

رضا کاظم پورا^۱، امیر میرزایی^{۲*}

^۱گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
^۲گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نانوذرات مس سنتز شده توسط عصاره گیاه درمنه (*Artemisia scoparia*) علیه سویه‌های مقاوم به چند دارو کلبسیلا پنومونیه و آنالیز تغییرات بیان ژن بیوفیلیم

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۸/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: کلبسیلا پنومونیه یکی از مهمترین پاتوژن‌های فرصت طلب بیمارستانی است که به دلیل تشکیل بیوفیلیم به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم شده است. هدف از این مطالعه، سنتز نانوذرات مس با استفاده از عصاره گیاه درمنه، بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی آن علیه سویه‌های کلبسیلا پنومونیه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی از بیمارستان‌های مختلف شهر تهران جمع‌آوری شد. با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های بالینی جدا سازی شد. سنتز نانوذرات مس با استفاده از عصاره گیاه درمنه انجام گردید و خصوصیات آن توسط روش‌های میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و بلورنگاری پرتوی ایکس (XRD) بررسی گردید. اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نانوذرات مس و میزان تاثیر آن بر روی بیان ژن بیوفیلیم *mrkA* در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه توسط روش Real-Time PCR بررسی شد.

یافته‌ها: تعداد ۲۰ سویه کلبسیلا پنومونیه از میان ۱۰۰ نمونه بالینی جدا سازی شد. نتایج SEM، TEM و XRD نشان داد که نانوذرات مس سنتز شده دارای شکل ظاهری کروی و اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر داشتند. نانوذرات مس دارای اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی معناداری بودند و می‌توانند میزان بیان ژن بیوفیلیم *mrkA* را به طور معناداری کاهش بدهد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات مس سنتز شده دارای اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی معناداری بوده و بنابراین می‌توان از این نانوذره به عنوان کاندید دارویی در مطالعات آینده استفاده نمود.

کلمات کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، نانوذرات مس، اثرات ضد میکروبی، ضد بیوفیلمی، بیان ژن بیوفیلیم

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

Email: Amir_mirzaie92@yahoo.com,
Amir.mirzaie@piau.ac.ir

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یک باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه بوده که در سطوح مخاطی بدن انسان و دستگاه گوارش یافت می‌شود و در افراد دارای نقص سیستم ایمنی و بستری در بیمارستان در صورت ورود به جریان خون و ورود به بافت‌های دیگر می‌تواند عفونت ایجاد کند.^۱ اخیراً این باکتری در بیمارستان‌ها و مخصوصاً در بخش اطفال می‌تواند عفونت‌های جدی، سپتی سمی و مننژیت در نوزادان و در افراد دارای نقص سیستم ایمنی ایجاد کند.^۲ یکی از فاکتورهای ویروالانس این باکتری جهت عفونت زایی و تشدید بیماری، فرار از سیستم ایمنی و مقاوم شدن به بسیاری از آنتی بیوتیک‌های رایج درمانی می‌باشد.^۳ تشکیل بیوفیلم یکی از مکانیسم‌های رایج این باکتری جهت فرار از سیستم ایمنی و مقاوم شدن به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد.^۴ مطالعات نشان می‌دهد که سویه‌های کلبسیلا پنومونیه می‌توانند با تشکیل ماتریکس پلیمری خارج سلولی به هم متصل شده و ساختارهای توده‌ای به نام بیوفیلم را تشکیل دهند.^۵ این ساختارهای بیوفیلمی متشکل از پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها و DNA می‌باشد.^۶ سویه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم می‌توانند به سطوح مختلف مانند سوندهای ادراری متصل شده و منجر به ایجاد عفونت‌های تهاجمی بشوند.^۷ یکی از فاکتورهای مهم باکتری در تشکیل بیوفیلم فیمبریه تیپ ۳ (MrkA) می‌باشد. این نوع فیمبریه توسط ژن mrkA کد می‌شود که اتصال پایدار باکتری به سطوح را میانجی‌گری می‌کند و بنابراین باکتری‌های مستقر در ساختار بیوفیلم می‌توانند با استفاده از فرایندهای کوروم سنسینگ به سیگنال برسازند و میزان بیان ژنهای بیوفیلمی را افزایش دهند.^۸ یکی از راهکارهای موثر بر از بین بردن بیوفیلم ناشی از این باکتری استفاده از نانوذرات، بخصوص نانوذرات فلزی می‌باشد.^۹ اخیراً نانوذرات مس به دلیل خواص منحصر به فرد اپتیکی، دمایی، شیمیایی و خواص بیولوژیکی مورد توجه محققان قرار گرفته است.^{۱۰} یکی از خصوصیات ویژه نانوذرات مس، خواص ضد میکروبی آن می‌باشد و در مطالعات اخیر از این نوع نانوذره برای مبارزه با مقاومت دارویی در باکتری‌ها استفاده شده است.^{۱۱} بطور کلی روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی جهت سنتز نانوذرات مس وجود دارد.^{۱۲} روش‌های فیزیکی و شیمیایی به دلیل گران قیمت بودن، بازدهی تولید کم و آلودگی محیط زیست

کمتر توسط محققان مورد استفاده قرار می‌گیرند.^{۱۳} برای غلبه بر این مشکل، امروزه استفاده از روش سنتز سبز با استفاده از عصاره گیاهان مورد توجه محققین قرار گرفته است.^{۱۴} در این روش، از عصاره گیاهان به دلیل وجود ترکیبات ثانویه و فعال به عنوان یک عامل احیاکننده جهت سنتز نانوذرات مس استفاده می‌کنند که این روش دارای بازدهی تولید بالا، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه و دوستدار محیط زیست می‌باشد.^{۱۵} تاکنون مطالعات مختلفی جهت سنتز نانوذرات مس از عصاره گیاهان به انجام رسیده است. Qamar و همکارانش در سال ۲۰۲۰ نانوذرات مس را با استفاده از عصاره گیاه کارلا (*Momordica charantia*) سنتز نموده و اثرات ضد میکروبی آن را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات مس سنتز شده دارای اثرات ضد میکروبی معناداری علیه سویه‌های باکتریایی مقاوم به دارو هستند.^{۱۶} به دلیل اثرات ضد میکروبی نانوذرات مس، هدف از مطالعه ما؛ سنتز نانوذرات مس با استفاده از عصاره گیاه درمنه (*Artemisia scoparia*)، بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی آن علیه سویه‌های کلبسیلا پنومونیه بود. گیاه درمنه با نام علمی *Artemisia scoparia* جنسی از گیاهان تیره کاسنیان و خانواده آستراسه می‌باشد که دارای خواص درمانی مانند اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی می‌باشد.^{۱۷}

مواد و روش‌ها

مواد

نمک نترات مس (CuNO_3) از شرکت سیگما-آلدریج، محیط‌های کشت میکروبی شامل نوترینت آگار، نوترینت براث و دیسک‌های آنتی بیوتیکی از شرکت‌های مدیا (HiMedia, India) خریداری شد. مواد مولکولی شامل کیت استخراج DNA، استخراج RNA و سنتز cdna از شرکت بیوبسیک اسپانیا (Biobasic Spain) خریداری شد.

جداسازی و شناسایی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه

در این مطالعه آزمایشگاهی که از آذرماه تا خردادماه ۱۴۰۰ در دانشگاه آزاد اسلامی به انجام رسیده است، تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی شامل خون، ادرار، زخم، مایع مغزی-نخاعی از بیمارستان‌های مختلف شهر تهران شامل بیمارستان پارس و امام خمینی جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه میکروبی شناسی منتقل شدند. جداسازی سویه

را جدا کرده و سپس رسوب تیره رنگ بدست آمده برای شستشو، با اضافه کردن آب مقطر سه بار تقطیر، سانتریفیوژ شد. در نهایت رسوب نانوذرات مس بدست آمده در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد خشک شد.^{۲۰}

دستگاه های بررسی ویژگی های نانوذرات

میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

به منظور بررسی ریخت شناسی و تایید اندازه نانوذرات مس، یک قطره از نمونه سوسپانسیونی ذرات بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شد و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره (Leo 906) (TEM مدل KV ۱۰۰ Zeiss)، ساخت کشور آلمان با ولتاژ شتاب دهنده ۱۲۰KV تصویر برداری شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

ساختار و اندازه نانوذرات مس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و مطالعه نقطه به نقطه، جهت بررسی اندازه و مورفولوژی نانوذرات پس از پوشش دهی با مس در ولتاژ زیر KV ۳۰ و تحت فشار خلاء (10-5 Torr) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل XL30 شرکت فیلیپس ساخت کشور ژاپن مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بلورنگاری پرتوی ایکس (XRD)

به منظور تعیین ساختار کریستالوگرافی نانوذرات نقره از آزمون اشعه ایکس توسط دستگاه XRD با تشعشع لامپ (Olympus)/CuKa، ژاپن در دما ۰ تا ۱۱۰ درجه استفاده شد.

بررسی اثرات ضد میکروبی

به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات مس از روش میکرودايلوشن در پلیت های ۹۶ خانه ای بر طبق استاندارد CLSI استفاده شد. به این منظور ابتدا سویه های کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده مقاوم به دارو در محیط کشت TSB به مدت ۲۴ ساعت کشت

های کلبسیلا پنومونیه توسط روش های میکروب شناسی شامل کشت بر روی محیط کشت EMB agar، مک کانکی آگار کشت داده شدند و پس از تهیه لام میکروسکوپی و رنگ آمیزی گرم، از تست های بیوشیمیایی با استفاده از محیط های کشت SIM (Sulfide, MR (Methyl, TSI (Triple Sugar Iron Agar), Indole, Motility) Red و VP (Voges-Proskauer) برای تایید شناسایی سویه های کلبسیلا پنومونیه استفاده شد.^{۱۸}

پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی

به منظور بررسی پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های کلبسیلا پنومونیه، از روش انتشار دیسک کربی بائر بر اساس استاندارد CLSI استفاده شد.^{۱۹} دیسک های آنتی بیوتیکی مورد استفاده شامل سیپروفلوکساسین (CP, 5 µg)، سفنازیدیم (CAZ, 30 µg)، آمیکاسین (AMI, 30 µg)، تتراسایکلین (TET, 30 µg)، نالیدیکسیک اسید (NA, 30 µg)، مروپنم (MER, 10 µg) بود.

عصاره گیری و سنتز سبز نانوذرات مس

در این مطالعه گیاه درمنه (*Artemisia scoparia*) از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران با شماره هرباریومی ۱۳۶۸ تهیه شد و توسط گیاه شناس مورد تایید قرار گرفت. ابتدا گیاه در شرایط دور از نور و سایه خشک شده و توسط دستگاه آسیاب برقی کاملاً پودر گردید. به دنبال آن، میزان ۱۰ گرم از پودر خشک گیاه به ۵۰ میلی لیتر آب اضافه گردید و عصاره گیری آبی توسط روش ماسراسیون انجام گرفت و در نهایت عصاره تهیه شده توسط کاغذ صافی (واتمن، آلمان) صاف گردید. به دنبال آن جهت سنتز سبز نانوذرات مس، مقدار ۲۰۰ میلی لیتر محلول (۰/۰۱ M) نیترات مس تهیه گردید و میزان ۸ میلی لیتر از محلول عصاره آبی گیاه درمنه به محلول نیترات مس اضافه شد، واکنش در دمای اتاق انجام و تغییر رنگ حاصل گردید. سپس محلول تیره رنگ حاوی نانوذرات مس، به مدت ۵ ساعت روی شیکر، در دمای اتاق قرار گرفت. سپس بعد از گذشت این زمان، محلول تیره رنگ حاوی نانوذرات مس را درون لوله های فالکون ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی محلول که حاوی ترکیبات عصاره می باشد

داده شدند. سپس غلظت‌های مختلف از نانوذرات شامل ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد. به دنبال آن، ۹۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون براث (MHB) و ۵ میکرولیتر از کشت میکروبی و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نانوذرات مس در داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ای اضافه گردید. بعد از انکوباسیون در مدت زمان ۲۴ ساعت، میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) تعیین شد. در واقع، مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری در نظر گرفته شد.^{۲۱}

بررسی اثرات ضد بیوفیلمی

برای ارزیابی اثرات ضد بیوفیلمی نانوذرات مس سنتز شده از روش میکرو تیتروپلیت با استفاده از کریستال ویوله (CV) در پلیت های ۹۶ خانه ای انجام شد. سویه های کلبسیلا پنومونیه در پلیت های ۹۶ خانه ای به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. به دنبال آن، تمامی چاهک‌ها سه بار با سرم فیزیولوژی (PBS) شستشو داده شدند تا سویه هایی متصل نشده از کف چاهک‌ها شسته شوند. سویه های کلبسیلا پنومونیه سپس با مقادیر زیرحد مهارکنندگی (*Sub-MIC*) نانوذرات مس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سستی گراد تیمار شدند. سپس کلیه چاهک‌ها مجدداً با PBS سه بار شسته و به مدت ۱۵ دقیقه با متانول ثابت شدند. پلیت های ۹۶ خانه ای به مدت ۳۰ دقیقه در هوا خشک شد و به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۱ درصد CV اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شستشو با آب مقطر، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از اسید استیک ۲۳٪ به هر چاهک اضافه شد و میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر انجام شد. مقادیر میانگین جذب هر نمونه محاسبه و با میانگین مقادیر کنترل مقایسه شد. نمونه کنترل در این تست، سویه‌های تیمار نشده با نانوذرات مس بودند.^{۲۲}

بررسی میزان بیان ژن بیوفیلیم *mrkA*

ابتدا سویه‌های کلبسیلا پنومونیه با غلظت زیرحد مهارکنندگی (*SubMIC*) نانوذرات مس تیمار شدند و به دنبال آن، استخراج RNA از سویه های تیمار شده با نانوذره با استفاده از کیت استخراج RNA

(بیویسیک، اسپانیا) بر طبق دستورالعمل انجام گرفت. در ادامه، سنتز cDNA با استفاده از کیت Quanti Tect Reverse Transcription kit (بیویسیک، اسپانیا) انجام گرفت. به منظور بررسی بیان ژن بیوفیلیم *mrkA* از روش Real Time PCR کمی-Quantitative Real-Time-PCR (PCR (qRT-PCR) استفاده شد. مواد مورد استفاده در حجم ۲۰ میکرولیتر مسترمیکس شامل ۱ میکرولیتر از cDNA، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس حاوی سایر گرین بود که در دستگاه Bioneer کره انجام گرفت برنامه دمایی مورد استفاده در qPCR شامل ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد ۱۵ ثانیه، ۱ دقیقه دمای ۶۰ درجه سانتی گراد بود که در ۴۰ سیکل انجام شد. هم چنین ژن 16S rRNA به عنوان ژن خانه دار (کنترل داخلی) مورد استفاده قرار گرفت. در انتها بیان نسبی ژن *mrkA* توسط روش $\Delta\Delta C_t$ محاسبه گردید. توالی پرایمرهای رفت و برگشت (Forward and reverse) ژن هدف *mrkA* به صورت 5'-ACGTCTCTAACTGCCAGGC-3' رفت، و 5'-TAGCCCTGTTGTTTGTCTGGT-3' برگشت، بود. توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن مرجع 16S rRNA به صورت 5'-CGTCTGCCCTATCAACTTTCG-3' رفت و 5'-CGTTTCTCAGGCTCCCTCT-3' برگشت است.^{۲۳}

آنالیز آماری

تمامی تست های این مطالعه به صورت ۳ بار تکرار انجام گرفت و نتایج توسط نرم افزار آماری GraphPad Prism با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل گردید و $p < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جداسازی و پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه

از میان ۱۰۰ نمونه بالینی با استفاده از روش‌های میکروب شناسی تعداد ۲۰ نمونه کلبسیلا پنومونیه جداسازی و شناسایی گردید. نتایج تست بررسی پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد که از میان ۲۰ سویه، ۱۲ سویه مقاوم به چند آنتی بیوتیک (*MDR: Multidrug-*)

TEM نشان داد که نانوذرات مس سنتز شده دارای ساختار کروی و دارای اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر بودند (شکل A۲ و B۲). هم چنین نتایج طیف سنجی *XRD* به منظور اثبات نانوکریستال های فلزی مس، انجام شد. بر اساس نتایج، نانوذرات کریستالی مس در سطوح ۱۱۱، ۲۰۰ و ۲۲۰ به ترتیب پیک‌هایی با مقادیر ۳۵/۷۶، ۴۴/۶۸، ۶۴/۳۷ را نشان داد (شکل C۲).

بررسی اثرات ضد میکروبی

در این مطالعه، به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذره مس از روش میکرودايلوشن به منظور تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (*MIC*) استفاده شد. در این، روش سویه‌های باکتریایی تحت غلظت-های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نانوذرات مس در کمترین غلظت ۶/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر و بیشترین غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بر روی ایزوله‌ها تاثیر گذار بودند (جدول ۲).

resistant بودند (جدول ۱). هم چنین از میان سویه‌های *MDR*، بیشترین مقاومت آنتی بیوتیکی به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین (۶۶٪) و کمترین میزان مقاومت به مروپنم (۱۶٪) مشاهده شد.

عصاره گیری و سنتز سبز نانوذرات مس

پودر خشک شده گیاه درمنه به مدت ۲۴ ساعت در حلال آب مخلوط شد و پس از عصاره گیری، عصاره حاصله توسط کاغذ واتمن فیلتر گردید. واکنش احیای محلول نیترات مس در دمای اتاق بعد از اضافه کردن عصاره به محلول نیترات مس صورت گرفت و تغییر رنگ حاصل گردید که این تغییر رنگ نشان دهنده ساخت نانوذرات مس بود (شکل ۱).

بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات مس سنتز شده

به منظور بررسی شکل ظاهری و اندازه نانوذرات مس سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی *TEM* و *SEM* استفاده شد. نتایج *SEM* و



B



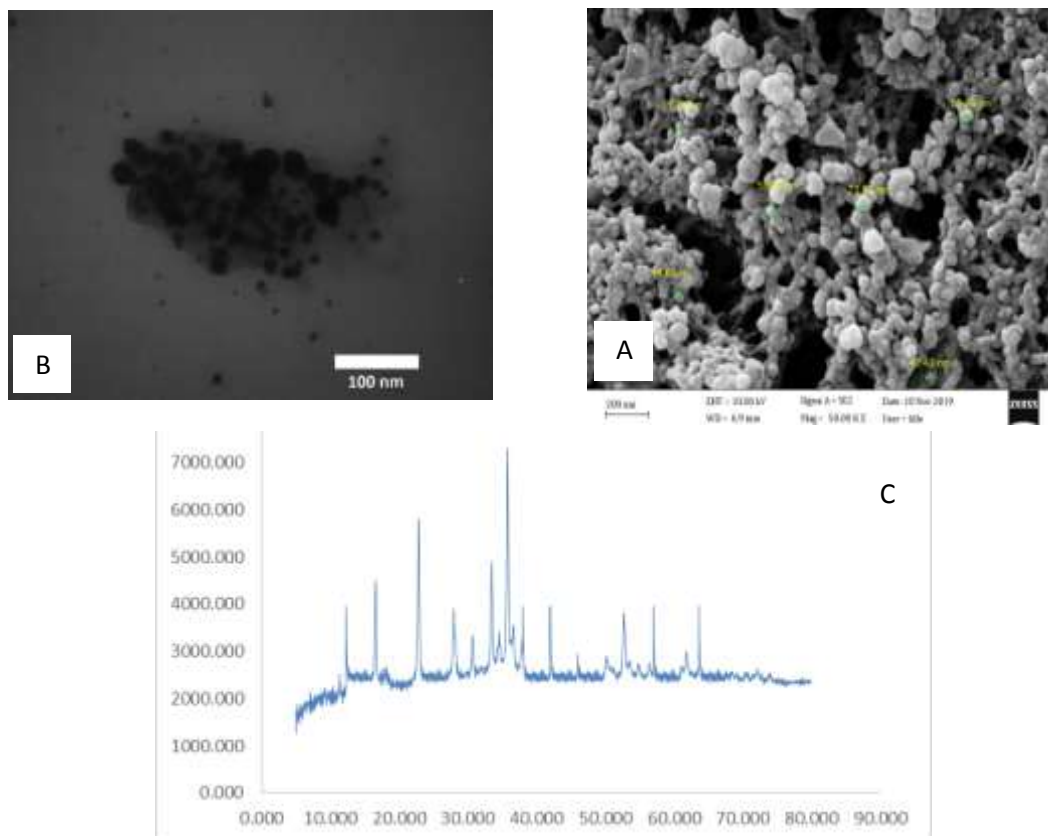
A

شکل ۱: محلول نیترات مس (A)، تغییر رنگ نیترات مس پس از افزودن عصاره گذشت مدت زمان ۵ ساعت (B) که نشان دهنده سنتز نانوذرات مس می باشد.

جدول ۱: پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه.

MDR	الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی	شماره سویه
+	CP, MER, AMI	۱۸، ۸
+	CP, CAZ, TET	۵۹، ۴۸، ۵
+	CP, AMI, TET	۳۷، ۲۹، ۱۳
+	NA, AMI, CAZ	۴۵، ۲۲، ۱۱، ۲

CP: Ciprofloxacin, MER: Meropenem, AMI: Amikacin, CAZ: Ceftazidim, TET: Tetracycline, NA: Nalidixic acid



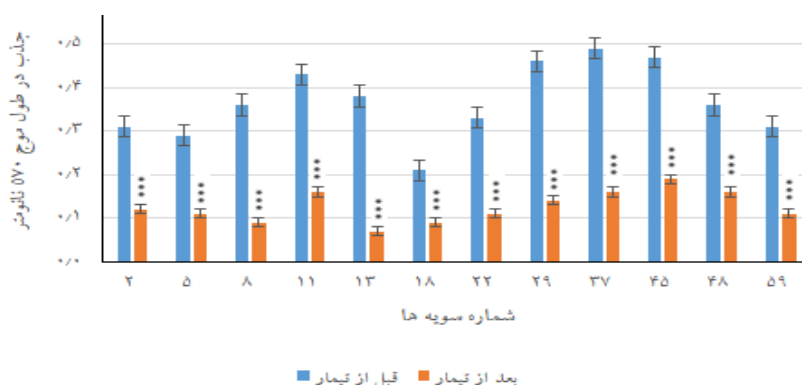
شکل ۲: (A): میکروسکوپ الکترونی روبشی، (B): میکروسکوپ الکترونی گذاره، (C) XRD. نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات مس کروی شکل و دارای اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر می‌باشند.

جدول ۲: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات مس

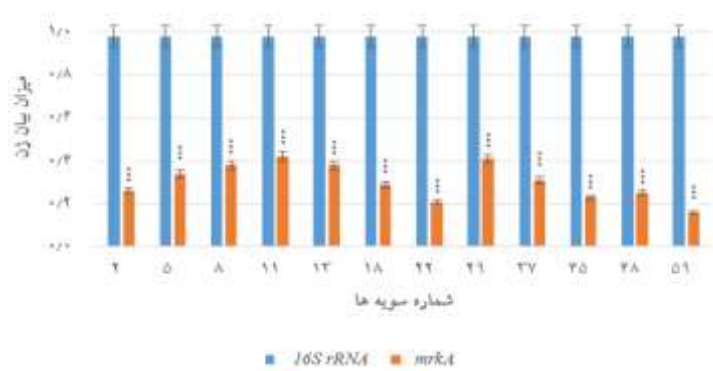
غلظت MIC (میکروگرم در میلی لیتر)	شماره سویه
۶/۲۵	۲، ۲۹، ۴۸
۵۰	۳۷، ۴۵، ۸
۱۰۰	۵، ۱۱
۲۵	۱۳، ۲۲، ۵۹، ۱۸

بررسی اثرات ضدبیوفیلمی

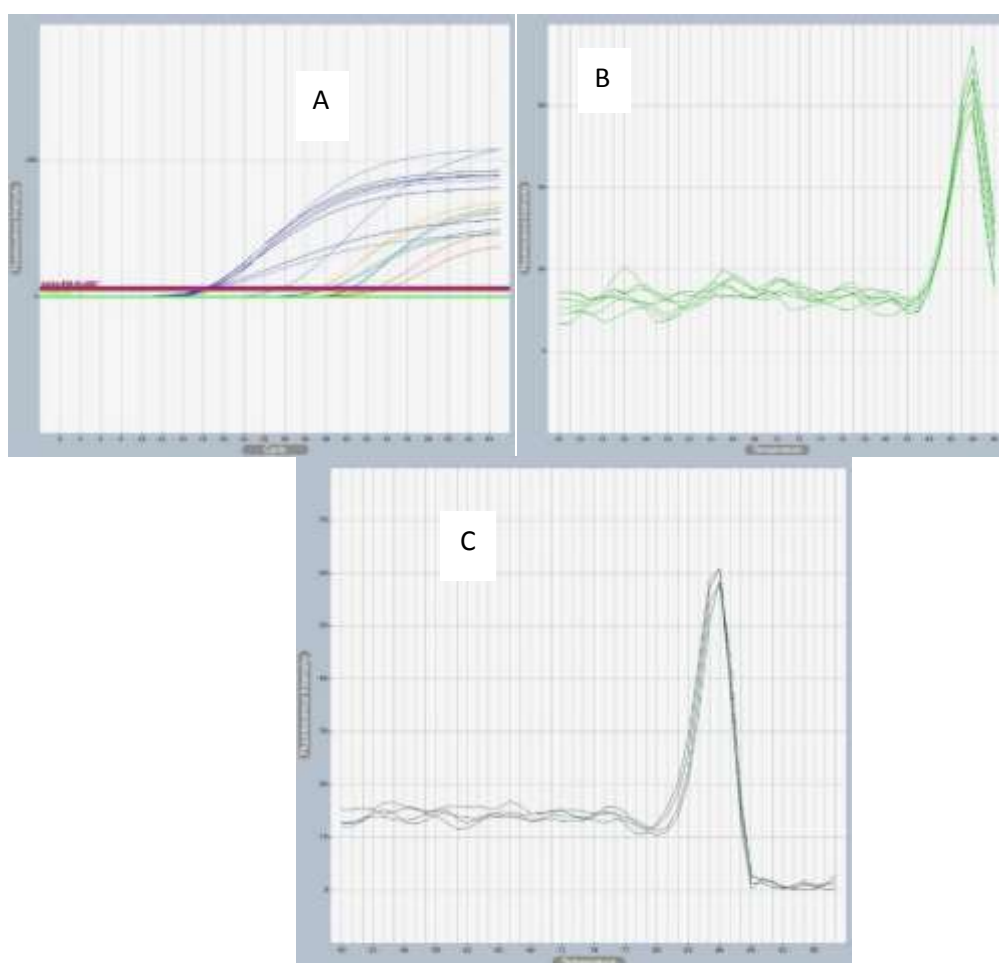
به منظور بررسی اثرات ضدبیوفیلمی نانوذرات مس از روش میکروتیتراپلیت استفاده شد بطوری که سویه‌ها تحت غلظت زیرحدهارکنندگی تیمار شدند. نتایج نشان داد که پس از تیمار سویه‌های کلبسیلا پنومونیه با نانوذرات مس میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر نسبت به گروه کنترل (قبل از تیمار) به شدت کاهش یافته و ارتباط معناداری بین کاهش جذب نوری بین سویه‌های تیمار شده با نانوذرات مس و نمونه های کنترل وجود داشت ($p < 0.05$) که نشان دهنده اثرات ضدبیوفیلمی معناداری می‌باشد (نمودار ۱).



نمودار ۱: بررسی اثرات ضدبیوفیلمی نانوذرات مس سنتز شده بر روی سویه های کلبسیلا پنومونیه. همانطور که مشاهده می‌شود میزان جذب نوری سویه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر پس از تیمار با نانوذرات مس بطور معناداری کاهش پیدا کرده است که نشان دهنده اثرات ضدبیوفیلمی می‌باشد (***) ($P < 0.001$; $n=3$).



نمودار ۲: میزان تغییرات بیان ژن بیوفیلمی *mrkA* در مقایسه با ژن کنترل (*16S rRNA*). همانطور که مشاهده می‌شود میزان بیان ژن *mrkA* در مقایسه با ژن کنترل *16S rRNA* به طور معناداری کاهش یافته است (***) ($P < 0.001$; $n=3$).



شکل ۳: (A): نمودار تکثیر ژنهای *mrkA* و *16S rRNA*. (B): آنالیز منحنی ذوب ژن *mrkA* با دمای ذوب ۸۷/۵ درجه سانتی گراد، (C): آنالیز منحنی ذوب ژن *16S rRNA* با دمای ذوب ۸۶ درجه سانتی گراد.

بحث

بطور کلی نانوذرات، بخصوص نانوذرات فلزی مانند نانوذرات مس به دلیل خصوصیات منحصر به فرد کاتالیتیکی و کاربردهای الکتریکی مورد توجه محققان بوده است.^{۲۴} در سالهای اخیر از روش های متعددی مانند روش سنتز سبز با استفاده از عصاره گیاهان جهت سنتز نانوذرات استفاده می کنند که روشی ساده، کم هزینه و سازگار با محیط زیست است.^{۲۵} در این مطالعه از عصاره گیاه درمنه (*Artemisia scoparia*) جهت سنتز نانوذرات مس استفاده شد و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن توسط روش های SEM، TEM و XRD مورد تایید قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوذرات مس

سنتز شده دارای ساختار کروی و دارای اندازه زیر ۱۰۰ نانومتر می باشد. تاکنون مطالعات مختلفی در زمینه سنتز سبز نانوذرات مس توسط عصاره گیاهان به انجام رسیده است. ChandMali و همکارانش در سال ۲۰۲۰ نانوذرات مس را با استفاده از عصاره گیاه *Celastrus paniculatus* سنتز کردند و ساختار آن را با استفاده از SEM و TEM بررسی نمودند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات مس سنتز شده دارای اندازه ای بین ۲ تا ۱۰ نانومتر بودند.^{۲۶} Ananda و Murthy همکارانش در سال ۲۰۲۰ نانوذرات مس را با استفاده از عصاره گیاه *Hagenia abyssinica* سنتز کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که اندازه میانگین نانوذرات سنتز شده ۳۴/۷۶ نانومتر بود.^{۲۷} یکی از اختلافات مطالعه ما با سایر مطالعات، اندازه نانوذرات مس سنتز

مطالعه ما نشان داد که نانوذرات مس سنتز شده دارای اثرات ضد میکروبی بوده، بطوریکه می‌تواند بیان ژن بیوفیلیم *mrkA* را نیز کاهش دهد که به کاهش تولید بیوفیلیم کمک می‌کند. یکی از دلایل کاهش بیان ژن بیوفیلیم ناشی از نانوذرات مس می‌تواند بر همکنش نانوذرات مس با فاکتورهای رونویسی کننده باشد که می‌تواند بیان ژن بیوفیلیم را نیز کاهش دهد.^{۳۵}

Ashajyothi و همکارانش در سال ۲۰۱۶ اثرات ضد بیوفیلیمی نانوذرات مس را علیه سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه*، *اشرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که نانوذرات مس علیه تمامی باکتری‌ها دارای اثرات ضد بیوفیلیمی می‌باشد.^{۳۶} Sriyutha Murthy و همکارانش در سال ۲۰۱۲ اثرات ضد بیوفیلیمی نانوذرات مس را علیه سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سودوموناس پوتیدا* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات مس در غلظت‌های ۰/۰۲ تا ۰/۲۴ میلی گرم در میلی لیتر می‌توانند تولید بیوفیلیم را در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس پوتیدا* کاهش دهد اما سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به این غلظت‌ها مقاوم بودند.^{۳۷} نتایج این مطالعات با نتیجه مطالعه ما از نظر اثرات ضد بیوفیلیمی هم خوانی دارد اما یکی از دلایل میزان اثرات ضد بیوفیلیمی نانوذرات مس می‌تواند سایز آنها نیز باشد. مطالعات نشان می‌دهد که نانوذرات مس دارای اندازه کوچکتر راحت تر می‌توانند به درون ماتریکس بیوفیلیم وارد شوند و موجب مرگ باکتری‌های درون ساختار ماتریکس شده و به آن نسبت هم باعث کاهش تولید بیوفیلیم می‌شوند.^{۳۸}

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات مس سنتز شده توسط عصاره گیاه درمنه آسان، سریع و مقرون صرفه می‌باشد و نانوذرات مس سنتز شده دارای اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی معناداری علیه سویه‌های پاتوژن مقاوم به دارو *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشند. بنابراین می‌توان در آینده از این نانوذره به عنوان کاندید دارو در مطالعات دارویی جهت مطالعات بیشتر استفاده نمود.

شده بود و مطالعات نشان می‌دهد که محتوای ترکیبات ثانویه گیاهی و ترکیبات آنتی اکسیدانی گیاه می‌تواند بر روی سایز نانوذره سنتز شده تاثیر گذار باشد.^{۳۸} در ادامه، اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی نانوذرات مس سنتز شده بر روی ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعه ما نشان داد که نانوذرات مس سنتز شده دارای اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی معناداری می‌باشند. مکانیسم اثرات ضد میکروبی نانوذرات مس تاکنون بطور دقیق گزارش نشده است. اما مطالعات نشان می‌دهد که نانوذرات مس می‌توانند به دیواره سلولی باکتری‌ها متصل شوند و ترکیبات دارای بار منفی دیواره سلولی بر همکنش انجام می‌دهد و باعث نشت و خروج ترکیبات سلول باکتری به خارج از سلول و در نهایت منجر به مرگ سلول‌های باکتریایی می‌شود.^{۳۹} هم چنین مطالعات نشان می‌دهد که نانوذرات مس می‌توانند ساختار مارپیچی DNA را تخریب کرده و منجر به مرگ سلولی شوند.^{۳۰} هم چنین ایجاد رادیکال‌های سمی اکسیژن اکسیداسیون پروتئین‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها نیز از دیگر مکانیسم‌های مرگ باکتری توسط نانوذرات مس می‌باشند.^{۳۱} مطالعات مختلف در زمینه بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات مس به انجام رسیده است. Wu و همکارانش در سال ۲۰۱۹ با استفاده از سنتز سبز نانوذرات مس را سنتز کردند و اثرات ضد میکروبی آن را علیه پاتوژن‌های عامل عفونت مجاری ادراری مانند *کلبسیلا* را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات مس سنتز شده دارای اثرات ضد میکروبی معنادار علیه سویه‌های *کلبسیلا* بودند.^{۳۲} Amaliyah و همکارانش در سال ۲۰۲۰ نانوذرات مس را با استفاده از عصاره گیاه *Piper retrofractum* سنتز کرده و اثرات ضد میکروبی آن را علیه سویه‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات مس در غلظت‌های پایین می‌توانند رشد این دو باکتری پاتوژن را مهار کرده و اثرات ضد میکروبی چشمگیری از خود نشان دادند.^{۳۳} یکی از اختلافات مطالعه ما با سایر مطالعات، تفاوت میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) نانوذرات مس سنتز شده علیه سویه‌های میکروبی مورد مطالعه می‌باشد که یکی از دلایل آن اندازه نانوذرات سنتز شده، نوع روش سنتز و سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه می‌باشد.^{۳۴} در ادامه اثرات ضد بیوفیلیمی نانوذرات مس و هم چنین میزان تاثیر آن بر روی بیان ژن بیوفیلیم *mrkA* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از مطالعه تحقیقاتی است که با کد اخلاق IR.REC.1399.221 انجام شده است. هیچگونه تضاد منافی بین

پژوهشگران در این طرح پژوهشی وجود ندارد. نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند بابت تسهیلات در نظر گرفته شده تشکر و قدردانی میکنند.

References

- Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. Int J Environ Res Public Health 2020;17(17):62-78.
- Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. Antimicrob Agents Chemother 2020;64(10):e01148-20.
- Cano EJ, Cafilisch KM, Bollyky PL, Van Belleghem JD, Patel R, Fackler J, Brownstein MJ, Horne B, Biswas B, Henry M, Malagon F, Lewallen DG, Suh GA. Phage Therapy for Limb-threatening Prosthetic Knee *Klebsiella pneumoniae* Infection: Case Report and In Vitro Characterization of Anti-biofilm Activity. Clin Infect Dis 2020:ciaa705.
- Tang M, Wei X, Wan X, Ding Z, Ding Y, Liu J. The role and relationship with efflux pump of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. Microb Pathog 2020;147:1042-44.
- Di Domenico EG, Cavallo I, Sivori F, Marchesi F, Prignano G, Pimpinelli F, Sperduti I, Pelagalli L, Di Salvo F, Celesti I. Biofilm production by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* significantly increases the risk of death in oncological patients. Front Cell Infect Microbiol 2020;10:561-741.
- Burgos-Garay M, Ganim C, de Man TJB, Davy T, Mathers AJ, Kotay S, Daniels J, Perry KA, Breaker E, Donlan RM. Colonization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a sink-drain model biofilm system. Infect Control Hosp Epidemiol 2021;42(6):722-730.
- Sah SK, Rasool U, Hemalatha S. *Andrographis paniculata* extract inhibit growth, biofilm formation in multidrug resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. J Tradit Complement Med 2019;10(6):599-604.
- Langstraat J, Bohse M, Clegg S. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. Infect Immun 2001;69(9):5805-12.
- Erci F, Cakir-Koc R, Yontem M, Torlak E. Synthesis of biologically active copper oxide nanoparticles as promising novel antibacterial-antibiofilm agents. Prep Biochem Biotechnol 2020;50(6):538-548.
- Simon AT, Dutta D, Chattopadhyay A, Ghosh SS. Copper nanocluster-doped luminescent hydroxyapatite nanoparticles for antibacterial and antibiofilm applications. ACS Omega 2019;4(3):4697-4706.
- Román LE, Gomez ED, Solís JL, Gómez MM. Antibacterial Cotton Fabric Functionalized with Copper Oxide Nanoparticles. Molecules 2020;25(24):5802.
- Thiruvengadam M, Chung IM, Gomathi T, Ansari MA, Gopiesh Khanna V, Babu V, Rajakumar G. Synthesis, characterization and pharmacological potential of green synthesized copper nanoparticles. Bioprocess Biosyst Eng 2019;42(11):1769-1777.
- Din MI, Arshad F, Hussain Z, Mukhtar M. Green adeptness in the synthesis and stabilization of copper nanoparticles: catalytic, antibacterial, cytotoxicity, and antioxidant activities. Nanoscale Res Lett 2017;12(1):638.
- Keabadile OP, Aremu AO, Elugoke SE, Fayemi OE. Green and traditional synthesis of copper oxide nanoparticles-comparative study. Nanomaterials (Basel) 2020;10(12):2502.
- Woźniak-Budych MJ, Przysiecka Ł, Langer K, Peplińska B, Jarek M, Wiesner M, Nowaczyk G, Jurga S. Green synthesis of rifampicin-loaded copper nanoparticles with enhanced antimicrobial activity. J Mater Sci Mater Med 2017;28(3):42.
- Qamar H, Rehman S, Kumar Chauhan D, Tiwari AK, Vikramaditya U. Green Synthesis, Characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanomaterial derived from *Momordica charantia*. Int J Nanomedicine 2020;15:2541-2553.
- Soon L, Ng PQ, Chellian J, Madheswaran T, Panneerselvam J, Gupta G, Nammi S, Hansbro NG, Hsu A, Dureja H. Therapeutic potential of *Artemisia vulgaris*: An insight into underlying immunological mechanisms. J Environ Pathol Toxicol Oncol 2019;38(3):205-216.
- Kazemian H, Heidari H, Ghanavati R, Ghafourian S, Yazdani F, Sadeghifard N, Valadbeigi H, Maleki A, Pakzad I. Phenotypic and genotypic characterization of ESBL-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates. Med Princ Pract 2019;28(6):547-551.
- Hsueh P-R, Ko W-C, Wu J-J, Lu J-J, Wang F-D, Wu H-Y, et al. Consensus statement on the adherence to clinical and laboratory standards institute (CLSI) antimicrobial susceptibility testing guidelines (CLSI-2010 and CLSI-2010-update) for Enterobacteriaceae in clinical

- microbiology laboratories in Taiwan. *J Micro Immun Infect* 2010;43(5): 452-5.
20. Benassai E, Del Bubba M, Ancillotti C, Colzi I, Gonnelli C, Calisi N, Salvatici MC, Casalone E, Ristori S. Green and cost-effective synthesis of copper nanoparticles by extracts of non-edible and waste plant materials from *Vaccinium* species: Characterization and antimicrobial activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;119:111-453.
 21. Mohamed EA. Green synthesis of copper & copper oxide nanoparticles using the extract of seedless dates. *Heliyon* 2020;6(1):e03123.
 22. Cherian T, Ali K, Saquib Q, Faisal M, Wahab R, Musarrat J. *Cymbopogon Citratus* Functionalized Green Synthesis of CuO-Nanoparticles: Novel Prospects as Antibacterial and Antibiofilm Agents. *Biomolecules* 2020;10(2):169.
 23. Mukhopadhyay R, Kazi J, Debnath MC. Synthesis and characterization of copper nanoparticles stabilized with *Quisqualis indica* extract: Evaluation of its cytotoxicity and apoptosis in B16F10 melanoma cells. *Biomed Pharmacother* 2018;97:1373-1385.
 24. Arya A, Gupta K, Chundawat TS, Vaya D. Biogenic synthesis of copper and silver nanoparticles using green alga *Botryococcus braunii* and its antimicrobial activity. *Bioinorg Chem Appl*;2018:787-9403.
 25. Mali SC, Dhaka A, Githala CK, Trivedi R. Green synthesis of copper nanoparticles using *Celastrus paniculatus* willd. leaf extract and their photocatalytic and antifungal properties. *Biotechnol Rep (Amst)* 2020;27:e00518.
 26. ChandMali S, Anita Dhaka, Chanda Kumari, Githala Rohini Trivedi. Green synthesis of copper nanoparticles using *Celastrus paniculatus* Willd. leaf extract and their photocatalytic and antifungal properties. *Biotechnology Reports* 2020. 27: e00518.
 27. Ananda Murthy H. C, Desalegn T, Kassa M, Abebe B, Assefa T. Synthesis of green copper nanoparticles using medicinal plant *Hagenia abyssinica* (Brace) JF. Gmel. leaf extract: antimicrobial properties. *J Nanomaterials* 2020; Article ID 3924081.
 28. Das PE, Abu-Yousef IA, Majdalawieh AF, Narasimhan S, Poltronieri P. Green synthesis of encapsulated copper nanoparticles using a hydroalcoholic extract of *Moringa oleifera* leaves and assessment of their antioxidant and antimicrobial activities. *Molecules* 2020;25(3):555.
 29. Yaqub A, Malkani N, Shabbir A, Ditta SA, Tanvir F, Ali S, Naz M, Kazmi SAR, Ullah R. Novel biosynthesis of copper nanoparticles using *Zingiber* and *Allium* sp. with synergic effect of doxycycline for anticancer and bactericidal activity. *Curr Microbiol* 2020;77(9):2287-2299.
 30. Mohamed AA, Abu-Elghait M, Ahmed NE, Salem SS. Eco-friendly mycogenic synthesis of ZnO and CuO Nanoparticles for in vitro antibacterial, antibiofilm, and antifungal applications. *Biol Trace Elem Res* 2021;199(7):2788-2799.
 31. Rabiee N, Bagherzadeh M, Kiani M, Ghadiri AM, Etessamifar F, Jaberizadeh AH, Shakeri A. Biosynthesis of copper oxide nanoparticles with potential biomedical applications. *Int J Nanomedicine* 2020;15:3983-3999.
 32. Wu S, Rajeshkumar S, Madasamy M, Mahendran V. Green synthesis of copper nanoparticles using *Cissus vitifolia* and its antioxidant and antibacterial activity against urinary tract infection pathogens. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2020; 48(1):1153-1158.
 33. Suci A, Pangesti DP, Masruri M, Sabarudin A, Sumitro SB. Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using *Piper retrofractum* Vahl extract as bioreductor and capping agent. *Heliyon* 2020;6(8):e04636.
 34. Kiriyanthan RM, Sharmili SA, Balaji R, Jayashree S, Mahboob S, Al-Ghanim KA, Al-Misned F, Ahmed Z, Govindarajan M, Vaseeharan B. Photocatalytic, antiproliferative and antimicrobial properties of copper nanoparticles synthesized using *Manilkara zapota* leaf extract: A photodynamic approach. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2020;32:102058.
 35. Naz S, Tabassum S, Freitas Fernandes N, Mujahid M, Zia M, Carcache de Blanco EJ. Anticancer and antibacterial potential of *Rhus punjabensis* and CuO nanoparticles. *Nat Prod Res* 2020;34(5):720-725.

Reza Kazempoor¹, Amir Mirzaie^{2*}

¹ Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

² Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

Evaluation of Antimicrobial and Anti-biofilm Effects of Copper Nanoparticles Synthesized by *Artemisia Scoparia* Extract Against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains and Analysis of Biofilm Gene Expression

Received: 21 Nov 2021 ; Accepted: 1 Mar 2022

Abstract

Background: *Klebsiella pneumoniae* is one of the most important hospital opportunistic pathogens that have become resistant to many antibiotics due to biofilm formation. The aim of this study was to synthesize copper nanoparticles using *Artemisia scoparia* extract, to investigate its antimicrobial and anti-biofilm effects against *K. pneumoniae* strains.

Methods: In this experimental study, 100 clinical samples were collected from different hospitals in Tehran. *K. pneumoniae* strains were isolated from clinical specimens using microbiological methods. Subsequently, the synthesis of copper nanoparticles was performed by green synthesis method using *A. scoparia* extract and its properties were examined by scanning electron microscopy (SEM), transmitting electron microscopy (TEM) and X-ray diffraction (XRD) methods. The antimicrobial and anti-biofilm effects of the synthesized copper nanoparticles were investigated and the effect of copper nanoparticles on the expression of *mrkA* biofilm gene in *K. pneumoniae* strains was investigated by Real Time PCR.

Results: A total of 20 *K. pneumoniae* strains were isolated from 100 clinical specimens. SEM TEM and XRD results showed that the synthesized copper nanoparticles had a spherical shape and a size of less than 100 nm. The results showed that copper nanoparticles had significant antimicrobial and anti-biofilm effects against *K. pneumoniae* strains and copper nanoparticles could significantly reduce the expression of *mrkA* biofilm gene ($p < 0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that the synthesized copper nanoparticles have significant antimicrobial and anti-biofilm effects. Therefore, this nanoparticle can be used as a drug candidate in future studies.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Copper nanoparticles, Antimicrobial effects, Anti-biofilm, Biofilm gene expression

***Corresponding Author:**
Amir Mirzaie, Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran,

Tel: 021-56733001
E-mail: Amir_mirzaie92@yahoo.com,
Amir.mirzaie@piaau.ac.ir