلوکوکوس اپیدرمیدیس در سطح خطای ۱ درصد معنادار همان غلظت بر باکتری ایزوله بیشتر بوده است، به تعبیر دیگر، باکتری استاندارد در این غلظت نسبت به باکتری ایزوله، رشد



نمودار ۱. متوسط میزان کدورت به تفکیک ترکیب سطوح عوامل غلظت و نوع باکتری

خطای ۱ درصد معنادار است؛ به طوری که استفاده از باکتری استاندارد با زمان ماند ۴۸ ساعت منجر به کمترین میزان رشد باکتری خواهد شد.

نتایج حاصل از بررسی اثر تقابلی عوامل نوع باکتری و زمان ماند بر میزان کدورت در باکتری استفیلوکوکوس اپیدرمیدیس در نمودار ۲ نشان داده شده است، اثر تقابلی عوامل مذکور در سطح



نمودار ۲. متوسط میزان کدورت به تفکیک ترکیب سطوح عوامل نوع باکتری و زمان ماند

بین بردن سیستم تولید انرژی سلول از جمله مکانیسم‌های دخیل در سمیت نانوذرات است. همچنین بیان می‌کنند نانوذرات می‌توانند به تنهایی یا به کمک اشعه‌های پرانرژی تولید رادیکال آزاد کنند که این خود باعث مرگ میکروارگانیسم‌های مختلف

در بررسی اثر تقابلی عوامل غلظت، نوع باکتری و زمان ماند بر میزان کدورت در باکتری استفیلوکوکوس اپیدرمیدیس نتایج نشان داد اثر تقابلی عوامل در سطح خطای ۱ درصد معنادار نیست.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

می‌شود از طرفی نانوذرات می‌توانند یون‌های پر انرژی آزاد کنند که منجر به سلول می‌شود (۱۷). در منابع مختلف تأثیر ضدباکتریایی نانوذرات نقره به ناپایدار کردن پتانسیل غشایی، اتصال به گروه‌های عاملی پروتئین‌ها، نفوذ

در مطالعات انجام شده مکانیسم‌های مختلفی برای توجیه سمیت نانوذرات بیان گردیده است Pall و همکاران و Oka و همکاران بیان می‌کنند تخریب و غیرفعال کردن آنزیم‌های مهم سلولی و از

در بررسی اثر تقابلی غلظت و نوع باکتری نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، تفاوت میزان رشد باکتری‌های ایزوله و استاندارد در غلظت‌های مختلف تأیید می‌شود. براساس نتایج به دست آمده می‌توان گفت نوع باکتری بر میزان اثرگذاری نانوذرات مؤثر است که این جستار با نتایج پژوهش حبیبی‌پور و برخی محققان دیگر، مبنی بر این‌که اثر ضدباکتریایی نانوذرات به نوع و جنس باکتری بستگی دارد هم‌سو است (۲۹-۲۸). تفاوت اعداد به دست آمده در این پژوهش می‌تواند به این دلیل باشد که نوع باکتری ایزوله و استاندارد یکسان می‌باشد و هر دو استافیلوکوک اپیدرمیدیس بودند.

نتایج بررسی اثر سمیت غلظت‌های مختلف نانو ذرات در زمان‌ماندهای ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت در این مطالعه وابستگی زمان مواجهه با میزان سمیت را نشان داد به نحوی که با افزایش زمان ماند تا حداکثر ۴۸ ساعت میزان رشد باکتری، بیشتر کاهش یافت. نتایج به دست آمده با نتایج بررسی جبالی و همکاران که بیان می‌کنند افزایش زمان انکوباسیون باعث افزایش اثر ضد میکروبی نانوذرات در همه شکل و اندازه آن‌ها می‌شود (۳۰)، اگرچه این میزان، نسبت به تأثیر شکل و اندازه بسیار اندک می‌باشد مطابقت دارد.

اثر زمان ماند را این‌گونه می‌توان توجیه کرد که نانوذرات در زمان‌های مواجهه بالا امکان بیشتری برای نفوذ به داخل سلول و تخریب اجزای سلول خواهند داشت (۳۱)؛ به طوری که بیان می‌شود طی مدت زمان ماند نانوذرات نقره از خود ساطع می‌کنند که این یون‌ها طی واکنش جانشینی، باندهای SH را در جدار میکروارگانیسم به باندهای SA-g تبدیل می‌کنند که نتیجه آن از بین رفتن میکروارگانیسم است (۳۲). نتایج این تحقیق با نتایج سایر پژوهش‌ها مطابقت دارد.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد هر سه متغیر غلظت، نوع باکتری و زمان ماند تأثیر معنادار بر مهار رشد باکتری دارند اما غلظت تأثیر به مراتب بیشتری از خود نشان می‌دهد. همچنین می‌توان نتیجه گرفت تأثیر نقره داپ‌شده بر نانوکریستال آهن (ترکیب نانوذرات نقره با نانوکریستال اکسید آهن) در مهار رشد باکتری استافیلوکوک اپیدرمیدیس از نانوذرات نقره به حالت منفرد که پیشتر در پژوهش سایر محققان بررسی شده است، بیشتر می‌باشد. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت ترکیب نانوذرات فلزی همسان می‌تواند باعث افزایش اثر ضد میکروبی آن‌ها نسبت به حالت منفرد هریک از آن‌ها شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش مربوط به پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد به شماره

به درون سلول‌ها، غیرفعال کردن آنزیم‌ها و تولید پراکسید هیدروژن و در نهایت مرگ میکروارگانیسم‌ها نسبت داده شده است (۲۲-۲۱). اثبات شده است که نانوذرات اکسید آهن قادرند از طریق نیروهای الکترواستاتیک یا هیدروفوبیک به دیواره سلول‌های میکروبی و عوامل چسبنده سطحی متصل گردند، اتصال این نانوذرات به دیواره سلولی باکتری‌ها در عملکرد غشای سلولی اختلال ایجاد می‌کند و نفوذپذیری آن‌ها را افزایش می‌دهند (۲۳). نانوذرات اکسید آهن تأثیرات تقریباً مشابهی با نانوذرات نقره دارند. همچنین نانوذرات اکسید آهن با اشغال فاکتورهای چسبنده سطحی، در اتصال میکروارگانیسم‌ها به سلول میزبان نیز ایجاد تداخل می‌کنند و تشکیل بیوفیلم را به تأخیر می‌اندازند این امر باعث می‌شود باکتری‌ها نتوانند تثبیت شوند و تکثیر یابند. تشکیل کلونی، رشد سلول باکتری و تشکیل ماتریکس‌های بیوفیلیمی 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 (۲۴).

نتایج پژوهش حاضر به خوبی نشان داد ترکیب دو نانوذره نقره و اکسید آهن با هم می‌تواند باعث بهبود عملکرد آن‌ها شود که این، با نتایج سایر محققان مبنی بر تغییر اثر ضد میکروبی نانوذرات در حالت ترکیبی مطابقت دارد. چنان که Rezaei و همکاران بیان می‌کنند در صورت ترکیب نانوذرات اکسید آهن با سایر نانوذرات فلزی سمیت آن دچار تغییر می‌شود (۲۵). همچنین Jafari و همکاران و Yang و همکاران نشان دادند مواد شیمیایی ضد میکروبی که از دو گروه همسان هستند و دارای مکانیسم ضد میکروبی مشابه‌اند، اثر ضد میکروبی آن‌ها در حالت ترکیبی می‌تواند جمع‌شونده باشد در حالی که عوامل ضد میکروبی با مکانیسم اثر متفاوت از هم، ممکن است اثر ضد میکروبی یکدیگر را در حالت ترکیبی تقویت کنند، یا کاهش دهند (۲۶).

نتایج حاصل از تعیین خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نقره و اکسید آهن در حالت ترکیبی (نقره داپ شده بر نانوکریستال آهن) در پژوهش حاضر نشان داد بین غلظت و درصد حذف باکتری رابطه مستقیم وجود دارد. این نتایج با نتایج سایر محققان مبنی بر اینکه خاصیت ضد میکروبی نانوذرات تحت تأثیر غلظت آن‌ها می‌باشد مطابقت دارد چنان که Sadeghian و همکاران Dutta و همکاران نشان دادند سمیت نانوذرات و حذف بیوفیلم میکروارگانیسم‌ها، توسط آن‌ها وابسته به غلظت نانوذرات است (۱۲-۱۱، ۱۸). همچنین مرتضوی و همکاران بیان می‌کنند در غلظت‌های بالاتر نانوذرات توانایی از بین بردن بیوفیلم از قبل تشکیل شده را دارند (۲۷، ۱۰).

مرادی حق گو و آقلیان دکتر اصغر سیف و دکتر عباس فرمانی
سپاسگزارند.

۵۹۳۳۰۵۰۷۹۴۲۰۰۸ دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی
واحد همدان می باشد. نویسندگان از افرادی که آنها را در انجام
این پژوهش یاری کردند به خصوص سرکار خانم دکتر لیلا

References

- [1]. Rajabi M, Abdar ME, Rafiei H, Aflatoonia MR, Abdar ZE. Nosocomial infections and epidemiology of antibiotic resistance in teaching hospitals in south east of Iran. *Global journal of health science*. 2016;8(2):190.
- [2]. Stefanini I, Boni M, Silvaplana P, Lovera P, Pelassa S, De Renzi G, Mognetti B. Antimicrobial Resistance, an Update from the Ward: Increased Incidence of New Potential Pathogens and Site of Infection-Specific Antibacterial Resistances. *Antibiotics*. 2020;9(9):631.
- [3]. Michels R, Last K, Becker SL, Papan C. Update on Coagulase-Negative Staphylococci – What the Clinician Should Know. *Microorganisms*. 2021;9(4):830.
- [4]. Goudarzi M, Mehrabi M, Mirzaee M. A study on the prevalence of IS256 insertion sequence and biofilm formation in staphylococcus epidermidis isolated from healthy human skin. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2018;26(1):85-93.
- [5]. Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N. Phenotypic and genotypic characterization of biofilm producing clinical coagulase negative staphylococci from Nepal and their antibiotic susceptibility pattern. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2021;20(1):1-1.
- [6]. Mohamad M, Deabate L, Belaieff W, Bouvet C, Zingg M, Kuczma P, Suva D, Uckay I. Prosthetic joint infections due to coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Infection*. 2016;3(1).
- [7]. Salmani M. Survey of silver nanoparticles antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria in vitro. *Tolooebehdasht*. 2017;16(1):74-84.
- [8]. Najar-peeraeyeh s, jazayeri moghadas a, bakhshi b. Staphylococcus epidermidis virulence factor and ability of macroscopic biofilm production. *koomesh*. 2016;17(4):918-23
- [9]. Youssef FS, El-Banna HA, Elzorba HY, Galal AM. Application of some nanoparticles in the field of veterinary medicine. *International journal of veterinary science and medicine*. 2019;7(1):78-93.
- [10]. Mortazavi F. Nanotechnology applications in the management of microbial infections, *nanotechnology monthly*. 2015; 5: 214.
- [11]. Asghari A, Naghsh N, Madani M. In vitro Comparison of antifungal effect of silver nanoparticle on Candida producer of vulvovaginal candidiasis. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2015;9(3):23-30
- [12]. Sadeghian M, Habibipour R, Asghar Seif. Effect of silver nanoparticle on removing the enterococcus faecalis bacterium isolated from industrial resid. *Medical Laboratory Journal*. 2015;9(2):133-8.
- [13]. Shakerimoghaddam A, Razavi D, Rahvar F, Khurshid M, Mogharabi Ostadkelayeh S, Esmaeili S-A, Khaledi A, Eshraghi M. Evaluate the Effect of Zinc Oxide and Silver Nanoparticles on Biofilm and icaA Gene Expression in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated From Burn Wound Infection. *Journal of Burn Care Res*. 2020; 41(6):1253-1259.
- [14]. M. Armijo L, J. Wawrzyniec S, Kopciuch M, I. Brandt Y, C. Rivera A, J. Withers N, C. Cook N, L. Huber D, C. Monson T, D. C. Smyth H, Osiński M. Antibacterial activity of iron oxide, iron nitride, and tobramycin conjugated nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Nanobiotechnology*. 2020; 1(35).
- [15]. Siddique M, Aslam B, Imran M, Ashraf A, Nadeem H, Hayat S, Khurshid M, Afza M, Riaz Malik I, Shahzad M, Qureshi U, Haq Khan Z, Effect of Silver Nanoparticles on Biofilm Formation and EPS Production of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Biomedical Research International*, 2020; 2020 (1-9)
- [16]. Dehghan Nayeri F, Mirhosseini M, Mafakheri S, Zarrabi MM. Antibacterial and antifungal effects of silver nanoparticles synthesized by the aqueous extract of sesame (*Sesamum indicum L.*). *Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology)*. 2018;31(1):16-26.
- [17]. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International journal of nanomedicine*. 2017;12:1227.
- [18]. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Medizinische Mikrobiologie*: Springer-Verlag; 2013.
- [19]. Huang Y-F, Wang Y-F, Yan X-P. Amine-functionalized magnetic nanoparticles for rapid capture and removal of bacterial pathogens. *Environmental science & technology*. 2010;44(20):7908-13.
- [20]. Azizian R, Azizi Jalilian F, Askari H. Bacteriophage as a novel approach to inhibit and remove biofilms. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2012;20(4):104-109.
- [21]. Roy A, Bulut O, Some S, Mandal AK, Yilmaz MD. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC advances*. 2019;9(5):2673-702.
- [22]. Yun'an Qing LC, Li R, Liu G, Zhang Y, Tang X, Wang J, Liu H, Qin Y. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International journal of nanomedicine*. 2018;13:3311.
- [23]. Ramezani Ali Akbari, K., & Abdi Ali, A. Study of antimicrobial effects of several antibiotics and iron oxide nanoparticles on biofilm producing *pseudomonas aeruginosa*. *Nanomedicine Journal*. 2017;4(1), 37-43.
- [24]. Shahkarami F, Rashki S. Prevalence of ica operon related genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2016;9(4):16-23.
- [25]. Feng Q, Liu Y, Huang J, Chen K, Huang J, Xiao K. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-3.
- [26]. Xu X, Xu L, Yuan G, Wang Y, Qu Y, Zhou M. Synergistic combination of two antimicrobial agents closing each other's mutant selection windows to prevent antimicrobial resistance. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-7.
- [27]. Golipour F, Habibipour R, Moradihaghgou L. Investigating effects of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on *Candida albicans* biofilm formation. *Medical Laboratory Journal*. 2019;13(6):44-50.
- [28]. Mohamadzade JP, Azizi H, Khatami M, Yaghoobi H. Optimization of effective parameters on the suspension durability of green synthesis silver nanoparticles and evaluation their antimicrobial effect. 2020;8(1): 36-47.
- [29]. Habibipour R, Sadeghian M, Seif. Nanoparticle Effect in this Ashkhirshay Kelly Isolated from Industrial Wastewater. *Guilan University of Medical Sciences*. 2016; 25 (97): 50-34.
- [30]. Karaman DS, Manner S, Fallarero A, Rosenholm JM. Current approaches for exploration of nanoparticles as antibacterial agents. *Antibacterial agents*. 2017:61.
- [31]. Davaeifar S, Shahabani-Zahiri H, Mohammadi M, Akbari-Noghabi K. Evaluation of the Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on the Inhibition of Biofilm formation of standard Pathogenic Bacteria and Comparison with Drug Resistant Isolates. *Scientific journal of Ilam University of medical sciences*. 2019;27(3):138-49. (Persian)
- [32]. Nabipour Y, Rostamzad A, Ahmady AS. The Evaluation of Antimicrobial Properties of Zinc and Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus*. 2015: 173-181.