

## Evaluation of Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles, Ciprofloxacin, and their Combination against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Mohammad Zavarshani<sup>1\*</sup>, Malahat Ahmadi<sup>1</sup>, Habib Dastmalchi Saei<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

### Abstract

**Background and Objectives:** *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most common causes of secondary infections. Considering the indiscriminate use of antibiotics and the risk of antibiotic resistance, studies on identification of new antibacterial agents, have increased. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of silver nanoparticles, ciprofloxacin, and their combination on *P. aeruginosa* PAO1.

**Methods:** Inhibitory effect of silver nanoparticles and ciprofloxacin alone and their combination, was investigated on *P. aeruginosa* PAO1 using disk diffusion method. Also, using broth macrodilution method, MIC and MBC of each agent were determined. Data statistical analysis was performed using one-way ANOVA test. Significance level was considered to be  $p < 0.05$ .

**Results:** Investigation of the effect of silver nanoparticles and ciprofloxacin alone on *Pseudomonas aeruginosa* showed that dilutions above 15.26mg/ml and 5.85g/ml inhibit the bacterial growth. Also, evaluation of combined effect of silver nanoparticles and ciprofloxacin showed that the plates containing combined disks of ciprofloxacin and silver nanoparticles with dilutions of 1.46 $\mu$ g/ml and 1.95mg/ml caused inhibition zone, respectively.

**Conclusion:** It seems that silver nanoparticles in combination with ciprofloxacin have synergistic effect against *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, this issue reduces the risk of incidence of genetic mutations in bacteria and consequently reduces the risk of developing resistant strains.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; Ciprofloxacin; Nanoparticles; Silver.

\*Corresponding Author:  
Mohammad Zavarshani,  
Department of Microbiology,  
Faculty of Veterinary  
Medicine, Urmia University,  
Urmia, Iran.

Email:  
dr\_m\_zavarshani@yahoo.com

Received: 10 Apr, 2016

Accepted: 7 Jun, 2016

## ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره، سیپروفلوکساسین و ترکیب آنها علیه سودوموناس آئروژینوزا PAO1

محمد زوارشانی<sup>\*</sup>، ملاح احمدی<sup>۱</sup>، حبیب دستمالچی ساعی<sup>۱</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** سودوموناس آئروژینوزا، از عوامل شایع عفونت‌های ثانویه می‌باشد. با توجه به مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و خطر مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مطالعات پیرامون شناسایی ترکیبات جدید ضدباکتریایی افزایش یافته است. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره، سیپروفلوکساسین و ترکیب آنها علیه سودوموناس آئروژینوزا PAO1 انجام شد.

**روش بررسی:** اثر مهارکنندگی نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین به تنهایی و ترکیب توأم آنها، با کمک روش انتشار دیسک بر روی سودوموناس آئروژینوزا PAO1 بررسی گردید. با استفاده از روش برات ماکرودیولوشن؛ MIC و MBC هر یک از مواد تعیین شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه انجام شد. سطح معنی‌داری،  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** با بررسی اثر نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین به تنهایی بر روی سودوموناس آئروژینوزا مشخص گردید به ترتیب رقت‌های بالای ۱۵/۲۶ میلی‌گرم برلیتر و ۵/۸۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب مهار رشد باکتری می‌شود. همچنین ارزیابی اثر توأم نانوذرات نقره به همراه سیپروفلوکساسین نشان داد پلیت‌های حاوی دیسک‌های ترکیبی سیپروفلوکساسین و نانوذرات نقره به ترتیب با رقت‌های ۱/۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱/۹۵ میلی‌گرم برلیتر، سبب ایجاد هاله عدم رشد می‌شود.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد نانوذرات نقره در کنار سیپروفلوکساسین می‌تواند دارای اثر هم‌افزایی بر روی سودوموناس آئروژینوزا باشد. بنابراین، این موضوع شانس بروز جهش‌های ژنتیکی را در باکتری کاهش داده که در نتیجه خطر بروز سویه‌های مقاوم کاهش می‌یابد.

**کلید واژه‌ها:** سودوموناس آئروژینوزا؛ سیپروفلوکساسین؛ نانوذرات؛ نقره.

<sup>۱</sup>گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

<sup>\*</sup>نویسنده مسئول مکاتبات:

محمد زوارشانی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

dr\_m\_zavarshani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۷

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Zavarshani M, Ahmadi M, Dastmalchi Saei H. Evaluation of antibacterial effect of silver nanoparticles, ciprofloxacin, and their combination against pseudomonas aeruginosa paol. Qom Univ Med Sci J 2017;11(5):76-84. [Full Text in Persian]

## مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا، یک باکتری گرم منفی و همه‌جایی بوده که قادر به ایجاد عفونت‌های شدید، به‌خصوص فرصت‌طلب در افراد دچار نقص سیستم ایمنی می‌باشد (۱). در طی سالهای گذشته، افزایش عفونت‌ها ناشی از سودوموناس آئروژینوزا، به‌خصوص در افراد بستری در بیمارستان و مبتلا به بیماری‌های سیستمیک، چشمگیر بوده است (۲). امروزه نیز فلوروکوئینولون‌های نسل دوم و چهارم نظیر سیپروفلوکساسین و افلوکساسین به‌وفور جهت درمان عفونت‌های باکتریایی به کار می‌روند. این آنتی‌بیوتیک‌ها دارای تأثیر مثبتی علیه اغلب باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌باشند. لذا این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان داروی انتخابی جهت درمان عفونت‌های باکتریایی، به‌ویژه عفونت‌های سودوموناسی استفاده می‌شوند (۳). کسب مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سودوموناس آئروژینوزا شایع است (۱). لذا ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم، به‌خصوص در زمانی که صرفاً از یک نوع آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود دور از انتظار نبوده و یک نگرانی برای متخصصین بالینی محسوب می‌گردد (۴). با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، لزوم انجام مطالعه جهت شناخت، استفاده از ترکیبات و فرمول‌های دیگر به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها و یا ادجوانت همراه با آنها در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مختلف نظیر سودوموناس آئروژینوزا اهمیت پیدا می‌کند (۵). امروزه، استفاده از فلزات نظیر نقره، مس، طلا و آلومینیم در فرم‌های مختلف از جمله نانوذرات به‌عنوان ترکیباتی آنتی‌میکروبیال و باکتریسیدال رواج پیدا کرده است (۶). از بیش از ۲۰۰۰ سال قبل، خصوصیات دارویی و درمانی نقره شناخته شده است. با شروع قرن ۱۹ میلادی، از ترکیبات نقره در تجهیزات آنتی‌میکروبیال استفاده می‌شد (۷). امروزه، از این فلز به‌عنوان ترکیبی آنتی‌باکتریال در فرم‌های مختلف استفاده می‌شود (۸). در مقایسه با فلزات دیگر، نانوذرات نقره دارای قدرت سمیت بالایی بر روی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. همچنین از این ذرات می‌توان با موفقیت تحت عنوان عوامل بهداشتی و دارویی، در درمان عفونت‌ها استفاده کرد (۹).

نانوذرات نقره علاوه بر خاصیت ضدباکتریایی مؤثر؛ دارای اثرات ضدویروسی، ضدقارچی، همچنین ضدالتهابی نیز می‌باشد (۱۰). باتوجه به تأثیرات ضد میکروبی نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین می‌توان امیدوار بود این مواد بتوانند اثرات یکدیگر را بر روی سودوموناس آئروژینوزا تقویت کنند. مطالعات متعدد روی ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها و نانوذرات فلزی، نشان داده است میکروارگانیسم‌های مختلف چه گرم مثبت و چه گرم منفی، تحت تأثیر این اثرات سینرژیستی قرار می‌گیرند. با این حال، بخش قابل‌وجهی از مطالعات نشان می‌دهد این اثرات به‌طور کلی روی باکتری‌های گرم منفی مؤثرتر از باکتری‌های گرم مثبت بوده است (۱۱، ۱۲). به‌عنوان مثال، اثر ضدباکتریایی ترکیب نانوذرات نقره و آمپی‌سیلین روی باکتری‌های *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* به ترتیب ۱/۸ و ۲/۴ برابر افزایش نشان داده؛ درحالی‌که این اثر روی *Staphylococcus aureus* تنها ۰/۲ برابر افزایش داشته است (۱۱). همچنین تأثیر هم‌افزایی نانوذرات نقره در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، ونکومایسین و استریتومایسین بر روی سودوموناس آئروژینوزا در مطالعات مختلف تأیید شده است (۱۴-۱۲). ارزیابی اثر هم‌افزایی نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین بر روی سودوموناس آئروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند مفید باشد و از نتایج آن می‌توان در جهت مقابله با عفونت‌های ناشی از این پاتوژن استفاده کرد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوذرات نقره، سیپروفلوکساسین و ترکیب آنها علیه سودوموناس آئروژینوزا PAOI انجام شد.

## روش بررسی

در این مطالعه تجربی، باکتری سودوموناس آئروژینوزا سویه PAOI از بخش میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه تهیه گردید. جهت کشت و تکثیر باکتری، از محیط مولر هیتون آگار (Merck, Germany) استفاده شد. به‌منظور بررسی تأثیر نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین، سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند از باکتری تهیه گردید (۱۴)؛ بدین منظور، ابتدا استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند با استفاده از سولفات باریم ( $BaSO_4$ ) تهیه شد و سپس استانداردهای مک‌فارلند با افزودن

مذکور تهیه شد؛ بدین صورت که ابتدا از استوک هر یک از مواد، ۱۰۰۰ میکرولیتر برداشته و در داخل یک لوله استریل ریخته شد که غلظتی متشکل از ۲۰۰۰ میلی گرم برلیتر نانوذرات نقره و ۱۵۰۰ میکروگرم برمیلی لیتر سیپروفلوکساسین به دست آمد. سپس رقت سازی محلول حاصل با نسبت ۱:۱ به صورت سریال انجام گرفت. پس از تهیه محلول های مورد نیاز جهت انجام آزمایش، دیسک های بلانک به مدت یک ساعت در ۲۰ میکرولیتر از محلول های تهیه شده با غلظت های فوق الذکر قرار داده شدند و در نهایت، این دیسک ها بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار (حاوی سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند از باکتری مورد مطالعه) قرار گرفتند. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. پس از این مدت بر اساس استانداردهای کمیته ملی معیارهای آزمایشگاهی بالینی (NCCLS)، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک ها به وسیله خط کش اندازه گیری شد. تمامی موارد یاد شده با دو تکرار انجام گرفت.

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده باکتری (MBC)؛ رقت های مختلف، مشابه آنچه که در روش انتشار دیسک توضیح داده شد تهیه گردید، با این تفاوت که به جای آب مقطر استریل از محیط مولر هیتون پراث، استفاده و رقت سازی در داخل لوله استریل انجام شد. پس از تهیه رقت های مورد نظر، به هر لوله ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی ۰/۵ مک فارلند اضافه گردید. لوله های آماده شده به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. برای تعیین MIC، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع داخل هر یک از لوله ها بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار، منتقل و با استفاده از آنس استریل بر روی محیط کشت پخش گردید. سپس پلیت های تهیه شده به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با شرایط مذکور انکوبه شدند. پس از این زمان، اولین لوله از غلظت های پایین تهیه شده برای سه ترکیب مورد مطالعه که فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بودند، به عنوان غلظت MIC و اولین لوله از غلظت های تهیه شده که در آن ۹۹/۹٪ از مقدار اولیه باکتری های اضافه شده از بین رفته بود و در کشت مجدد تنها ۱٪ از باکتری ها رشد کرده بودند به عنوان غلظت MBC

حجم خاصی از محلول های اسید سولفوریک ۱٪ و باریم کلرید ۱/۱۷۵٪ برای به دست آوردن یک محلول سولفات باریم با دانسیته نوری خاص تهیه گردید. (به طور معمول، استاندارد ۰/۵ مک فارلند حاوی ۹۹/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱٪ و ۰/۵ میلی لیتر کلرید باریم ۱/۱۷۵٪، بیشتر کاربرد دارد). استاندارد ۰/۵ مک فارلند، کدورتی معادل با یک سوسپانسیون باکتریایی حاوی  $10^8 \times 1/5$  واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر ایجاد می کند و برای تهیه سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک فارلند، نیاز به کشت ۲۴ ساعته از باکتری می باشد. در ادامه، ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، باکتری از کشت ذخیره به محیط کشت آگار مغذی منتقل گردید و پس از رشد کشت مربوطه، به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی از پرگنه های به وجود آمده استفاده شد. سپس مقداری از سوسپانسیون میکروبی، داخل لوله استریل درب دار حاوی نرمال سالین ریخته شد و کدورت آن با اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر، اندازه گیری و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول ۰/۵ مک فارلند، با نرمال سالین رقیق گردید.

محلول نانوذرات نقره به صورت یک ویال ۴ لیتری با سایز ۲۰-۳ نانومتر {با نام تجاری Nanocolloid از شرکت نانوسید (NANOCID)} تهیه شد. از استوک اصلی محلول مذکور که دارای غلظت ۴۰۰۰ میلی گرم برلیتر بود به روش Serial Dilution رقت سازی با نسبت ۱:۱ با آب مقطر استریل انجام شد. غلظت های به دست آمده عبارت بودند از: ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱، ۳/۹۱، ۱/۹۵، ۰/۹۷۷، ۰/۴۸۸ و ۰/۲۴۴ میلی گرم برلیتر.

محلول سیپروفلوکساسین نیز به صورت قطره چشمی ۳٪ (هر ۱۰۰ میلی لیتر حاوی ۰/۳ گرم سیپروفلوکساسین) از شرکت سینا دارو - تهران تهیه گردید. با توجه به غلظت دارو، هر میلی لیتر از محلول، حاوی ۳۰۰۰ میکروگرم سیپروفلوکساسین بود. بر این اساس، سریال رقت های تهیه شده با نسبت ۱:۱ و غلظت های به دست آمده بر حسب میکروگرم برمیلی لیتر شامل: ۳۰۰۰، ۱۵۰۰، ۷۵۰، ۳۷۵، ۱۸۷/۵، ۹۳/۷۵، ۴۶/۸، ۲۳/۴، ۱۱/۷۱، ۵/۸۵، ۲/۹۲، ۱/۴۶، ۰/۷۳۱، ۰/۳۶۵، ۰/۱۸۲ بود. به منظور ارزیابی تأثیر توأم نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین؛ محلولی متشکل از دو ماده

همچنین نتایج تعیین میزان MIC و MBC نشان داد میزان MBC ترکیب توأم سیروفلوکساسین و نانوذرات نقره بر روی سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب در غلظت ۱/۹۵ میلی گرم برلیتر نانوذرات نقره و ۱/۴۶ میکروگرم بر میلی لیتر سیروفلوکساسین و میزان MIC در غلظت ۰/۹۷۷ میلی گرم برلیتر نانوذرات نقره و ۰/۷۳۱ میکروگرم بر میلی لیتر سیروفلوکساسین بوده است (جدول شماره ۴). آنالیز آماری نتایج نشان داد نانوذرات نقره و سیروفلوکساسین دارای اثر ضدباکتریایی بر روی سودوموناس آئروژینوزا PAO1 می باشند. همچنین ترکیب توأم این ذرات و سیروفلوکساسین دارای اثر هم افزایی بر روی سودوموناس آئروژینوزا بودند.

محاسبه گردید. تمای مراحل یادشده با دو تکرار انجام شد. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ و تست آماری واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی داری،  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

در پلیت‌های حاوی دیسک آنتی‌بیوتیک سیروفلوکساسین و نانوذرات نقره به تنهایی در رقت‌های ۵/۸۵ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱۵/۲۶ میلی گرم برلیتر، هاله عدم رشد مطابق با CLSI ایجاد شد (جدول شماره ۱ و ۲)، این در حالی بود که دیسک‌های تهیه شده از ترکیب توأم دو ماده مذکور در رقت‌های ۱/۴۶ میکروگرم بر میلی لیتر سیروفلوکساسین و ۱/۹۵ میلی گرم برلیتر نانوذرات نقره، هاله عدم رشد ایجاد کردند (جدول شماره ۳، شکل).

جدول شماره ۱: قطر هاله عدم رشد باکتری (بر حسب میلی متر) در رقت‌های مختلف نانوذرات نقره (بر حسب میلی گرم برلیتر).

| رقت      | ۰/۲۴۴ | ۰/۴۸۸ | ۰/۹۷۷ | ۱/۹۵ | ۳/۹۱ | ۷/۸۱ | ۱۵/۶۲ | ۳۱/۲۵ | ۶۲/۵ | ۱۲۵ | ۲۵۰ | ۵۰۰ | ۱۰۰۰ | ۲۰۰۰ | ۴۰۰۰ |
|----------|-------|-------|-------|------|------|------|-------|-------|------|-----|-----|-----|------|------|------|
| قطر هاله | ۰/۵   | ۳     | ۷     | ۹    | ۱۱   | ۱۳   | ۱۵    | ۱۷    | ۱۹   | ۲۱  | ۲۳  | ۲۶  | ۳۰   | ۳۳   | ۳۸   |

جدول شماره ۲: قطر هاله عدم رشد باکتری (بر حسب میلی متر) در رقت‌های مختلف سیروفلوکساسین (بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر).

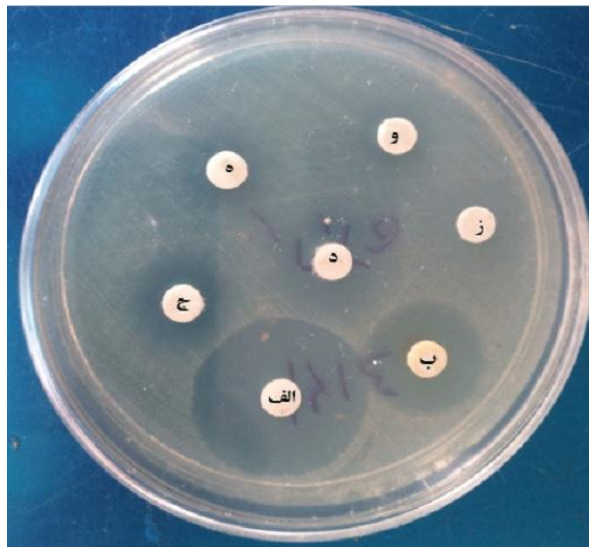
| رقت      | ۰/۱۸۲ | ۰/۳۶۵ | ۰/۷۳۱ | ۱/۴۶ | ۲/۹۲ | ۵/۸۵ | ۱۱/۷۱ | ۲۳/۴ | ۴۶/۸ | ۹۳/۷۵ | ۱۸۷/۵ | ۳۷۵ | ۷۵۰ | ۱۵۰۰ | ۳۰۰۰ |
|----------|-------|-------|-------|------|------|------|-------|------|------|-------|-------|-----|-----|------|------|
| قطر هاله | ۱     | ۵     | ۱۰    | ۱۱   | ۱۳   | ۱۵   | ۱۷    | ۱۹   | ۲۱   | ۲۲    | ۲۵    | ۲۷  | ۳۱  | ۳۴   | ۴۰   |

جدول شماره ۳: قطر هاله عدم رشد باکتری (بر حسب میلی متر) در رقت‌های مختلف ترکیب نانوذرات نقره + سیروفلوکساسین.

| شماره رقت     | ۱     | ۲     | ۳     | ۴    | ۵    | ۶    | ۷     | ۸     | ۹    | ۱۰    | ۱۱    | ۱۲  | ۱۳   | ۱۴   |
|---------------|-------|-------|-------|------|------|------|-------|-------|------|-------|-------|-----|------|------|
| نانوذرات نقره | ۰/۲۴۴ | ۰/۴۸۸ | ۰/۹۷۷ | ۱/۹۵ | ۳/۹۱ | ۷/۸۱ | ۱۵/۶۲ | ۳۱/۲۵ | ۶۲/۵ | ۱۲۵   | ۲۵۰   | ۵۰۰ | ۱۰۰۰ | ۲۰۰۰ |
| سیروفلوکساسین | ۰/۱۸۲ | ۰/۳۶۵ | ۰/۷۳۱ | ۱/۴۶ | ۲/۹۲ | ۵/۸۵ | ۱۱/۷۱ | ۲۳/۴  | ۴۶/۸ | ۹۳/۷۵ | ۱۸۷/۵ | ۳۷۵ | ۷۵۰  | ۱۵۰۰ |
| قطر هاله      | ۷     | ۱۰    | ۱۳    | ۱۵   | ۱۶   | ۱۸   | ۲۲    | ۲۵    | ۲۸   | ۳۱    | ۳۵    | ۳۸  | ۴۰   | ۴۲   |

جدول شماره ۴: نتایج MIC و MBC در رقت‌های مختلف نانوذرات نقره (بر حسب میلی گرم برلیتر)، سیروفلوکساسین (بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر) و ترکیب نانوذرات نقره + سیروفلوکساسین.

| نام ماده       | MIC   | MBC   |
|----------------|-------|-------|
| نانوذرات نقره  | ۱۵/۶۲ | ۳۱/۲۵ |
| سیروفلوکساسین  | ۵/۸۵  | ۱۱/۷۱ |
| نانوذرات نقره  | ۰/۹۷۷ | ۱/۹۵  |
| +سیروفلوکساسین | ۰/۷۳۱ | ۱/۴۶  |



شکل: هاله عدم رشد در رقت‌های مختلف ترکیب نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین.  
 (الف) نانوذرات نقره ۳/۹۱ میلی‌گرم بر لیتر، سیپروفلوکساسین ۲/۹۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر.  
 (ب) نانوذرات نقره ۱/۹۵ میلی‌گرم بر لیتر، سیپروفلوکساسین ۱/۴۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر.  
 (ج) نانوذرات نقره ۱/۹۷۷ میلی‌گرم بر لیتر، سیپروفلوکساسین ۲/۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر.  
 (د) نانوذرات نقره ۴/۸۸ میلی‌گرم بر لیتر، سیپروفلوکساسین ۳/۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر.  
 (ه) نانوذرات نقره ۲/۴۴ میلی‌گرم بر لیتر، سیپروفلوکساسین ۱/۸۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر.  
 (و) نانوذرات نقره ۱/۲۲ میلی‌گرم بر لیتر، سیپروفلوکساسین ۰/۹۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر.  
 (ز) دیسک بلانک (کنترل).

## بحث

سودوموناس آئروژینوزا، پاتوژنی فرصت‌طلب در ایجاد عفونت‌های مختلف می‌باشد که معمولاً عفونت ایجادشده توسط این باکتری به سرعت منجر به نکروز بافت می‌شود (۱۵). خصوصیات میزبانی نظیر وضعیت سیستم ایمنی، همچنین فاکتورهای حدت میکروبی در بروز عفونت‌های ناشی از این جرم مؤثر است. از فلوروکوئینولون‌ها به‌طور وسیع در درمان عفونت سودوموناسی استفاده می‌شود (۱۶). همچنین این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط آزمایشگاهی دارای تأثیرات مثبت چشمگیری برعلیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مولد عفونت‌های مختلف می‌باشند (۱۷). در سالهای اخیر با توجه به معضلات استفاده طولانی‌مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها، انجام مطالعات حول محور شناخت فرآورده‌ها و ترکیبات جدید مؤثر برعلیه باکتری‌های گرم منفی و مثبت مسبب عفونت‌های مختلف و به‌طور شاخص، عفونت‌های سودوموناسی در شرایط آزمایشگاهی و یا در عفونت‌های تجربی ایجادشده در مدل‌های حیوانی افزایش یافته است.

Onlen و همکاران (سال ۲۰۰۷)، جهت درمان کراتیت تجربی ایجادشده ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در خرگوش، از بره موم استفاده کردند، نتایج نشان داد بره موم به‌تنهایی تأثیر محدودی بر روی درمان کراتیت ایجادشده دارد (۱۵). همچنین استفاده از باکتریوسین‌ها و فرآورده‌های خارج سلولی باکتری به‌عنوان ترکیبات آنتی‌میکروبی، به‌خصوص ضدباکتریایی در مطالعات مختلف ارزیابی شده است. در این مطالعات، از باکتریوسین تولیدشده به‌وسیله لاکتوباسیلوس‌ها، با موفقیت برعلیه سودوموناس آئروژینوزا استفاده شده است (۱۸، ۱۹). در مطالعه حاضر از نانوذرات نقره به‌عنوان ترکیبی آنتی‌باکتریال برعلیه سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد. تحقیقات زیادی پیرامون نانوذرات نقره (تحت عنوان ترکیبات ضد میکروبی) صورت گرفته است. Markowska و همکاران (سال ۲۰۱۳) گزارش کردند نانوذرات نقره دارای تأثیرات مشخصی بر بیوفیلم ایجادشده توسط باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد (۲۰). تأثیر ضد میکروبی بسیار بالای نانوذرات نقره بر روی سودوموناس آئروژینوزا جدادشده از بیماران در نتایج مطالعات Afren و همکاران (سال ۲۰۱۱) نیز مشاهده می‌شود (۲۱).

Birla و همکاران (سال ۲۰۰۹) از ترکیب نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، استرپتومایسین و ونکومایسین بر علیه سودوموناس آئروژینوزا استفاده کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد ترکیب نانوذرات نقره و هریک از آنتی‌بیوتیک‌های مذکور دارای اثرات هم‌افزایی مشخص می‌باشد (۱۱). مقایسه این نتایج با مطالعه حاضر نشان داد غلظتی که در آن هاله عدم رشد باکتری در ترکیب نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین تشکیل شده، کمتر از غلظت‌های مطالعه مذکور بوده است. این موضوع می‌تواند به دلیل تفاوت در سایز نانوذرات مورد استفاده و یا مکانیسم عمل آنتی‌بیوتیک استفاده شده باشد. یکی از عوامل مؤثر بر اثرات ترکیبی نانوذره و آنتی‌بیوتیک، نوع نانوذره و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آنها است. خصوصیات نظیر اندازه ذرات، شکل و پایداری نانوذرات، کاملاً روی برهمکنش آنها با آنتی‌بیوتیک‌ها تأثیر گذار است. فعالیت ضد میکروبی بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها در حضور نانوذرات نقره، با اندازه‌ای بین ۴۰-۵ نانومتر افزایش می‌یابد و این اثر در محدوده اندازه ذره‌ای ۱۵-۵ نانومتر بسیار بیشتر است (۲۸).

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر و سایر تحقیقات انجام گرفته حاکی از آن است که نانوذرات نقره می‌تواند ترکیبی آنتی‌باکتریال بر علیه باکتری‌های مختلف باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد ترکیب این ذرات با آنتی‌بیوتیکی اختصاصی نظیر سیپروفلوکساسین منجر به تأثیر گذاری بیشتر دارو بر روی ارگانسیم می‌شود. لذا استفاده از ترکیب دو ماده مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی بر روی سودوموناس آئروژینوزا دارای مزیت‌های مختلفی به شرح زیر است:

۱- استفاده توأم نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین با یکدیگر دارای اثر هم‌افزایی بوده و در نتیجه میزان دوز مصرفی هر کدام از ترکیبات و مدت زمان لازم جهت از بین بردن باکتری در مقایسه با استفاده از هر کدام از آنها به تنهایی کاهش می‌یابد، بنابراین عوارض مصرف طولانی مدت این دو ماده به تنهایی کاهش می‌یابد؛ ۲- استفاده توأم از نانوذرات نقره و سیپروفلوکساسین،

همچنین یافته‌های مطالعات مختلف، خصوصیات ضد میکروبی و باکتریوسیدال این ذرات را بر روی سودوموناس آئروژینوزا در شرایط *in vitro* به خوبی تأیید می‌کند (۲۳، ۲۲، ۱۰)، که این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت. تأثیر نانوذرات نقره بر روی سودوموناس‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جدا شده از سوختگی‌ها توسط Singh و همکاران (سال ۲۰۱۴) نیز انجام گرفت، آنها گزارش کردند از نانوذرات نقره می‌توان به عنوان ترکیبی ضد باکتریایی بر علیه عفونت‌های سودوموناسی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در شرایط *in vitro* استفاده کرد (۲۴). همچنین با توجه به خصوصیات مشخص ضد میکروبی این ذرات، محققان بر آن شدند تا بتوانند با ترکیب این ذرات و موادی دیگر، خصوصیات ضد باکتریایی محصول ایجاد شده را افزایش دهند. به طور مثال ترکیب نانوذرات نقره و کیتوزان استات بر علیه سودوموناس آئروژینوزا ایجاد کننده عفونت در بیماران دچار سوختگی، ارزیابی و محصول ایجاد شده در غالب لباس بر تن بیماران دچار سوختگی بررسی گردید. نتایج این تحقیق نشان داد محصول مذکور دارای تأثیر مشخص در پیشگیری از بروز عفونت ناشی از سودوموناس آئروژینوزا بوده است (۲۵). میرزایی و همکاران گزارش کردند ترکیب آلیسین و نانوذرات نقره دارای اثر هم‌افزایی علیه عفونت پوستی ناشی از باکتری سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. MIC و MBC به دست آمده در این پژوهش با نتایج مطالعه حاضر شباهت فراوانی داشت (۲۶). کسب مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به وسیله سودوموناس آئروژینوزا، از مشکلات درمان انحصاری آنتی‌بیوتیکی عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌باشد. بنابراین، ترکیب نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند ایده مناسبی جهت کاهش وقوع مقاومت دارویی باشد. در مطالعه Brown و همکاران (سال ۲۰۱۲)، از ترکیب نانوذرات نقره و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در جهت از بین بردن سودوموناس‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد ترکیب فوق به سرعت می‌تواند این قبیل سویه‌های مقاوم را تخریب کند (۲۷). با اینکه مطالعه مذکور بر روی سویه‌های مقاوم انجام شده بود، ولی تا حدود زیادی با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت.

## تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجویی مقطع دکتری باکتری‌شناسی (به شماره رهگیری ۱۱۶۰۵۵۹) می‌باشد. نویسندگان این مقاله از تمامی افرادی که داوطلبانه ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر می‌کنند.

شانس بروز جهش‌های ژنتیکی را به‌منظور مقاومت در برابر دارو در باکتری کاهش می‌دهد. با توجه به مشکلاتی که در مسیر درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا نظیر بروز سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود دارد، انجام مطالعات جدی‌تر و کاربردی‌تر پیرامون استفاده از ترکیبات و یا فرآورده‌های آنتی‌باکتریال جدید، به‌منظور درمان این‌گونه عفونت‌ها حایز اهمیت است.

## References:

- Kapoor R, Wadman MW, Dohm MT, Czyzewski AM, Spormann AM, Barron AE. Antimicrobial peptoids are effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(6):3054-57.
- Fazeli H, Akbari R, Moghim S, Narimani T, Arabestani MR, Ghoddousi AR. *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients, hospital means, and personnel's specimens. *J Res Med Sci* 2012;17(4):332-7.
- Lee SK, Park DC, Kim MG, Boo SH, Choi YJ, Byun JY, et al. Rate of isolation and trends of antimicrobial resistance of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from otorrhea in chronic suppurative otitis media. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2012;5(1):17-22.
- Amirulhusni A, Palanisamy N, Mohd-Zain Z, Jian Ping L, Durairaj R. Antibacterial effect of silver nanoparticles on multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int Sch Sci Res Innov* 2012;6(7):208-11.
- Rajawat S, Qureshi MS. Study on bactericidal effect of biosynthesized silver nanoparticles in combination with Gentamicin and Ampicillin on *Pseudomonas aeruginosa*. *Nano Hybrid* 2013;3(2):37-49.
- Parameswari E, Udayasoorian C, Paul Sebastian S, Jayabalakrishnan RM. The bactericidal potential of silver nanoparticles. *Int Res J Biotechnol* 2010;1(3):44-9.
- Parabhu S, Poulouse E. Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications and toxicity effects. *Int Nano Lett* 2012;2(32):2-10.
- Paredes D, Ortiz C, Torres R. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Nanomedicine* 2014;9(3):1717-29.
- Wong K, Liu X. Silver nanoparticles- The real silver bullet in clinical medicines. *Med Chem Comm* 2010;1(2):125-31.
- Chen M, Yang Z, Wu H, Pan X, Xie X, Wu C. Antimicrobial activity and the mechanism of Silver Nanoparticles thermosensitive gel. *Int J Nanomedicine* 2011;6(4):2873-77.
- Birla SS, Tiwari VV, Gade AK, Ingle AP, Yadav AP, Rai MK. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol* 2009;48(2):173-9.
- Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: A study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine* 2010;6(1):103-9.
- Ruden S, Hilper K, Berditsch M, Wadhvani P, Ulrich AS. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(4):3538-40.



14. Gordon O, Slenters TV, Brunetto PS, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M, et al. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(3):4208–18.
15. Onlen Y, Tamer C, Oksuz H, Duran N, Altug ME, Yakan S. Comparative trial of different anti-bacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on *Pseudomonas keratitis* in rabbits. *Microbiol Res* 2007;162(1):62-8.
16. Deschaght P, Van Daele S, De Baets F, Vaneechoutte M. PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients, a literature review. *J Cyst Fibros* 2011;10(5):293-7.
17. Banoee M, Seif S, Nazari ZE, Jafari-Fesharaki P, Shahverdi HR, Moballeghe A, et al. ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of Ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;93(2):557-61.
18. Kanagaraj J, Tamil Selvi A, Senthilvelan T, NChandra Babu NK, Chandrasekar B. Evaluation of new bacteriocin as a potential short-term preservation for goat skin. *Am J Microbiol Res* 2014;2(3):86-93.
19. Jamalifar H, Rahimi HR, Samadi N, Shahverdi AR, Sharifian Z, Hosseini F, et al. Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi- drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol* 2011;3(1):21–5.
20. Markowska K, Grudniak AM, Wolska KI. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim Pol* 2013;60(4):523-30.
21. Afreen A, Rathod V, Ranganath E. Synthesis of monodispersed Silver Nanoparticles by *Rhizopus stolonifer* and its antibacterial activity against MDR strains of *Pseudomonas aeruginosa* from burnt patients. *Int J Environ Sci* 2011;1(7):1830-40.
22. Devi J, Valentin Bhimba B. Antibacterial and antifungal activity of silver nanoparticles synthesized using *Hypnea muciformis*. *Biosci Biotechnol Res Asia* 2014;11(1):235-8.
23. Oza G, Pandey S, Shah R, Sharon M. Extracellular fabrication of silver nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa* and its antimicrobial assay. *Pelagia Res Library* 2012;3(3):1776-83.
24. Singh K, Panghal M, Kadyan S, Chaudhary U, Yadav J. Green silver nanoparticles of *Phyllanthus amarus*: As an antibacterial agent against multi drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Nanobiotechnol* 2014;12(40):1-9.
25. Huang L, Dai T, Xuan Y, Tegos GP, Hamblin MR. Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: Efficacy Against bacterial burn infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(7):3432-8.
26. Mirzaei F, Salouti M, Shapouri R, Alizadeh H. Antibacterial effect of allicin, silver nanoparticles, and their combination against skin infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in Animal model. *J Fasa Univ Med Sci* 2014;4(3):311-17. [Full Text in Persian]
27. Brown AN, Smith K, Samuels TA, Lu J, Obare SO, Scott ME. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(8):2768-74.
28. Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine* 2007;3(2):168-71.