

ارزیابی ویژگی ضد میکروبی نانوکامپوزیت نقره / آهن اکسید تولید شده با نشاسته

سیده معصومه قاسمی نژاد

گروه بیوتکنولوژی صنعتی، پژوهشکده توسعه صنایع شیمیایی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

سپیده حامدی

گروه پالایش زیستی، دانشکده مهندسی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

سید عباس شجاع‌الساداتی*

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده: سامانه دوجزئی نقره و آهن اکسید به دلیل تلفیق ویژگی‌های این نانوذره‌های با یکدیگر مانند ویژگی مغناطیسی، نوری و ضد میکروبی در حوزه‌های گوناگون بویژه پزشکی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در این پژوهش، نانوکامپوزیت نقره/آهن اکسید (Ag/Fe_3O_4) با استفاده از نشاسته به عنوان عامل پایدارکننده و متصل‌کننده این دو ذره به یکدیگر سنتز شد و فعالیت ضدباکتریایی و ضد فیلم زیستی آن علیه باکتری‌های اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی و مقایسه با نانوذره‌های نقره قرار گرفت. نانوذره‌های نقره موجود در نانوکامپوزیت به صورت جداگانه با اندازه ۱۵۰-۵۰ به واسطه گروه‌های عاملی نشاسته به توده‌ای از نانوذره‌های Fe_3O_4 با اندازه ۲۰-۱۰۰ متصل شدند. MIC و MBEC نانوکامپوزیت بسته به گونه باکتریایی و شرایط تولید به ترتیب در بازه ۱۴-۲ و ۳۰-۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. نصف مقدار MIC نانوکامپوزیت باعث افزایش فاز تاخیری منحنی رشد اشریشیاکلی به مدت ۸ ساعت و استافیلوکوکوس اورئوس به مدت ۵ ساعت شد. نانوذره‌های آهن اکسید به تنهایی تأثیر محسوسی بر منحنی رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد بررسی نداشتند، اما در نانوکامپوزیت باعث ایجاد اثر هم‌افزایی بر فعالیت ضدباکتریایی نانوذره‌های نقره علیه باکتری گرم منفی شدند. نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 در غلظت نصف MBEC نیز برخلاف نانوذره‌های نقره باعث ثابت نگهداشتن جرم فیلم زیستی شد. بررسی زمان مرگ باکتری‌ها نشان داد که نانوذره‌های نقره موجود در نانوکامپوزیت به دلیل درگیری با نشاسته و نانوذره‌های آهن اکسید و متعاقباً رهایش کندتر نقره در مقایسه با نانوذره‌های نقره مجزا با سرعت کمتری باعث مرگ باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌شود.

واژگان کلیدی: نانوکامپوزیت، نانو نقره، آهن اکسید، نشاسته، فعالیت ضدباکتریایی

KEYWORD: Nanocomposites; Nano Silver; Iron oxide; Starch; Antibacterial activity

مقدمه

نانوذره‌های نقره در مقایسه با سایر نانوذرهای ضد میکروبی بواسطه ویژگی‌های ذاتی مانند هدایت، پایداری شیمیایی، فعالیت کاتالستی، رفتار نوری غیر خطی و فعالیت ضد میکروبی، بسیار مورد توجه هستند. این ویژگی‌ها آنها را برای استفاده به عنوان عامل عفونت‌زدایی میکروبی در زمینه پزشکی مناسب می‌سازد. امروزه بسیاری از تجهیزات جراحی، چسب‌های زخم، ایمپلنت‌ها و پروتزهای استخوانی با نانوذرهای نقره پوشیده و یا ترکیب شده‌اند [۱-۳]. با این حال استفاده از این نانوذرها در حوزه پزشکی با مشکلات عمده‌ای توأم است. نانوذرهای نقره حتی در غلظت‌های پایین (۲-۵ میلی‌گرم بر لیتر) نیز با پیشگیری از تکثیر سلول‌های یوکاریوت بر حالت فیزیولوژیکی آنها تأثیر گذاشته و با آسیب زدن به ریخت‌شناسی آنها باعث از دست دادن عملکرد اصلی‌شان می‌شود. از سوی دیگر، به دلیل نفوذپذیری کم نانوذرهای نقره در فیلم زیستی^۱، غلظت بالایی از آنها برای از بین بردن فیلم زیستی مورد نیاز است [۴]. از دیگر مشکل‌های اصلی نانوذرهای نقره کاهش فعالیت ضدباکتریایی این ذره‌ها به دلیل اکسایش و توده‌ای شدن سریع آنها در محیط است [۵،۶].

سامانه دو جزئی نقره و آهن اکسید با ترکیب مشخصه‌های نقره و آهن اکسید می‌تواند در تفرق رامن ارتقاء یافته سطحی، در تخریب کاتالستی رودامین بی، به عنوان حسگرهای الکتروشیمیایی، القاگرهای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی و عامل ضدباکتریایی و ضد قارچی مورد استفاده قرار گیرد [۷]. با اتصال نانوذرهای نقره روی سطح نانوذرهای آهن اکسید، پراکندگی نانوذرهای نقره بهبود یافته و قابلیت کنترل آنها با اعمال میدان مغناطیسی فراهم خواهد شد. ترکیب نانوذرهای نقره با نانوذرهای مغناطیسی همچنین می‌تواند باعث افزایش عمق نفوذ آنها در فیلم زیستی با اعمال میدان مغناطیسی شود. در سال ۲۰۰۹ میلادی، فعالیت ضد میکروبی نانو ساختار سوپرپارامغناطیس Ag/Fe_3O_4 سنتز شده به روش تجزیه گرمای در مقابل باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس آورئوس و باسیلوس مگاتریوم) و گرم منفی (شریشیا کولی و پروتئوس ولگاریس) مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌ها نشان داد که فعالیت ضد میکروبی این نانو ساختار علیه باکتری‌های گرم منفی بیش‌تر از باکتری‌های گرم مثبت است و کمینه غلظت بازدارندگی (MIC) نانو ساختار کم‌تر از آنتی‌بیوتیک‌های رایج تجاری می‌باشد [۸]. Pucek در سال ۲۰۱۱ میلادی نانو کامپوزیت Ag/Fe_3O_4

را با استفاده از پلی لاکتیک اسید به عنوان عامل اتصال دهنده نقره و آهن اکسید و مالتوز به عنوان کاهنده سنتز کردند. کم‌ترین مقدار MIC در این پژوهش حدود ۱۵/۶ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد [۹]. Dallas و همکاران از فسفوتریازین به عنوان عامل اتصال دهنده و کاهنده در سنتز نانو کامپوزیت Ag/Fe_3O_4 با MIC حدود ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر استفاده کردند [۱۰]. در ۲۰۱۲ میلادی پژوهشگران یک روش سبز برای سنتز نانو کامپوزیت Ag/Fe_3O_4 با استفاده از کیتوسان به عنوان پایدار کننده توسعه دادند که مقدار MIC آن^۲ (حدود ۷ میلی‌گرم بر لیتر) بطور چشمگیری کمتر از مقدارهای گزارش شده در پژوهش‌های پیشین بود [۷]. محمودی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ میلادی از سدیم بروهیدرات و دکستران کربوکسیله شده به ترتیب به عنوان احیاکننده و پایدار کننده برای سنتز نانو کامپوزیت Ag/Fe_3O_4 استفاده کردند [۱۱]. در سال ۲۰۱۶ میلادی، تیم پژوهشی ما از نشاسته به عنوان کاهنده و عامل اتصال دهنده نقره و آهن اکسید در سنتز نانو کامپوزیت Ag/Fe_3O_4 استفاده کرد [۱۲]. تأثیر درصد‌های گوناگون نشاسته، غلظت یون نقره و pH بر مشخصه‌های نانو کامپوزیت مانند میانگین و توزیع اندازه، ریخت‌شناسی، ویژگی مغناطیسی به تفصیل مورد بررسی قرار گرفت [۱۲]. سپس در سال ۲۰۱۸ میلادی فعالیت ضد فیلم زیستی نانو کامپوزیت Ag/Fe_3O_4 را با ساخت مدل سه بعدی فیلم زیستی زخم مزمن مورد بررسی قرار دادیم. نتیجه‌ها نشان دهنده افزایش قابل توجه فعالیت ضد فیلم زیستی نانو کامپوزیت Ag/Fe_3O_4 با اعمال میدان مغناطیسی در مقایسه با نانوذرهای نقره بود [۴]. در سال ۲۰۱۹ میلادی، Lazic و همکاران از آهن اکسید عامل‌دار شده با آمینوسالیسیلیک اسید به عنوان بستری برای کاهش یون نقره استفاده کردند [۱۳]. مقایسه فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی این نانوهیبرید نشان داد که برخلاف فعالیت ضدباکتریایی قابل توجه آن، فعالیت ضدقارچی آن بسیار ناچیز است. تولید فروسیال نانو کامپوزیت Ag/Fe_3O_4 [۱۴] و پوشش ضد میکروبی این نانو کامپوزیت [۱۵] از دیگر پژوهش‌های نوینی است که در این حوزه انجام شده است.

پژوهش‌های انجام شده در این تیم پژوهشی از معدود پژوهش‌هایی است که در زمینه سنتز سبز نانو کامپوزیت Ag/Fe_3O_4 انجام شده است. توسعه روش‌های سبز افزون بر برتری‌های زیست محیطی باعث گسترش کاربرد نانو کامپوزیت Ag/Fe_3O_4 در حوزه پزشکی و داروسازی می‌شود. اگرچه در مقاله‌های پیشین به صورت جزئی در مورد

(۱) Biofilm

(۲) Minimum Inhibition Concentration (MIC)

با آهن ربا جدا شد و به منظور خروج یون‌ها و ترکیب‌های اضافی، چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد.

تولید نانوذره‌های نقره

به منظور ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 در مقایسه با نانوذره‌های نقره، نانوذره‌های نقره با استفاده از نشاسته و در شرایطی مشابه شرایط تولید نانوکامپوزیت، تولید شد. در این فرایند 0.085% گرم نمک $AgNO_3$ مولار (0.1) مولار در 50 میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. pH محلول با آمونیاک 8 مولار در بازه $11-10.5$ تنظیم شد. سرانجام به مدت یک ساعت در دمای $80^\circ C$ و 1000 rpm گرمادهی شد.

تعیین مشخصه‌های نانوکامپوزیت

به منظور ارزیابی حضور نانوکامپوزیت بر سطح سلول باکتریایی از میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیل (مدل Hitachi S-4800) استفاده شد. برای دیدن شکل و توزیع اندازه ذره‌ها، عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری (مدل Tecnai G2 F20 U-TWIN) 200 کیلوولت انجام شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها، قطره‌ای از کلوتید نانوکامپوزیت روی توری مسی پوشیده با کربن ریخته و در دمای محیط خشک شد.

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی

برای ارزیابی کمینه غلظت مهارکنندگی رشد باکتری (MIC) توسط نانوذره‌ها از روش استاندارد رقیق‌سازی سریالی در محیط مایع استفاده شد [۱۷]. کلویید نانوذره‌ها با غلظت 50 ppm با محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) 2×10^6 تا 2.56×10^6 برابر رقیق شدند. سپس 20 میکرولیتر مایه تلقیح باکتریایی (با غلظت 5×10^5 سلول بر یک میلی‌لیتر و دانسیته نوری 0.1) به آن افزوده شد. منحنی رشد باکتری با اندازه‌گیری دانسیته نوری محلول در طول موج 600 نانومتر در فاصله هر 30 دقیقه طی 24 ساعت گرمادهی در دمای $37^\circ C$ به‌دست آمد.

برای تعیین کمینه غلظت کشندگی نانوذره‌ها (MBC)^۱، 10 میکرولیتر محیط کشت از چاهک‌های مربوط به غلظت MIC و بالاتر به محیط کشت تریپتیک سوی آگار (TSA) انتقال یافت و به مدت 24 ساعت در دمای $37^\circ C$ گرمادهی شد. MBC معادل غلظتی از نانوذره است که در آن هیچ باکتری رشد نکرد.

فعالیت ضد میکروبی نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 سنتز شده با نشاسته در برابر باکتری‌های شناور بحث کردیم [۱۲]، در این مطالعه با بررسی منحنی رشد چند سوبه گرم مثبت و منفی در مجاورت نانوذره‌های نقره، نانوذره‌های آهن اکسید و نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 و همچنین بررسی زمان مرگ آن‌ها، به تفصیل این موضوع ارزیابی شده است. بررسی جرم فیلم زیستی باکتریایی در مجاورت نانوکامپوزیت و تعیین مقدار کمینه غلظت نانوذره‌های تخریب‌کننده فیلم زیستی (MBEC)^۱ با استفاده از مدل دو بعدی فیلم زیستی از دیگر موضوعاتی است که در این مقاله به آن پرداخته شده است.

بخش تجربی

مواد و میکروارگانیزم‌ها

نشاسته سیب‌زمینی، آهن کلرید، آهن سولفات و نقره نیترات از شرکت سیگما آلدریج خریداری شد. باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از بانک سلولی آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شدند.

تولید نانوذره‌های Fe_3O_4

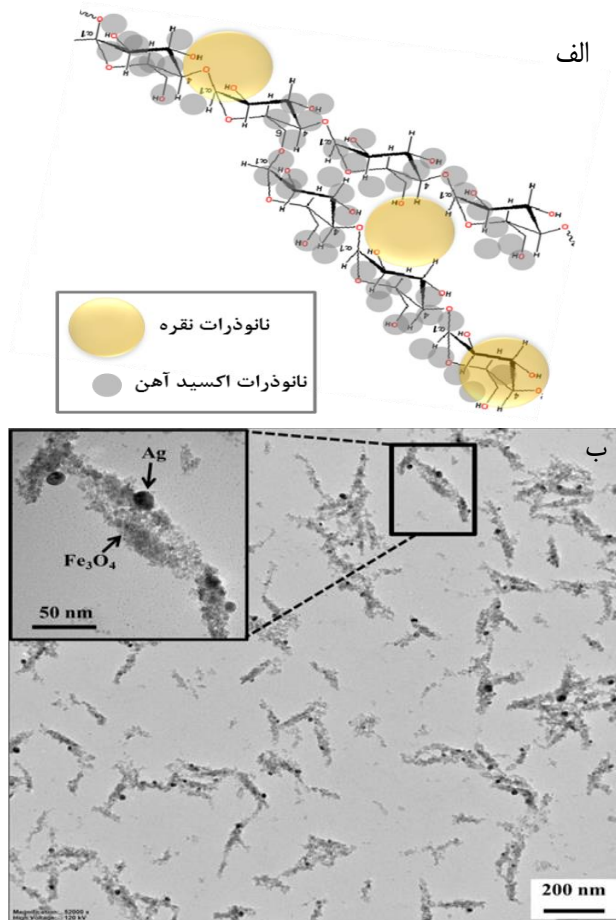
برای تولید نانوذره‌های Fe_3O_4 ، $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ و $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ با نسبت مولی $1:2$ به 200 میلی‌لیتر محلول نشاسته با درصدی وزنی گوناگون ($1/10\%$ ، $1/6\%$ و $2/10\%$) افزوده شد [۱۶]. سپس به مدت 15 دقیقه در دمای $60^\circ C$ تحت جو نیتروژن گرما داده شد. در مرحله بعد، pH محلول با استفاده از آمونیاک (8 مولار) در بازه $11-10$ تنظیم شد. سرانجام بعد از 3 ساعت گرمادهی در دمای $60^\circ C$ ، نانوذره‌ها با استفاده از آهن ربا از محلول جدا شده و چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد.

تولید نانوکامپوزیت مغناطیسی Ag/Fe_3O_4

نانوذره‌های Fe_3O_4 تولید شده در بخش قبل مجدداً به 50 میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد و به منظور پراکندگی مناسب ذره‌ها در آب، به مدت 15 دقیقه در حمام فراصوت قرار داده شد. سپس 0.085% گرم نمک $AgNO_3$ (0.1 مولار) به محلول افزوده شد. پس از 5 دقیقه گرمادهی در دمای $80^\circ C$ ، pH محلول با آمونیاک 8 مولار در بازه $11-10.5$ تنظیم شد. محلول نهایی به مدت یک ساعت در دمای $80^\circ C$ و دور 1000 rpm هم‌زده شد. سرانجام نانوکامپوزیت

(۱) Minimum Biofilm Eradication Concentration (MBEC)
(۳) Minimal Biocidal Concentration (MBC)

(۲) Tryptic Soy Broth (TSB)



شکل ۱ الف) نمایی از ساختار نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 (ب) تصویر TEM نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4

غلظت نقره نیترات و مقدار نشاسته بر مشخصه‌های نانوکامپوزیت مانند اندازه و پایداری نانوذره‌ها قبلاً به تفصیل توسط این تیم پژوهشی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت و نتیجه‌های آن منتشر شد [۱۲]. نمایی از ساختار نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 و تصویر TEM آن در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که در تصویر TEM مشخص است، نانوذره‌های نقره منفرد به توده‌ای از نانوذره‌های Fe_3O_4 متصل شده است. اندازه نانوذره‌های نقره و آهن اکسید در نانوکامپوزیت به ترتیب ۱۵-۵۰ nm و ۲-۱۰ nm است.

براساس مطالعات انجام شده و بررسی فرایند تولید، سازوکار تولید نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 با استفاده از نشاسته به شرح زیر می‌تواند باشد. مرحله اول تولید نانوکامپوزیت، تشکیل نانوذره‌های Fe_3O_4 با نشاسته است. واکنش‌های (۱) تا (۳) سازوکار تشکیل این نانوذره‌ها را در محیط قلیایی نشان می‌دهد [۱۸].

برای مطالعه سینتیک زمان مرگ باکتری در تماس با نانوذره‌های نقره و نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 ، محیط کشت TSB با غلظت 5×10^5 باکتری بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس نانوذره‌های نقره و نانوکامپوزیت به آن افزوده شد و در دمای $37^\circ C$ به مدت ۸ ساعت گرمادهی شد. در طول زمان گرمادهی هر دو ساعت یک بار نمونه‌گیری شد و بر پلیت TSA انتقال یافت. بشقاب‌ها در دمای $37^\circ C$ به مدت ۲۴ ساعت گرمادهی شدند. سرانجام تعداد کلنی‌های تشکیل شده (CFU) شمارش شد. محیط بدون نانوذره‌ها به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

ارزیابی فعالیت ضدفیلم زیستی نانوذره‌های نقره و نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4

برای تعیین MBEC، پگ‌لید^۱ در چاهک‌های حاوی 160 میکرولیتر TSB آغشته شده به باکتری (با غلظت 10^7 cfu/ml) افزوده شد و پس از 30 دقیقه، به پلیت خانه ۹۶ با TSB تازه انتقال پیدا کرد. بعد از 48 ساعت گرمادهی در $37^\circ C$ ، پگ‌لید به بشقاب جدید حاوی TSB و غلظت‌های گوناگون نانوذره‌ها قرار داده شد. بعد از 24 ساعت گرمادهی در $37^\circ C$ ، غوطه‌وری آهسته پگ‌لیدها در محیط کشت تازه برای حذف نانوذره‌های اضافی انجام شد. سپس آنها به بشقاب احیاء (TSB تازه بدون نانوذره‌ها) انتقال یافتند. بعد از 24 ساعت گرمادهی، 10 میکرولیتر محیط از چاهک‌های بدون کدورت (عدم رشد باکتری) به پلیت TSA انتقال یافت. سرانجام پس از 24 ساعت گرمادهی، اولین چاهکی که در آن رشد باکتری دیده نشد، معادل غلظت MBEC است.

برای تعیین جرم فیلم زیستی در تماس با نانوذره‌های نقره و نانوکامپوزیت از روش سنجش بلور ویوله (CV) استفاده شد. نخست محیط کشت TSB از پلیت خانه حذف شد. سپس فیلم زیستی تشکیل شده در کف چاهک‌ها با نمک بافر فسفات (PBS؛ غلظت $1 \times$) شستشو داده شد. در مرحله بعد 100 میکرولیتر بلور ویوله به هر چاهک افزوده شد. پس از 15 دقیقه گرمادهی، بلور ویوله حذف و چاهک‌ها سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد. بعد از خشک شدن فیلم زیستی، 200 میکرولیتر اتانول 96% به چاهک‌ها افزوده شد. سرانجام بعد از 15 دقیقه گرمادهی در دمای $37^\circ C$ ، دانسیته نوری آن‌ها در طول موج 585 نانومتر اندازه‌گیری شد.

نتیجه‌ها و بحث

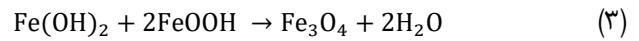
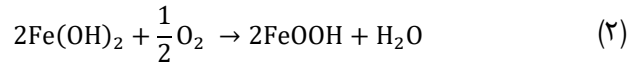
سازوکار تشکیل نانوذره‌های مغناطیسی Fe_3O_4 و نانوکامپوزیت مغناطیسی Ag/Fe_3O_4 تایید سنتز نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 با آنالیزهایی مانند نقشه عنصری (EDX) و پراش پرتو ایکس (XRD) و همچنین تأثیر

(۱) Peg lid

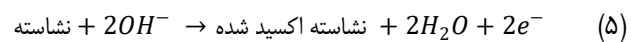
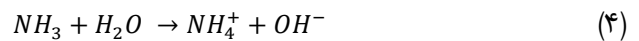
و استافیلوکوکوس اورئوس در حضور غلظت‌های گوناگون نانوذره‌های نقره، آهن اکسید و نانوکامپوزیت Ag/Fe₃O₄ به ترتیب در شکل های ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده‌اند.

علیرغم اینکه در برخی پژوهش‌ها گزارش شده که نانوذره - های Fe₃O₄ پوشش داده شده با مواد آلی مانند کیتوسان [۲۵]، اولئیک اسید [۲۶] و گروه‌های کربوکسیل [۴۹] از فعالیت ضدباکتریایی محسوس بر خوردار هستند، ولی در این پژوهش، نانوذره‌های Fe₃O₄ تولید شده با نشاسته حتی در بالاترین غلظت (۲۲ میلی گرم بر لیتر) تأثیر محسوس بر منحنی رشد هیچکدام از باکتری‌های مورد آزمایش نداشت. در مقابل، مقدار MIC نانوذره‌های نقره در مقابل باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۲/۷، ۱۱ و ۱۱ میلی گرم بر لیتر بدست آمد (شکل‌های ۴ تا ۴). مقدار MIC نانوذره‌های نقره موجود در نانوکامپوزیت در برابر باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۰/۵، ۴ و ۸ میلی گرم بر لیتر بود (شکل ۲-۴). باتوجه به نتیجه‌های منتشر شده توسط تیم پژوهشی ما [۴]، اندازه نانوذره‌های نقره تولید شده با نشاسته به تهنائی کوچک تر از نقره موجود در نانوکامپوزیت است، درحالی که فعالیت ضدباکتریایی نانوکامپوزیت علیه باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با نانوذره‌های نقره منفرد بیش تر است. بنابراین با در نظر گرفتن منحنی‌های رشد باکتری‌ها در حضور نانوذره‌های Fe₃O₄ می‌توان نتیجه گرفت که حضور همزمان نانوذره‌های نقره و آهن اکسید در نانوکامپوزیت Ag/Fe₃O₄ دارای اثرات هم‌افزایی بر ممانعت از رشد باکتری‌های گرم منفی است. این نتیجه‌ها همانند نتیجه‌های به‌دست آمده از پژوهش‌های Prucek است [۹].

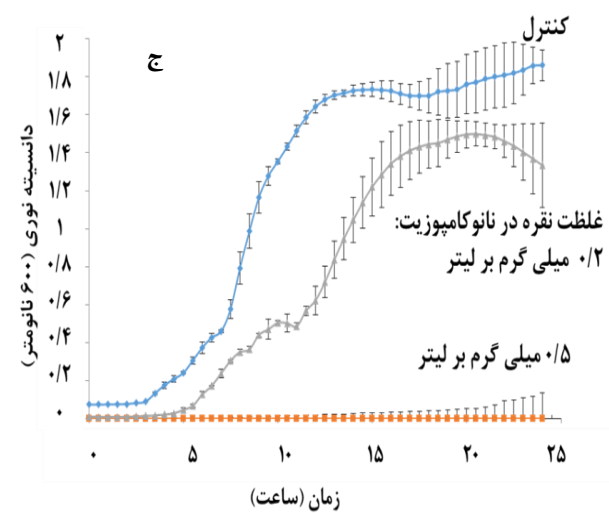
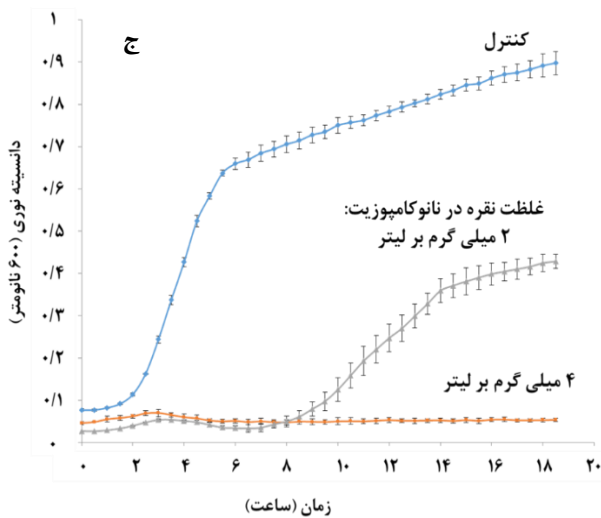
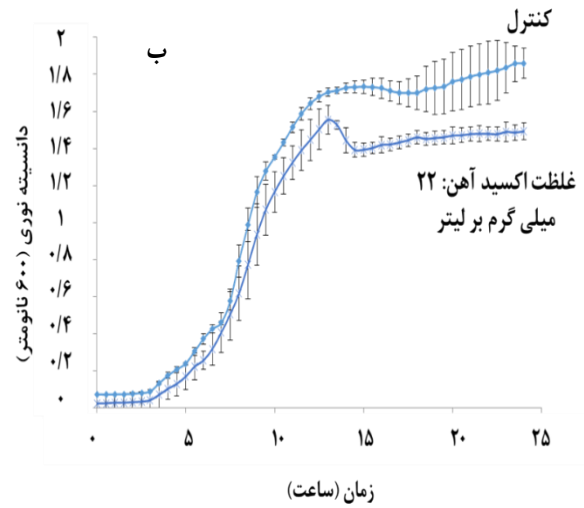
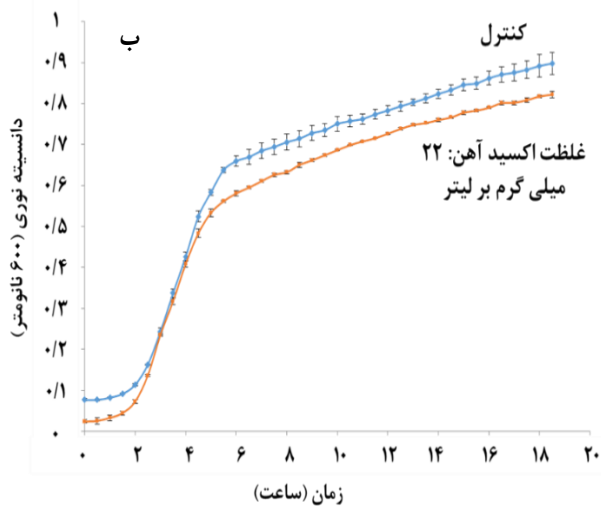
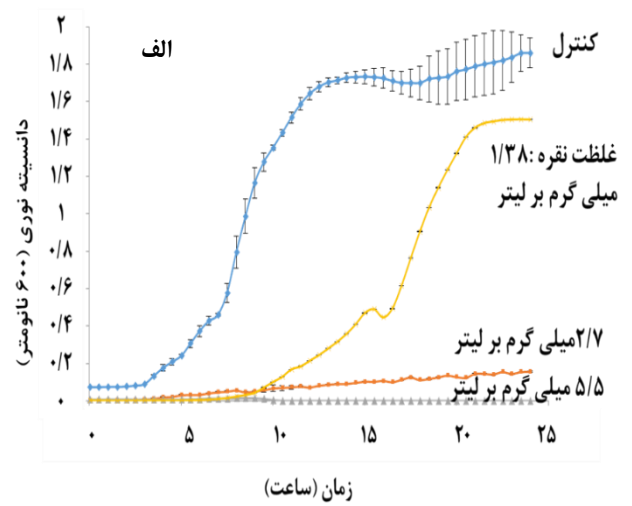
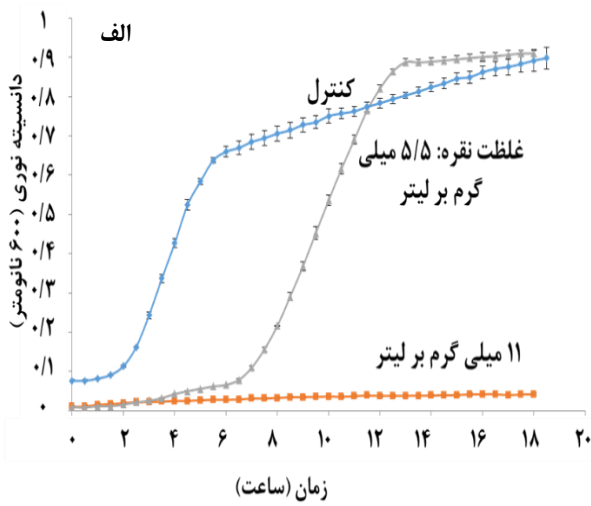
با توجه به نتیجه‌های به‌دست‌آمده از شکل‌های ۲ تا ۴، نانوذره‌های نقره و نانوکامپوزیت در غلظت‌های کمتر از MIC باعث افزایش فاز تأخیری و کاهش غلظت نهایی سلول‌های باکتریایی شدند. نانوذره‌های نقره با نصف غلظت MIC باعث تأخیر رشد باکتری‌های گرم منفی تا ۵ ساعت شد. همچنین این غلظت از نانوذره‌های نقره، ۱۶ ساعت رشد باکتری گرم مثبت را به تأخیر انداخت. حضور نانوکامپوزیت با نصف مقدار MIC در محیط رشد باکتری نیز باعث افزایش فاز تأخیری منحنی رشد اشرشیاکلی (۸ ساعت) و استافیلوکوکوس اورئوس (۵ ساعت) شد.



نشاسته با ایجاد ممانعت فضایی از رشد نانوذره‌های Fe₃O₄ جلوگیری کرده و به عنوان پایدار کننده عمل می‌کند. از سوی دیگر گروه‌های هیدروکسیل نشاسته با یون‌های آهن واکنش داده و افزون بر آمونیاک، نقش کاهندگی آنها را نیز بازی می‌کند. در مرحله دوم یون‌های نقره به نانوذره‌های آهن اکسید پوشیده شده با نشاسته افزوده می‌شود. در این مرحله آمونیاک می‌تواند در دو واکنش (۱) تشکیل کمپلکس پایدار با یون‌های نقره [Ag(NH₃)₂]⁺ و [Ag(NH₃)]⁺ (۲) اکسایش نشاسته در محلول، درگیر شود. اکسایش نشاسته، یون نقره را به اتم نقره کاهش می‌دهد. کمپلکس اتم‌های نقره با یون‌های نقره باعث تشکیل (Ag)_n⁺ می‌شود (واکنش‌های (۴) تا (۸)). گروه‌های هیدروکسیل نشاسته هم به عنوان دهنده الکترون عمل کرده و هم عامل پوشش‌دهنده مناسب برای فلزهای نجیب به شمار می‌روند. بار سطحی روی نانوذره‌های نقره (Ag⁺)_n، جفت یونی با گروه‌های هیدروکسیل نشاسته اطراف نانوذره‌های Fe₃O₄ تشکیل می‌دهد. از سوی دیگر کمپلکس آمونیاک می‌تواند به عنوان مخزن یون‌های نقره برای رشد نانوذره‌های نقره استفاده شود [۱۹-۲۴].

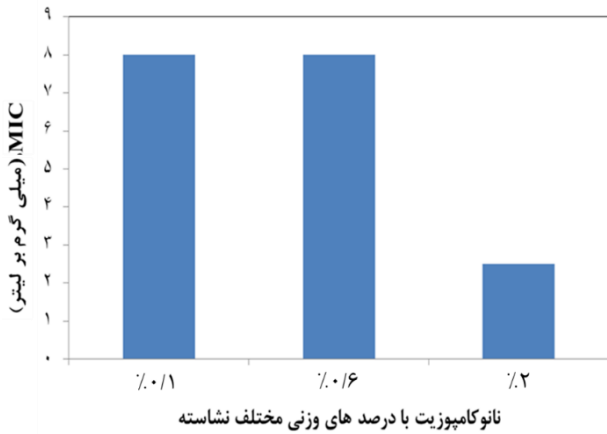


مقایسه فعالیت ضدباکتریایی نانوذره‌های نقره، آهن اکسید و نانوکامپوزیت Ag/Fe₃O₄
منحنی‌های رشد باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی



شکل ۳ منحنی رشد اثرشیشیایی در مجاورت الف) نانوذره‌های نقره (ب) نانوذره‌های Fe_3O_4 (ج) نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 . داده‌ها برابر میانگین \pm انحراف معیار سه آزمایش مستقل است.

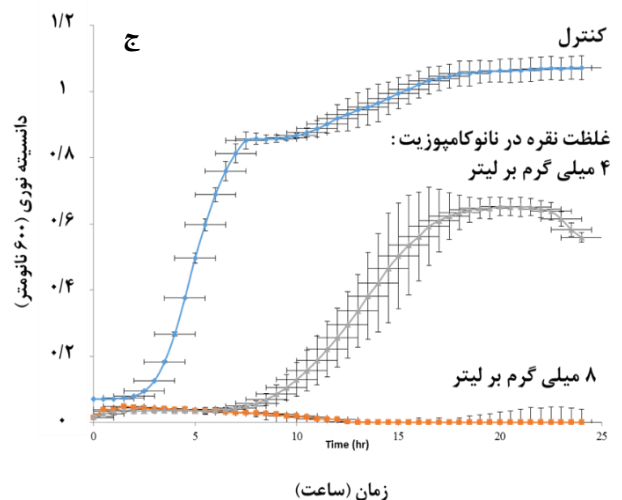
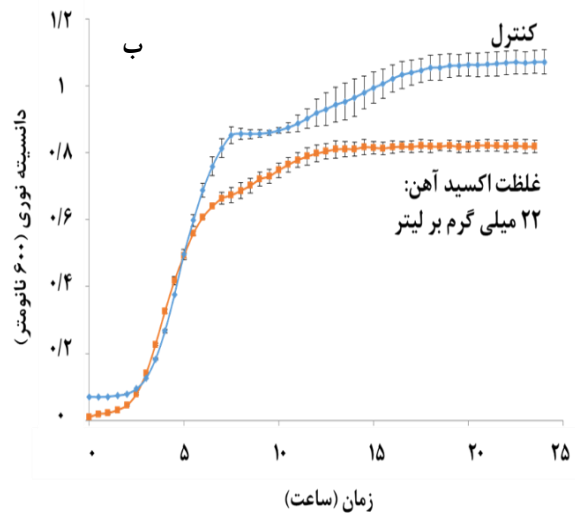
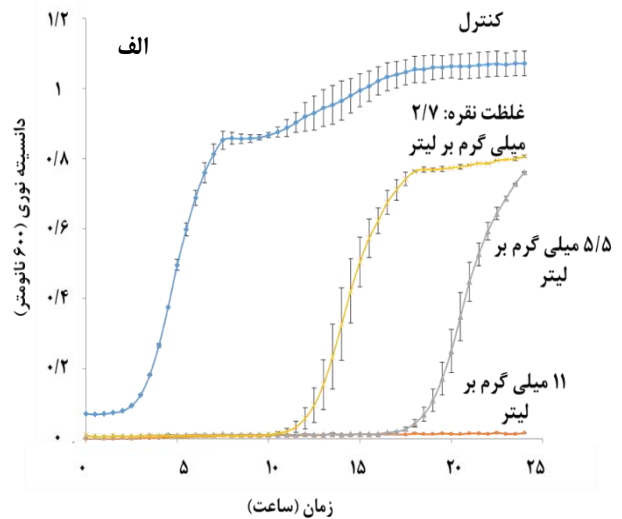
شکل ۲ منحنی رشد سودومونارائروژینیوزا در مجاورت الف) نانوذره‌های نقره (ب) نانوذره‌های Fe_3O_4 (ج) نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 . داده‌ها برابر میانگین \pm انحراف معیار سه آزمایش مستقل است.



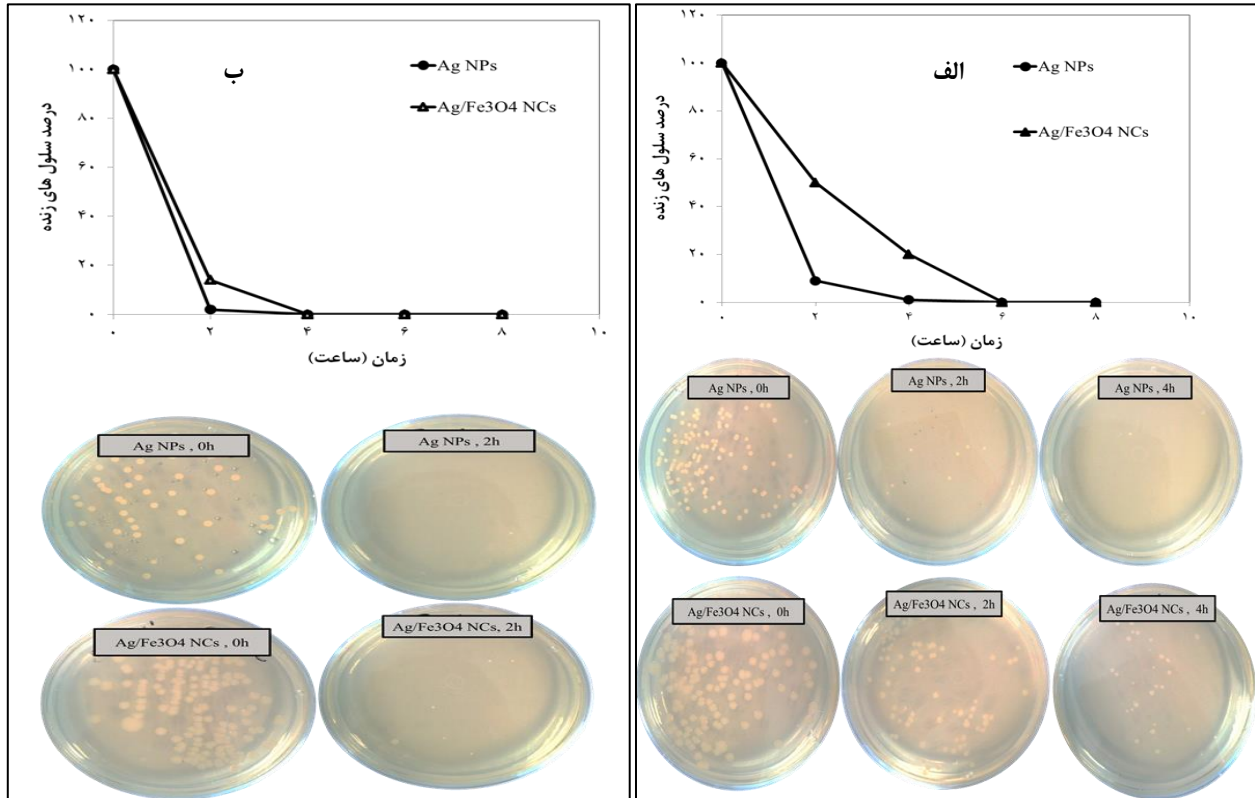
شکل ۵ MIC نانوکامپوزیت تولید شده با درصد های گوناگون نشاسته علیه استافیلوکوکوس اورئوس

عامل پوشش دهنده نانوذره های نقره می تواند بر فعالیت ضدباکتریایی آن ها اثر گذار باشد. از یک سو عامل پوشش دهنده می تواند باعث کند شدن نرخ تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) شود، از سوی دیگر این عامل می تواند باعث پیشگیری از توده ای شدن نانوذره ها و افزایش نسبت سطح به حجم شود که این امر به افزایش تولید ROS منجر می شود [۲۷]. در این پژوهش برای بررسی اثر نشاسته بر فعالیت ضدباکتریایی نانوکامپوزیت، MIC نمونه های نانوکامپوزیتی تهیه شده با ۱٪، ۰.۱۶٪ و ۲٪ علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تعیین شد (شکل ۵). نانوکامپوزیت تهیه شده با نشاسته ۲٪ وزنی بیشترین فعالیت ضدباکتریایی را در مقابل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد. این امر می تواند به دلیل ذره های یکنواخت تر و توده ای نشدن این نانوکامپوزیت باشد که باعث افزایش نسبت سطح به حجم و پس از آن افزایش فعالیت ضدباکتریایی شد. بنابراین فعالیت ضدباکتریایی نانوکامپوزیت به مقدار نشاسته به عنوان عامل پایدارکننده و عامل متصل کننده نانوذره های نقره و آهن اکسید وابسته است. در همه نمونه ها مقدار MIC با MBC برابر بود.

نانوکامپوزیت تولید شده در این پژوهش در مقایسه با پژوهش های پیشین از فعالیت ضدباکتریایی بیش تری برخوردار است [۷، ۹، ۱۰]. Markova و همکاران تولید سبز نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 را با کیتوسان گزارش داده است [۷]. در این پژوهش، یون های نقره با استفاده از کیتوسان و در حضور نانوذره های مغناطیسی استخراج شده از باکتری به نانوذره های نقره کاهش یافت. MIC این نانوکامپوزیت به نوع باکتری وابسته بود و کمترین آن، ۷ میلی گرم بر لیتر بود. Prucek و همکاران در سال ۲۰۱۱ میلادی نانوکامپوزیت $Ag@Fe_2O_3$ و $Ag@Fe_3O_4$ را با پلی اکریلیک اسید به عنوان



شکل ۴ منحنی رشد استافیلوکوکوس اورئوس در مجاورت (الف) نانوذره های نقره (ب) نانوذره های Fe_3O_4 (ج) نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 . داده ها برابر میانگین \pm انحراف معیار سه آزمایش مستقل است.



شکل ۶ فعالیت ضدباکتریایی وابسته به زمان نانوذره های نقره و نانو کامپوزیت علیه الف) اشریشیا کلی ب) استافیلوکوکوس اورئوس

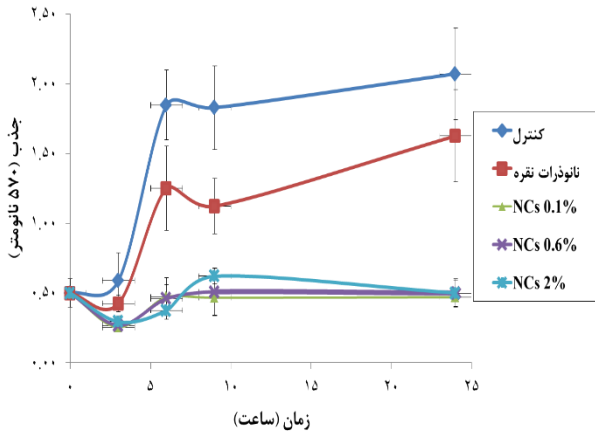
فعالیت ضد فیلم زیستی نانوذره های نقره و نانو کامپوزیت: مدل برون تی دو بعدی

در این پژوهش برای ارزیابی فعالیت ضد فیلم زیستی نانوذره های نقره و نانو کامپوزیت تولید شده با ۰/۶٪ وزنی نشاسته (NCs-0.6%)، غلظت MBEC آنها علیه فیلم زیستی های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس مقاوم به پنیسیلین و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین (MRSA) تعیین شد (شکل ۸). مقدار MBEC نانو کامپوزیت تهیه شده با نشاسته ۰/۶٪ وزنی علیه این باکتری های آزمایش شده، ۳۰ میلی گرم بر لیتر است. بنابراین MBEC نانو کامپوزیت علیه استافیلوکوکوس اورئوس به تقریب ۴ برابر مقدار MIC آن است. فعالیت ضد فیلم زیستی نانوذره های نقره علیه استافیلوکوکوس اورئوس و MRSA (MBEC: ۸۰ میلی گرم بر لیتر) از NCs-0.6% بیش تر است. ولی فیلم زیستی سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به پنیسیلین در برابر نانوذره های نقره (MBEC: ۱۲۰ میلی گرم بر لیتر) مقاومت نشان دادند.

فعالیت ضد فیلم زیستی ای نانوذره های نقره به غلظت، اندازه و سن فیلم زیستی وابسته است [۲۸، ۲۹]. فیلم زیستی بالغ حساسیت کمتری به نانوذره های نقره دارد و فعالیت ضد فیلم زیستی نانوذره های نقره با اندازه کوچک تر، بیش تر است [۶]. فیلم زیستی با پلیمرهای خودساخته خارج سلولی

واسط نقره و آهن اکسید و مالتوز به عنوان عامل کاهنده تولید کردند [۹]. کمترین MIC این نانو کامپوزیت ۱۵/۶ میلی گرم بر لیتر بود. Dallas و همکاران تولید نانو کامپوزیت Ag/Fe3O4 را با فسفوتیرازین به عنوان شبکه و کاهنده نقره و آهن اکسید گزارش دادند [۱۰]. کمترین MIC این نانو کامپوزیت ۸۰ میلی گرم بر لیتر بود. در موارد اشاره شده، مقدارهای MIC نانو کامپوزیت بیش تر از نانو کامپوزیت تولید شده در این پژوهش است.

زمان مرگ باکتری های اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس در مجاورت نانوذره های نقره و نانو کامپوزیت با روش شمارش کلنی های تشکیل شده، مورد ارزیابی قرار گرفت. باکتری های اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس در تماس با نانوذره های نقره با غلظت MIC به ترتیب پس از ۴ و ۲ ساعت به طور کامل از بین رفتند (شکل ۶ الف). زمان مرگ باکتری ها در تماس با نانو کامپوزیت با غلظت معادل MIC به ترتیب ۶ و ۴ ساعت است (شکل ۶ ب). مرگ زودتر باکتری های در تماس با نانوذره های نقره می تواند به دلیل رهایش تندتر یون های نقره از نانوذره های نقره در مقایسه با نانو کامپوزیت باشد. برای بررسی بیشتر برهمکنش نانو کامپوزیت با سطح باکتری از آنالیز SEM استفاده شد. در مقایسه با نمونه کنترل (شکل ۷ الف)، اتصال نانو کامپوزیت با سطح استافیلوکوکوس اورئوس به وضوح مشخص است (شکل ۷ ب).



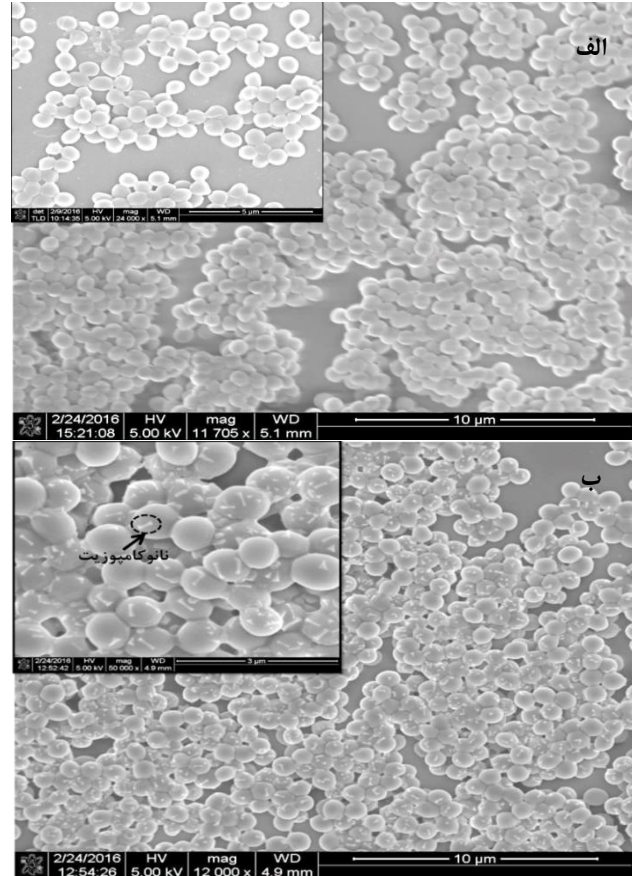
شکل ۹ جرم فیلم زیستی استافیلوکوکوس اورئوس در تماس با نانوذره‌های نقره و نانوکامپوزیت‌های تولید شده با درصد‌های گوناگون نشاسته. همه داده‌ها مقدار میانگین \pm انحراف معیار از سه آزمایش مستقل هستند.

نانوذره‌های مغناطیسی پوشش داده شده با نقره قادر به پیشگیری از تشکیل فیلم زیستی MRSA است و کاملاً با سلول‌های انسانی سازگاری دارد [۱۱]. Durmus و همکاران گزارش دادند که ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانوذره‌های آهن اکسید متصل به نقره منجر به تخریب فیلم زیستی MRSA شد [۳۰]. در هر دو پژوهش اعمال میدان مغناطیسی باعث بهبود فعالیت ضد فیلم زیستی نانوساختار شد.

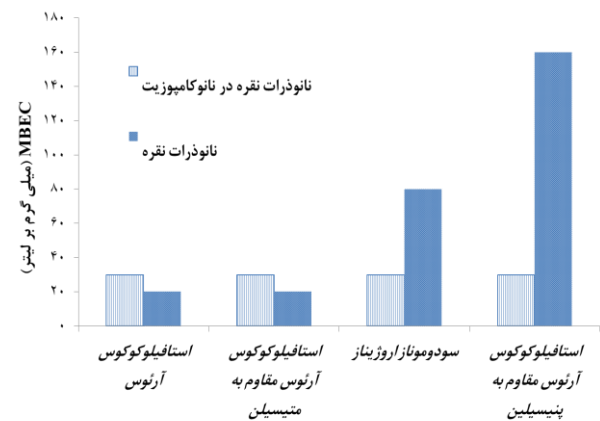
برای ارزیابی قابلیت نانوذره‌های نقره و نانوکامپوزیت در کاهش جرم فیلم زیستی استافیلوکوکوس اورئوس از رنگ آمیزی بلور ویوله استفاده شد. نانوذره‌های نقره و نقره موجود در نانوکامپوزیت در غلظت‌های تقریباً یکسان (۱۵ میلی‌گرم بر لیتر) ارزیابی شدند. آزمایش بلور ویوله نشان داد که جرم فیلم زیستی در تماس با نانوذره‌های نقره به‌طور محسوسی افزایش یافت، درحالی‌که جرم فیلم زیستی در تماس با نانوکامپوزیت بعد از ۲۴ ساعت گرمادهی ثابت باقی ماند. نانوکامپوزیت‌های تولید شده با غلظت‌های گوناگون نشاسته به‌تقریب تأثیر یکسانی بر جرم فیلم زیستی داشتند (شکل ۹).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 با روش ساده و ارزان و با استفاده از نشاسته تولید شد. نشاسته در این فرایند نقش پایدارکننده و واسط بین نانوذره‌های نقره و آهن اکسید را بازی کرد. همچنین این زیست پلیمر در محیط قلیایی با تولید الکترون‌های آزاد تا حدودی نقش کاهندگی یون‌های آهن و نقره را نیز بازی کرد. ساختار این نانوکامپوزیت به صورت توده میله‌ای شکل از نانوذره‌های آهن اکسید است که نانوذره‌های نقره به صورت منفرد به آن‌ها متصل شده است.



شکل ۷ تصویر SEM سلول استافیلوکوکوس اورئوس (الف) کنترل (ب) در تماس با نانوکامپوزیت



شکل ۸ MBEC نانوذره‌های نقره و نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 تهیه شده با ۶٪ وزنی نشاسته علیه فیلم زیستی‌های استافیلوکوکوس آرتوس، سودوموناز آروژیناز، استافیلوکوکوس آرتوس مقاوم به پنیسیلین و استافیلوکوکوس آرتوس مقاوم به متیسیلین

حمایت می‌شود و به همین دلیل، نفوذ نانوذره‌های نقره در فیلم زیستی کم است. محمودی و همکاران در پژوهشی نشان دادند که ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر

بررسی ویژگی ضد فیلم زیستی نانوذره‌های نقره و نانوکامپوزیت نشان داد MBEC این دو نانو ساختار به تقریب ۴ برابر MIC آن‌ها است. فعالیت ضد فیلم زیستی نانوذره‌های نقره در برخی از گونه‌های باکتریایی بیش تر از نانوکامپوزیت بوده و در برخی دیگر، مقاومت باکتری علیه نانوذره‌های نقره دیده شد. فعالیت ضد فیلم زیستی نانوکامپوزیت برای همه گونه‌های باکتریایی به تقریب یکسان بود. افزایش مقدار نشاسته در تولید نانوکامپوزیت باعث افزایش فعالیت ضد فیلم زیستی آن شد. اعمال میدان مغناطیسی باعث کاهش غلظت MBEC نانوکامپوزیت شد. به طوری که نانوکامپوزیت تحت اعمال میدان مغناطیسی در مقایسه با نانوذره‌های نقره دارای اثر هم افزایی فعالیت ضد فیلم زیستی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* است.

بررسی ویژگی ضد باکتریایی این نانوکامپوزیت نشان داد که ترکیب آهن اکسید و نانوذره‌های نقره دارای اثر هم افزایی بر ویژگی ضد باکتریایی نانوذره‌های نقره در مقابل باکتری‌های گرم منفی است. نانوذره‌های آهن اکسید تولید شده با نشاسته تأثیر محسوسی بر رشد باکتری نداشت و فقط باعث کاهش غلظت پایانی سلول‌های باکتریایی شد. نانوذره‌های نقره و نانوکامپوزیت در نصف غلظت MIC باعث افزایش فاز تأخیری و کاهش غلظت نهایی باکتری‌های گرم مثبت و منفی شدند. مقدار نشاسته به عنوان پایدار کننده و واسط نقره و آهن اکسید از پارامترهای مهم تأثیرگذار بر ویژگی ضد باکتریایی نانوذره‌های نقره است. فعالیت ضد باکتریایی نانوکامپوزیت با افزایش مقدار نشاسته، بیشتر شد. این امر به دلیل کاهش توده‌ای شدن نانوذره‌های و افزایش یکنواختی اندازه آن‌ها است. طبق پژوهش‌های پیشین و آنالیز SEM می‌توان گفت یکی از سازوکارهای اصلی فعالیت ضد باکتریایی نانوکامپوزیت Ag/Fe_3O_4 برهمکنش مستقیم آن با سلول است.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۷

مراجع

- [1] Ghaseminezhad S.M., Hamed S., Shojaosadati S.A., [Green Synthesis of Silver Nanoparticles by a Novel Method: Comparative Study of Their Properties](#), *Carbohydrate polymers*, **89(2)**: 467-472 (2012).
- [۲] معادی ت، قهرمان زاده ر، یوسفی م، محمدی ف، تهیه نانوذره‌های نقره توسط عصاره چهار گونه گیاهی و بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی آن، شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۴): ۳۳ تا ۹ (۱۳۹۳).
- [۳] کویبی ی، امانی ح، کریمی نژاد ح، بررسی خاصیت ضد باکتریایی نانوذره‌های نقره در پلی استایرن‌های انبساطی دیرسوز و استاندارد، شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۴): ۳۵ تا ۱۶۱ (۱۳۹۵).
- [4] Ghaseminezhad S.M., Shojaosadati, S.A., Meyer, R.L., [Ag/Fe₃O₄ Nanocomposites Penetrate and Eradicate S. Aureus Biofilm in an in Vitro Chronic Wound Model](#). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **163**: 192-200 (2018).
- [5] Qin, H., Cao, H., Zhao, Y., Zhu, Ch., Cheng, T., Wang, Q., Peng, X., Cheng, M., Wang, J., Jin, G., Jiang, Y., Zhang, X., Liu, X., Chu, P. K., [In Vitro and in Vivo Anti-Biofilm Effects of Silver Nanoparticles Immobilized on Titanium](#). *Biomaterials*. **35(33)**: 9114-9125 (2014).
- [6] Cong, Y., Xia, T., Zou, M., Li, Zh., Peng, Bo., Guo, D., Deng, Z., [Mussel-Inspired Polydopamine Coating as a Versatile Platform for Synthesizing Polystyrene/Ag Nanocomposite Particles with Enhanced Antibacterial Activities](#). *Journal of Materials Chemistry B*. **2(22)**: 3450-3461 (2014).
- [7] Markova, Z., Siskova, K., Filip, J., Safarova, K., Pucek, R., Panacek, A., Kolarb, M., Zboril, R., [Chitosan-Based Synthesis of Magnetically-Driven Nanocomposites with Biogenic Magnetite Core, Controlled Silver Size, and High Antimicrobial Activity](#). *Green Chemistry*. **14(9)**: 2550-2558 (2012).

- [8] Chudasama, B., Vala, A. K., Andhariya, N., Upadhyay, R. V., Mehta, R. V., [Enhanced Antibacterial Activity of Bifunctional Fe₃O₄-Ag Core-Shell Nanostructures](#). *Nano Research*. **2(12)**: 955-965 (2009).
- [9] Pucek, R., Tuček, J., Kilianová, M., Panáček, A., Kvítek, L., Filip, J., Kolář, M., Tománková, K., Zbořil, R., [The Targeted Antibacterial and Antifungal Properties of Magnetic Nanocomposite of Iron Oxide and Silver Nanoparticles](#). *Biomaterials*. **32(21)**: 4704-4713 (2011).
- [10] Dallas, P., Tucek, J., Jancik, D., Kolar, M., Panacek, A., Zboril, R., [Magnetically Controllable Silver Nanocomposite with Multifunctional Phosphotriazine Matrix and High Antimicrobial Activity](#). *Advanced Functional Materials*. **20(14)**: 2347-2354 (2010).
- [11] Mahmoudi, M., Serpooshan, V., [Silver-Coated Engineered Magnetic Nanoparticles Are Promising for the Success in the Fight against Antibacterial Resistance Threat](#). *ACS Nano*. **6(3)**: 2656-2664 (2012).
- [12] Ghaseminezhad, S.M., Shojaosadati, S.A., [Evaluation of the Antibacterial Activity of Ag/Fe₃O₄ Nanocomposites Synthesized Using Starch](#). *Carbohydrate polymers*. **144**: 454-463 (2016).
- [13] Lazić, D. V., Mihajlovski, D. K., Mraković, D. A., Illés, D. E., Stoiljković, D. M., Ahrenkiel, P. S. P., Nedeljković, J. M., [Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Supported by Magnetite](#). *ChemistrySelect*. **4(14)**: 4018-4024 (2019).
- [14] Taufiq, A., Saputro, R. E., Susanto, H., Hidayat, N., Sunaryono, S., Amrillah, T., Wijaya, H. W., Mufti, N., Simanjuntak, F. M., [Synthesis of Fe₃O₄/Ag Nanohybrid Ferrofluids and Their Applications as Antimicrobial and Antifibrotic Agents](#). *Heliyon*. **6(12)**: e05813 (2020).
- [15] T.N.L. Nguyen, T.V. Do, T.V. Nguyen, P.H. Dao, A.H. Nguyen, D.A. Dinh, T.A. Nguyen, T.K. A. Vo, T.L. Le, [Antimicrobial Activity of Acrylic Polyurethane/ Fe₃O₄-Ag Nanocomposite Coating](#). *Progress in Organic Coatings*. **132**: 15-20 (2019).
- [16] Chang, P.R., Yu, J., Ma, X., Anderson, D.P., [Polysaccharides as Stabilizers for the Synthesis of Magnetic Nanoparticles](#). *Carbohydrate polymers*. **83(2)**: 640-644 (2011).
- [17] Hwang, I.S., Hwang, J.H., Choi, H., Kim, K.J., Lee, D.G., [Synergistic Effects between Silver Nanoparticles and Antibiotics and the Mechanisms Involved](#). *Journal of Medical Microbiology*. **61(12)**: 1719-1726 (2012).
- [18] Amarjargal A., Tijing L. D., Im I.-T., Kim C.S., [Simultaneous Preparation of Ag/ Fe₃O₄ Core-Shell Nanocomposites with Enhanced Magnetic Moment and Strong Antibacterial and Catalytic Properties](#). *Chemical Engineering Journal*. **226**: 243-254 (2013).
- [19] Khan, Z., Singh, T., Hussain, J.I., Obaid, A.Y., Al-Thabaiti, S.A., El-Mossalamy, E.H., [Starch-Directed Green Synthesis, Characterization and Morphology of Silver Nanoparticles](#). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **102**: 578-584 (2013).
- [20] Lu, W., Shen, Y., Xie, A., Zhang, W., [Preparation and Protein Immobilization of Magnetic Dialdehyde Starch Nanoparticles](#). *The Journal of Physical Chemistry B*. **117(14)**: 3720-3725 (2013).

- [21] Uthumporn, U. , Shariffa, Y. N. , Fazilah, A., Karim, A. A. , [Effects of Naoh Treatment of Cereal Starch Granules on the Extent of Granular Starch Hydrolysis. *Colloid and Polymer Science.* **290\(15\)**: 1481-1491 \(2012\).](#)
- [22] Valencia, G.A., Vercik, L.C.O., Ferrari, R., Vercik, A., [Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Water-Soluble Starch and Its Antibacterial Activity on Staphylococcus Aureus. *Starch-Stärke.* **65\(11-12\)**: 931-937 \(2013\).](#)
- [23] Xia, B. , Cui, Q., He, F., Li - Langmuir, L., [Preparation of Hybrid Hydrogel Containing Ag Nanoparticles by a Green *in Situ* Reduction Method. *Langmuir.* **28\(30\)**: 11188-11194 \(2012\).](#)
- [24] Zhang, G., Shen, X., Yang, Y., [Facile Synthesis of Monodisperse Porous ZnO Spheres by a Soluble Starch-Assisted Method and Their Photocatalytic Activity. *The Journal of Physical Chemistry C.* **115\(15\)**: 7145-7152 \(2011\).](#)
- [25] Arakha M., Pal S., Samantarrai D., Panigrahi T.K., Mallick B.C., Pramanik K., Mallick B., Jha S., [Antimicrobial Activity of Iron Oxide Nanoparticle Upon Modulation of Nanoparticle-Bacteria Interface. *Scientific Reports.* **5**: \(2015\).](#)
- [26] Velusamy P., Chia-Hung S., Shritama A., Kumar G.V., Jeyanthi V., Pandian K., [Synthesis of Oleic Acid Coated Iron Oxide Nanoparticles and Its Role in Anti-Biofilm Activity against Clinical Isolates of Bacterial Pathogens. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers,* **59**: 450-456 \(2015\).](#)
- [27] Jain, N., Bhargava, A., Rathi, M., Dilip, R.V., Panwar, J., [Removal of Protein Capping Enhances the Antibacterial Efficiency of Biosynthesized Silver Nanoparticles. *PLoS One.* **10\(7\)**: e0134337 \(2015\).](#)
- [28] Wirth, S.M., Lowry, G.V., Tilton, R.D., [Natural Organic Matter Alters Biofilm Tolerance to Silver Nanoparticles and Dissolved Silver. *Environmental Science & Technology.* **46\(22\)**: 12687-12696 \(2012\).](#)
- [29] Yang, Y. Alvarez, P.J., [Sublethal Concentrations of Silver Nanoparticles Stimulate Biofilm Development. *Environmental Science & Technology Letters.* **2\(8\)**: 221-226 \(2015\).](#)
- [30] Durmus N.G. Webster T.J., [Eradicating Antibiotic-Resistant Biofilms with Silver-Conjugated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Advanced Healthcare Materials.* **2\(1\)**: 165-171 \(2013\).](#)