

Investigating the effects of silver nanoparticles synthesized by the green method on the expression of biofilm genes in *Klebsiella pneumoniae* strains

Nastaran Parkan¹

Amir Mirzaei^{2*}

Kambiz Larijani³

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

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

3. Department of Chemistry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding Author*
Amir.mirzaie@piau.ac.ir

Abstract

Introduction: "*Klebsiella pneumoniae*" is an opportunistic human pathogen known for its ability to form biofilms, which contribute to multidrug resistance. This study investigates the green synthesis of silver nanoparticles and their effects on the expression of biofilm-related genes in "*Klebsiella pneumoniae*" strains.

Material and method: In this cross-sectional descriptive study, 60 urine samples were collected and subjected to biochemical verification tests. Ethanolic extract of garlic ("*Allium sativum*") was prepared for the green synthesis of silver nanoparticles. Characterization of the synthesized nanoparticles was performed, and "*Klebsiella pneumoniae*" biofilm formation was assessed by measuring color intensity associated with biofilm presence. The resistance pattern of the bacteria was determined using the disk diffusion method, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of silver nanoparticles against biofilm-forming strains was evaluated using the microdilution method. Multiplex PCR was conducted to identify the genes "mrkD", "sugE", and "luxS", and the expression levels of these genes were analyzed using Real-Time PCR.

Result: Among the 60 samples, 36 were confirmed as "*Klebsiella pneumoniae*", and all strains tested positive for biofilm formation. Most isolates were classified as multidrug resistant (MDR). The synthesized silver nanoparticles exhibited a spherical shape, black color, and an average size of 60 nm. They demonstrated antibacterial activity against all isolates, with MIC values ranging from 6.25 to 100 µg/ml. The highest frequency of the "luxS" gene was found in 30 isolates (83.33%), while "sugE" and "mrkD" were present in 23 isolates each (63.88%). Notably, the expression of "mrkD", "sugE", and "luxS" genes significantly decreased in cells treated with silver nanoparticles compared to the control group.

Conclusion: The study concludes that silver nanoparticles effectively inhibit biofilm formation and antibiotic resistance in "*Klebsiella pneumoniae*" isolates, suggesting their potential utility in managing multidrug-resistant infections in hospitalized patients.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Biofilm, Silver Nanoparticle, Antimicrobial Resistance, Gene Expression

How to cite this article: Mirzaei A, Larijani K, Parkan N. Investigating the effects of silver nanoparticles synthesized by the green method on the expression of biofilm genes in *Klebsiella pneumoniae* strains. Alborz University Medical Journal 2024; 14 (1) : 1-16

بررسی اثرات نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز بر روی بیان ژن های بیوفیلمی در سویه های کلبسیلا پنومونیه

چکیده

نسترن پرکان^۱
امیر میرزایی^{۲*}
کامبیز لاریجانی^۳

مقدمه: کلبسیلا پنومونیه یک پاتوژن فرصت طلب انسانی است. تشکیل بیوفیلیم، یکی از خواص مهم این باکتری است که به ایجاد فنوتیپ‌هایی با مقاومت دارویی چندگانه منجر می‌شود. فناوری نانوذرات یکی از زمینه‌های مهم در طیف گسترده‌ای از مطالعات بوده است. در این مطالعه، سنتز سبز نانوذرات نقره و بررسی اثرات آن بر روی بیان ژن‌های بیوفیلمی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار: در این مطالعه توصیفی - مقطعی تعداد ۶۰ نمونه از موارد ادراری جمع‌آوری و با استفاده از تست‌های تأییدی بیوشیمیایی بررسی شدند. پس از تهیه گیاه سیر از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی، عصاره اتانولی سیر تهیه شد و سنتز نانوذره نقره به روش سنتز سبز انجام شد. مشخصه یابی نانوذره نقره سنتز شده انجام گردید. توانایی تشکیل بیوفیلیم کلبسیلا پنومونیه به کمک سنجش میزان رنگ متصل شده به بیوفیلیم بررسی شد. الگوی مقاومتی کلبسیلا پنومونیه به روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. حداقل غلظت مانع‌کنندگی نانوذره نقره به روش میکرودايلوشن بر روی سویه‌های مولد بیوفیلیم کلبسیلا پنومونیه ارزیابی شد. مالتی‌پلکس PCR جهت شناسایی ژنهای *luxS* و *mrkD*، *sugE* انجام شد. در نتیجه، بیان ژنهای *luxS* و *mrkD*، *sugE* کلبسیلا پنومونیه تیمار شده با نانوذره نقره به روش Real Time PCR بررسی شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه از ۶۰ نمونه جمع‌آوری شده ۳۶ نمونه باکتری کلبسیلا پنومونیه تأیید شد. تمامی سویه‌ها از نظر تست فنوتیپی بیوفیلیم مثبت بودند. اکثر سویه‌ها مقاوم به چند دارو (MDR) بودند. نانوذره نقره سنتز شده دارای ساختار کروی و سیاه‌رنگ و دارای میانگین سایز ۶۰ نانومتر بود. نانوذره نقره بر روی تمامی جدایه‌های مورد مطالعه خاصیت ضدباکتریایی داشت ولی کمترین غلظت MIC برابر با ۶/۲۵ و بیشترین میزان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که بیشترین فراوانی مربوط به ژن *luxS* در ۳۰ جدایه (۸۳/۳۳ درصد) است، همچنین فراوانی ژنهای *sugE* و *mrkD* هر کدام ۲۳ جدایه (۸۸/۶۳ درصد) بود، و تعداد ۲۳ جدایه (۶۸/۸۸ درصد) به طور همزمان دارای هر سه ژن است. بیان ژنهای *luxS* و *mrkD*، *sugE* در سلولهای تیمار شده با نانوذره نقره نسبت به گروه کنترل کاهش قابل توجهی داشت. تشکیل بیوفیلیم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به‌طور مؤثر در واکنش به نانوذرات اکسید نقره مهار شدند. نتایج تحقیق در کنترل عفونت‌های مقاوم در برابر چند دارو (MDR) در بیماران بستری می‌تواند مفید باشد.

کلمات کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، بیوفیلیم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، نانوذره نقره، بیان ژن

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
۳. گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

نویسنده مسئول:

Amir.mirzaie@piaou.ac.ir

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه باکتری گرم منفی، متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است که به عنوان پاتوژن فرصت طلب انسانی باعث عفونت های شدید؛ مانند عفونت دستگاه ادراری، مننژیت، پنومونی و سپتی سمی به ویژه در بیماران بستری می شود (۱). به طور طبیعی نرخ بیماری زایی مرتبط با این باکتری کم است، اما توانایی تشکیل بیوفیلم و تجمع باکتری ها، به بروز مقاومت آن به چندین آنتی بیوتیک منجر می شود که یک عامل مهم بیماری زا برای باکتری تلقی می شود (۲). ژن *mrkA* کدکننده Type ۳ Fimbria Shaft یک پروتئین ساختاری فیمبریه را کد می کند و در شروع اتصال باکتری به کاتتر برای تشکیل بیوفیلم مهم است (۳). حضور این ژن ها در کلبسیلا پنومونیه منجر به تولید عفونت های شدیدتری در بیماران میشود ژن های *sugE* و *treC* با تنظیم پلی ساکارید کپسول که در شکل گیری بیوفیلم ضروری اند، بر تشکیل بیوفیلم اثر می گذارند (۴). ژن *mrkD* پروتئین ساختاری فیمبریه را کد می کند و در شروع اتصال باکتری به کاتتر برای تشکیل بیوفیلم مهم است. ژن های *sugE* و *treC* با تنظیم پلی ساکارید کپسول که در شکل گیری بیوفیلم ضروری اند، بر تشکیل بیوفیلم اثر می گذارند. سلول های باکتریایی با استفاده از مولکول های سیگنالینگ (پیام رسان) شیمیایی که به عنوان کروم سنسینگ شناخته می شوند، با یکدیگر ارتباط برقرار می کنند و در فنوتیپ های باکتریایی مانند تشکیل بیوفیلم اهمیت دارند. ژن *LuxS* یکی از ژن های مهم در فرآیند کروم سنسینگ و تشکیل بیوفیلم است (۵ و ۶).

یکی از محصولات فناوری نانو، نانوذرات نقره است توانایی ارائه نقره از طریق ساختار نانوکریستال به طرز شگرفی ارزش بیولوژیکی و ضد میکروبی آن را بالا میبرد، زیرا نانوذرات نقره سطح تماس بیشتری در مقایسه با ذرات نقره به صورت توده دارد (۷). در روش سنتز سبز یون های فلزی با استفاده از ترکیبات گیاهی معمولاً یک واکنش تک مرحله ای بوده که بدون نیاز به سورفکتانت و سایر عوامل پایدارکننده به نانوذره تبدیل می شوند. مواد و ترکیبات فعال زیستی در عصاره گیاهان از جمله فلاونوئیدها و سایر متابولیت های مؤثر فعال محلول در آب می توانند برای احیا یونهای فلزی به نانوذرات در دمای اتاق مورد استفاده قرار گیرند (۸). برخی از باکتری ها در برابر نقره مقاوم هستند و می توانند نقره را در دیواره سلولی خود تا حدود ۲۵ درصد به عنوان زیست توده از وزن خشک خود جمع کنند و این نشان دهنده استفاده فراوان آنها در بازیافت صنعتی

نقره از مواد سنگی است. مهم ترین مزیت استفاده از عصاره های گیاهی برای سنتز نانوذرات نقره این است که در اکثر موارد به راحتی در دسترس، ایمن و غیرسمی هستند و متابولیت های متنوعی دارند که میتوانند به کاهش یون های نقره کمک کنند و نسبت به میکروب ها، فرایند سنتز را سریع تر پیش میبرند (۹). نانوذرات نقره خارج سلولی در مدت ۱۰ دقیقه سنتز شدند و فعالیت ضدباکتریایی در برابر سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلا، کلبسیلا پنومونیه و انتروکوکوس فکالیز دیده شدند. نانوذرات فلزی مانند نقره می تواند برای هر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی خواص ضدباکتری داشته باشد (۱۰). از معایب روش های شیمیایی که نقش عوامل احیایی و تثبیت کننده را ایفا می کنند، این است که در طبیعت به صورت تجزیه نشده باقی می ماند و در نهایت موجب آلودگی شیمیایی محیط زیست میشوند. اخیراً سنتز زیستی نانوذرات نقره توسط عوامل طبیعی و زیستی؛ مانند گیاهان مورد توجه محققان قرار گرفته است (۱۰) در این مطالعه از گیاه سیر جهت سنتز سبز نانوذرات نقره استفاده شد.

امروزه علاوه بر روش های شیمیایی، روش های زیستی برای تولید نانوذرات فلزی به عنوان روش های سبز غیرسمی توسعه یافته اند (۱۱). یکی از راهکارهای مقابله با تولید بیوفیلم و مقاومت آنتی بیوتیکی، استفاده از علم نانو تکنولوژی میباشد. یکی از نانوذرات مورد استفاده جهت از بین بردن بیوفیلم باکتریایی، نانوذرات نقره میباشد (۱۱). تاکنون مطالعات کمی در زمینه بررسی اثرات ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره به انجام رسیده است.

دانشمندان با استفاده از تقطیر بخار آب بر روی سیر موفق به دستیابی ترکیب دی آلایل دی سولفید همراه با مقادیر کمی دی آلایل تری سولفید و دی آلایل تترا سولفید شدند. سپس تحقیقات نشان داد هر ترکیب به دست آمده دارای خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی است (۱۲). به جز ترکیبات گوگردی که عوامل اصلی خواص سیر هستند، ترکیبات دیگری از قبیل استرولها، فسفاتیدیل کولینها، فسفاتیدیل اتانول آمینها، لینولات اسید، چربیهای اصلی موجود در سیر هستند. از فلزات موجود در سیر میتوان به مس، آلومینیوم، کروم، نقره، نیکل، منگنز و قلع، همچنین از آنزیمهای کاتالاز در سیر وجود دارد که با خواص اکسیدکنندگی از عوامل مؤثر بر روی بسیاری از میکروبها میباشد (۱۳، ۱۲).

نانوذرات با اجزای اصلی سلول های باکتریایی مانند DNA، لیزوزوم ها، ریبوزوم ها و آنزیمها ارتباط برقرار میکنند نمی توانند منجر به استرس اکسیداتیو، تغییرات هتروژنوس، تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی،

شیشه‌ای نگهداری شدند. از پودر تهیه شده برای عصاره‌گیری اتانولی با استفاده از روش ماسراسیون استفاده شد. عصاره به‌دست‌آمده توسط کاغذ صافی (واتمن ۴۲، آلمان) فیلتر شد و عصاره اتانولی حاصل برای آزمایش‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (۱۶).

سنتز نانوذره نقره به روش سنتز سبز: سنتز نانوذرات نقره، با استفاده از روش رسوب‌گذاری با احیای یون‌های نقره توسط عصاره اتانولی گیاه سیر انجام شد. به این صورت که نانوذرات نقره با افزودن ۲ میلی‌لیتر عصاره با غلظت ۰/۰۰۱ mM از نیترات نقره (مرک، آلمان) تحت شرایط دمایی ۶۰ درجه سانتی‌گراد و همزدن سنتز شدند.

احیای کامل یون‌های نقره به نانوذرات نقره با تغییر رنگ محیط مشخص می‌شود جهت مشاهده تغییرات رنگ بروی میزان جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Uv-Vis) (مدل shimadzu UV2550 ساخت ژاپن) در محدوده ۳۰۰-۷۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت مدت یک ساعت از زمان واکنش و تغییر رنگ محلول، سه مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر انجام گرفت. مراحل شستشو با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (Hettich, Germany) انجام شد. در نهایت رسوب نهایی بعد از خشک شدن در شیشه استریل جمع‌آوری شد (۱۶).

مشخصه‌یابی نانوذره نقره سنتز شده: به‌منظور بررسی ریخت‌شناسی و تأیید اندازه نانوذرات نقره، یک قطره از نمونه سوسپانسیونی ذرات نقره بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شد و پس از خشک‌شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) به‌منظور بررسی مورفولوژی نانوذرات نقره استفاده شد. شرایط بهینه برای سنتز نانوذرات نقره در غلظت نیترات نقره ۱ میلی‌مولار، غلظت عصاره ۲۰ گرم/لیتر، pH برابر با ۹ و دمای ۴۵ درجه سانتیگراد است.

مشخصات نانوذرات نقره سنتز شده توسط تکنیک‌های اسپکتروسکوپی فرابنفش/مرئی، مادون‌قرمز، پراش اشعه ایکس، پراکندگی دینامیکی نور (Dynamic Light Scattering) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) بررسی شدند.

آزمون آنالیز پراش پرتو ایکس XRD برای نانوذرات نقره به‌منظور تعیین ساختار کریستالوگرافی نانوذرات با استفاده از دستگاه پراش پرتو ایکس مدل PW ۱۷۳۰، تحت تابش $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 0.15406 \text{ nm}$)، در

اختلالات تعادل الکترولیت‌ها، مهار آنزیم‌ها، غیرفعال‌سازی پروتئین و تغییر در ژنوم شوند (۱۴). تشکیل بیوفیلم را می‌توان با پوشاندن سطوح با نانوذرات مهار کرد این مهار بیوفیلم می‌تواند ناشی از مهار چسبندگی باکتری به سطح یا خاصیت ضدباکتریایی نانوذره یا هر دوی آنها باشد. اثر نانوذرات نقره را روی بیوفیلم باکتریایی تعدادی از باکتری‌های پاتوژن بررسی کردند (۱۵). نتایج نشان داد که نانوذرات نقره باعث مهار بیوفیلم باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، شیگلا فلکسنری، استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پنومونیه می‌شود (۱۵).

اثرات درمانی عصاره گیاه سیر و کاربردهای وسیع نانوذرات نقره در تولیدات دارویی سبب انجام پژوهش حاضر است. هدف از این مطالعه سنتز سبز نانوذرات نقره و بررسی اثرات ضد بیوفیلمی ژن‌های *sug*، *lux* و *mrkA* بر روی ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه است. تولید بیوفیلم و توانایی اتصال به بافت‌های میزبان در کلبسیلا پنومونیه توسط ژن‌های مختلفی مانند *lux*، *mrkA*، *sug* کنترل می‌شوند را مورد ارزیابی قرار گرفت

مواد و روش کار

نمونه‌گیری و ایزولاسیون میکروبی: در این مطالعه توصیفی - مقطعی تعداد ۶۰ نمونه از نمونه‌های مختلف بیولوژیکی در آزمایشگاه شامل ادرار، مدفوع، خلط و زخم از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان آموزشی و درمانی میلاد تهران جمع‌آوری شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه تحقیقی، از نمونه‌های بالینی فوق با استفاده از تست‌های استاندارد میکروب‌شناسی و روش‌هایی مانند رنگ‌آمیزی و کشت و نیز تست‌های بیوشیمیایی در محیط‌های کشت TSI، SIM، MR-VP، سیمون سیترات، اورهاز (شرکت مرک آلمان) باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه جداسازی و تأیید تشخیص گردید.

نگهداری سویه‌های ایزوله شده کلبسیلا پنومونیه: سویه‌های کلبسیلا پنومونیه ایزوله شده در محیط ترپتیک سوی براث (شرکت مرک آلمان) و گلیسرول در ۷۰- درجه سانتیگراد برای انجام تست‌های بعدی مطالعه نگهداری و ذخیره شدند.

تهیه گیاه سیر: گیاه سیر از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی با شماره هرباریومی ۱۳۹۵ تهیه و خریداری شد.

آماده‌سازی عصاره اتانولی سیر: اندام هوایی گیاه ابتدا در جریان هوا قرار داده و سپس در سایه کاملاً خشک شدند و توسط دستگاه آسیاب برقی (IKA M۲۰ Universal, China) کاملاً پودر شده و درون ظرف‌های

به ۳ گروه مقاوم، حساس و نیمه حساس تقسیم بندی شدند. در این پژوهش از شش آنتی بیوتیک (پادتن طب، ایران) سفتازیدیم (۳۰ mg)، سیپروفلوکساسین (۵ mg)، ای میپنم (۱۰ mg)، سفتریاکسون (۳۰ mg)، سفوکسیتین (۳۰ mg)، سفوتاکسیم (۳۰ mg) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ mg) به روش دیفیوژن بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار استفاده شد که تأثیر ضد میکروبی آنتی بیوتیک های فوق به روش دیسک دیفیوژن آگار ارزیابی شد (۱۸).

انجام مالتی پلکس PCR جهت شناسایی ژن های *mrkD*، *sugE* و *luxS*

مالتی پلکس PCR یکی از روش های تغییر یافته واکنش زنجیرهای پلیمرز PCR است که در آن چند جایگاه ژنی مورد بررسی قرار می گیرد و با استفاده از پرایمرهای مختلف می توان چندین جایگاه را مورد بررسی قرار داد و از چندین جفت پرایمر اختصاصی جهت تکثیر استفاده می شود. پس از تأیید باکتری کلبسیلا پنومونیه، نهایتاً تعداد ۳۶ ایزوله مولد بیوفیلم جهت استخراج DNA و انجام PCR جداسازی شد. در این آزمایش از سویه کلبسیلا پنومونیه ATCCV۰۰۶۰۳ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. تکثیر ژن های *mrkD*، *sugE* و *luxS* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) و به روش واکنش زنجیرهای پلیمرز انجام شد. اختصاصی بودن پرایمرها توسط primer-blast به آدرس primer-blast tools/ primer-blasthttp://www.ncbi.nih.gov ارزیابی که ساختار ثانویه پرایمرها توسط نرم افزار oligo analyzer تأیید شد.

آماده کردن محلول نهایی جهت انجام مالتی پلکس PCR

مخلوط نهایی واکنش در ۵۰ میکرولیتر محصول نهایی به شرح زیر است: از DNA استخراج شده با حجم ۳ میکرولیتر و از هر پرایمر رقیق شده با حجم ۱ میکرولیتر استفاده شد. از آنزیم Utaq DNA ۵۰۰ polymerase با حجم ۰/۸ میکرولیتر و برای رقیق کردن از بافر PCR ۱۰x به حجم ۲/۵ میکرولیتر کاربرد دارد. از $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار به حجم ۰/۸ میکرولیتر و محلول dNTP ۱۰mM به اندازه ۱/۵ میکرولیتر که نهایتاً از آب مقطر استریل تزریقی برای رقیق شدن ۶/۴ میکرولیتر بکار رفت.

برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر برای مالتی پلکس PCR برای ژن های *mrkD*، *sugE* و *luxS* مطابق برنامه زیر تنظیم گردید. در پایان، DNA حاصل از تکثیر توسط واکنش PCR، به منظور آنالیز کیفی بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. تکثیر قطعه های مورد نظر در دستگاه

ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی آمپر انجام گرفت. محدوده اسکن ۲۵۰-۸۰۰ درجه قرار داده شد. تحلیل و بررسی نتایج حاصل از این آزمون توسط نرم افزار XPERT high score plus نسخه ۳،۰،۵ انجام شد. بررسی ساختار نانوذرات نقره با اسپکتروسکوپی مادون قرمز انتقالی فوریر (FTIR)، بررسی اندازه، توزیع اندازه نانوذرات نقره، بار سطحی با روش پراکندگی نوری دینامیک (DLS) نیز انجام شد و همچنین آنالیز طیف سنجی مرئی-فرابنفش (UV-VIS) بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷).

تست سنجش فنوتیپی تولید بیوفیلم: جهت تعیین سویه های کلبسیلا پنومونیه مولد بیوفیلم، سویه ها بر روی محیط کشت کنگورد آگار (مرک - آلمان) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. کلنی های سیاه رنگ به عنوان سویه های مولد بیوفیلم و کلنی های قرمز روشن به عنوان سویه های فاقد قدرت بیوفیلم شناسایی شدند (۱۸).

تست تشخیص بیوفیلم به روش میکروپلیت ۹۶ خانه ای: جدایه های کلبسیلا پنومونیه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) (کیولب، کانادا) رشد کردند. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری از محیط بالا به چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه پلیاستیرنی اضافه شد؛ که قبلاً ۱۸۰ میکرولیتر TSB افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. کریستال ویوله ۱/۰ درصد (CV) به مدت ۵ دقیقه برای رنگ آمیزی پلیتها استفاده شد. سپس چاهکها شسته و خشک شدند و به منظور سنجش میزان رنگ متصل شده که نمایان کننده میزان بیوفیلم بود، ۲۰۰ میلیلیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری (OD) در محدوده ۰-۰/۳۳ نانومتر با دستگاه الایزا (BioTek, USA) با ۳ تکرار اندازه گیری شد.

ODc به عنوان سه انحراف معیار بیشتر از میانگین OD کنترل منفی تعیین شد. چهار گروه برای طبقه بندی نتایج در نظر گرفته شدند که از جمله باکتری های متصل نشده ($OD \leq ODc$) باکتری های با اتصال ضعیف ($2 \times ODc \leq OD < ODc$)، باکتری های با اتصال متوسط ($2 \times ODc \leq OD < 4 \times ODc$) و در نهایت باکتری های با اتصال قوی ($4 \times ODc \leq OD$) است (۱۸).

تعیین الگوی مقاومتی کلبسیلا پنومونیه با توجه به معیارهای استاندارد CLSI ۲۰۱۹ گزارش شد، و بر اساس قطر هاله عدم رشد، سویه ها

1 Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Corbet با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۴۵ ثانیه، مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد تکثیر شامل ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۴۸۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد (۱۲).

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده (۵) جهت تشخیص ژن های *luxS* و *mrkD*، *sugE*

اندازه نوکلئوتید bp	توالی (5' → 3')	ژن
۲۲۹	F : ACACCACCAACTATTCCCTCG R : ATGGAACCCACATCGACATTC	<i>mrkD</i>
۱۹۸	F : TGGTTCCCAGCGTTATCACCA R : TCACGATACAGACAAGGCTGG	<i>sugE</i>
۹۰	F : ACTTACACCATGCACTCGCTG R : CAGTTCGTCGTTGCTGTTGATG	<i>luxS</i>

شد. نمونه‌های استخراج شده در فریزر ۸۰- درجه برای انجام آزمایشات نگهداری شدند.

غلظت RNA با دستگاه Nano drop با روش تعیین دانسیته نوری اندازه‌گیری شد. غلظت کمی RNAهای استخراج شده در نمونه‌ها نشان داد نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ در تمامی نمونه‌های تیمار شده و شاهد بالای ۱/۹۵ با حداقل غلظت ۵۰۰ نانوگرم/میکرولیتر بوده و برای ادامه مراحل سنتز cDNA و Real time PCR مناسب هستند.

سنتز cDNA: جهت سنتز cDNA در این پژوهش از کیت bioFact (bioFact, korea) استفاده شد. واکنش Real-Time PCR به روش سایرین گرین با استفاده از دستگاه Corbett انجام گرفت.

منحنی ذوب: به منظور تأیید صحت قطعه تکثیر شده و اطمینان از حضور یا عدم حضور پرایمر دایمر یا باند غیراختصاصی از منحنی ذوب استفاده شد. با توجه به خاصیت دستگاه (Applied Biosystems ۷۳۰۰ ABI) رسم منحنی ذوب به وسیله اندازه‌گیری تغییرات میزان فلورسانس در زمانهای مختلف در طیف حرارتی ۶۰-۹۵ درجه سانتیگراد صورت گرفت.

Fold change و نحوه محاسبه دلتا دلتا Ct ($\Delta\Delta Ct$) در **Real time** : در واکنش ریل تایم هنگامی که میزان بیان یک ژن را در چند گروه مقایسه می‌کنند بهترین راه بیان میزان تغییرات آن ژن در یک نمونه نسبت به نمونه دیگر **fold change** است. مفهوم **fold change** همان

مطالعه بیان ژن‌های *luxS* و *mrkD*، *sugE* کلبسیلا پنومونیه تیمار شده با نانوذره نقره به روش Real Time PCR

به‌منظور مقایسه کمی و میزان بیان ژن‌های *luxS* و *mrkD*، *sugE* بررسی بیان ژن موردنظر به روش Real Time -PCR انجام شد. در این مطالعه از ژن *16srRNA* به‌عنوان ژن کنترل داخلی در Real Time -PCR استفاده شد. در روش ریل تایم، پس از طراحی پرایمر، جهت بررسی مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا RNA کل از سلول‌ها (باکتری کلبسیلا پنومونیه) با استفاده از روش RNX-PLUS و طبق پروتکل شرکت سازنده AnaCell استخراج شد و با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس به cDNA تبدیل شد. سپس cDNA به روش Real time PCR تکثیر شد و بیان ژن موردنظر بررسی گردید (۱۲). جهت ارزیابی تأثیر نانوذره نقره سنتز شده به روش زیستی بر میزان بیان ژن‌های *luxS* و *mrkD*، *sugE* آنالیز Real time-PCR انجام شد. در این مطالعه از ژن *16srRNA* به‌عنوان ژن کنترل داخلی در Real Time -PCR استفاده شد. ۳۵ سیکل واکنش در PCR انجام شد. پس از تأیید اختصاصی‌ات باندهای مشاهده شده در PCR، به‌منظور کمیسازی بیان ژن‌های مورد مطالعه، از Real time-PCR استفاده و نتایج زیر حاصل شد.

استخراج RNA: سلول‌های تیمار شده در غلظت SubMIC از نانوذره نقره به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت، کشت داده و سانتریفوژ شدند، سپس ۵۰۰ میکرولیتر محلول RNX-PLUS به نمونه باکتری اضافه و ۵ ثانیه ورتکس

"چندبرابر" است، به عبارت دیگر بیان ژن موردنظر در نمونه های کنترل نسبت به تیمارهای مختلف چندبرابر افزایش و یا کاهش یافته است. روش تحلیل آماری: تحلیل داده ها توسط نرم افزار SPSS ۲۲ مورد تجزیه آماری قرار گرفت. آزمون واریانس یک طرفه One-way ANOVA جهت مقایسه تفاوت معنی دار مقادیر به دست آمده از بیان ژن موردنظر در سطح آماری ۵ درصد و آزمون چند دامنه ای دانکن (DMRT) استفاده شد. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در این مطالعه توصیفی - مقطعی از تعداد ۶۰ نمونه های مختلف بیولوژیک شامل ادرار، مدفوع، خلط و زخم از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان میلاد شهر تهران جمع آوری شده بود، با استفاده

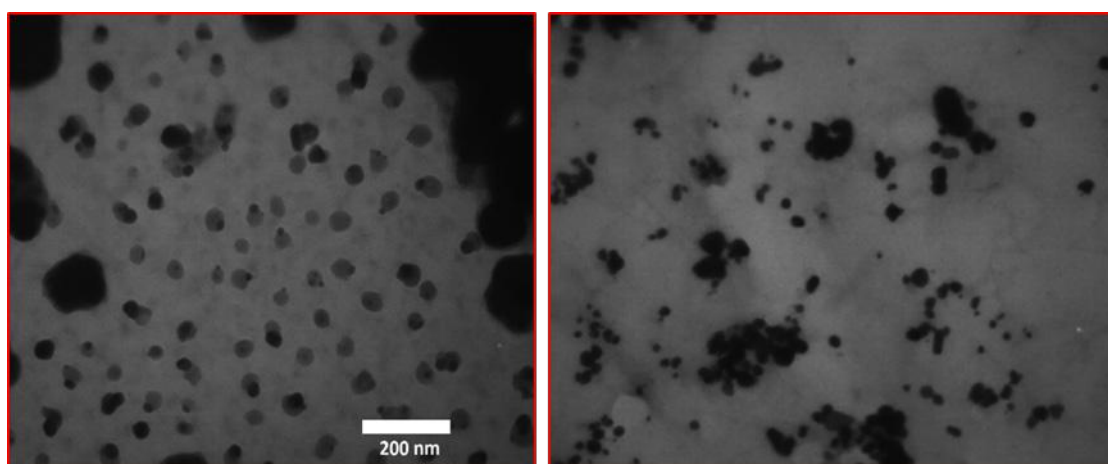
آزمونهای بیوشیمیایی ۳۶ نمونه به عنوان کلبسیلا پنومونیه تأیید شدند. نتایج تست فنوتیپی بیوفیلم: در این مطالعه، از محیط کشت کنگورد آگار برای بررسی فنوتیپی بیوفیلم استفاده شد. باکتری های بیوفیلم مثبت کلنیهای مشکی رنگ تولید میکنند در صورتی که باکتری های فاقد بیوفیلم به همان حالت اولیه یعنی قرمز رنگ باقی میمانند. از میان ۳۶ سویه بالینی کلبسیلا پنومونیه، تمامی سویه ها از نظر تست فنوتیپی بیوفیلم مثبت بودند. نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی: طبق دستورالعمل CLSI ۲۰۱۹، نتایج تست حساسیت میکروبی نشان داد که سویه کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده دارای مقاومت آنتی بیوتیکی متنوعی بوده و بیش از ۸۵ درصد سویه ها مقاومت به چند دارو (MDR) را از خود نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری کلبسیلا پنومونیه

آنتی بیوتیک	مقاوم	نیمه حساس	حساس
سفترایکسون (CRO 30μg)	۳۰ (۸۳/۳۳ درصد)	۲ (۵/۵۵ درصد)	۴ (۱۱/۱۱ درصد)
سفتازیدیم (CAZ 30μg)	۳۲ (۸۸/۸۸ درصد)	۱ (۲/۷۷ درصد)	۳ (۸/۳۳ درصد)
سفتواکسیم (CTX 30μg)	۳۳ (۹۱/۶۶ درصد)	۰ (۰ درصد)	۳ (۸/۳۳ درصد)
نالیدیکسیک اسید (NA 30μg)	۳۳ (۹۱/۶۶ درصد)	۱ (۲/۷۷ درصد)	۲ (۵/۵۵ درصد)
سیپروفلوکساسین (CP 30μg)	۳۴ (۹۴/۴۴ درصد)	۰ (۰ درصد)	۲ (۵/۵۵ درصد)
ایمی پنم (IMP 30μg)	۲۵ (۶۹/۴۴ درصد)	۰ (۰ درصد)	۱۱ (۳۰/۵۵ درصد)
سفوکستین (FOX 30μg)	۳۴ (۹۴/۴۴ درصد)	۱ (۲/۷۷ درصد)	۱ (۲/۷۷ درصد)

آنالیز TEM: به منظور بررسی و آنالیز ریخت شناسی و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی TEM استفاده شد. نتایج TEM

نشان داد که نانوذره نقره سنتز شده دارای ساختار کروی و سیاه رنگ، دارای میانگین سایز ۶۰ نانومتر با انحراف معیار ۵ نانومتر بود (شکل ۱).



شکل ۱- آنالیز دستگاهی TEM نانوذره نقره سنتز شده

آنالیز DLS یا تفرق نور پویا (Dynamic light scattering)

قطر $2177/2$ نانومتر بودند که نشان‌دهنده سنتز هیدرودینامیکی ذرات در ابعاد نانو است. شاخص توزیع ذرات $1/200$ بود که نشان‌دهنده توزیع یکنواخت اندازه نانوذرات است و بیانگر همگونی خوب نانوذرات نقره بود. آنالیزهای DLS و TEM نشان می‌دهند که نانوذرات نقره غالباً کروی شکل بوده و اندازه آنها در محدوده $40-20$ نانومتر می‌باشند.

نانوذرات نقره با استفاده از پراکندگی دینامیک نوری مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج قابل‌مشاهده در نمودار ۱، نانوذرات سنتز شده دارای قطر 1064 نانومتر بودند که نشان‌دهنده سنتز هیدرودینامیکی ذرات در ابعاد نانو است. شاخص توزیع ذرات $0/858$ بود که نشان‌دهنده توزیع یکنواخت اندازه نانوذرات است و بیانگر همگونی خوب نانوذرات نقره بود. بر اساس نتایج قابل‌مشاهده در نمودار ۲، نانوذرات سنتز شده دارای

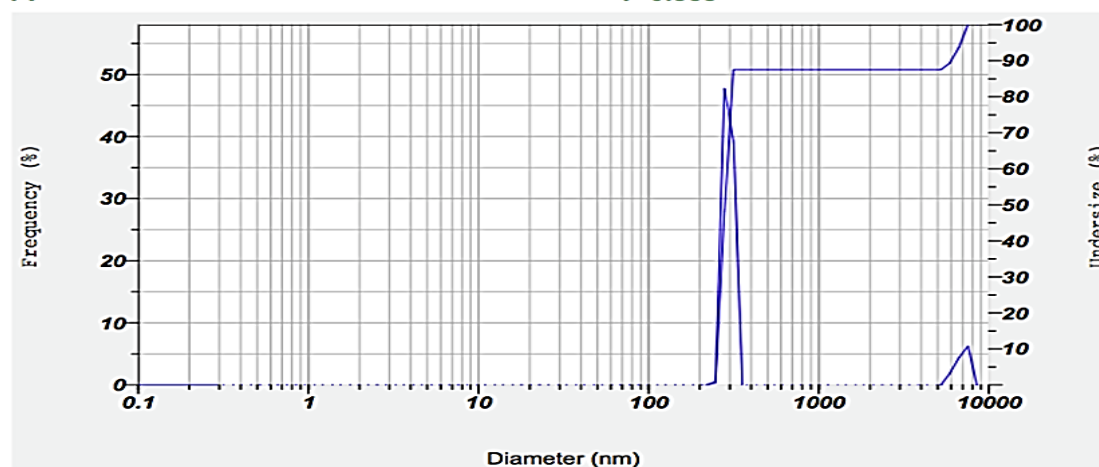
Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	0.88	277.6 nm	17.3 nm	275.8 nm
2	0.12	6571.2 nm	565.5 nm	6789.6 nm
3	---	--- nm	--- nm	--- nm
Total	1.00	1064.0 nm	2090.7 nm	275.8 nm

Cumulant Operations

Z-Average
PI

: 626.7 nm
: 0.858



Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	0.66	275.1 nm	16.8 nm	272.2 nm
2	0.34	5826.5 nm	892.5 nm	6238.5 nm
3	---	--- nm	--- nm	---
Total	1.00	2177.2 nm	2686.0 nm	272.2 nm

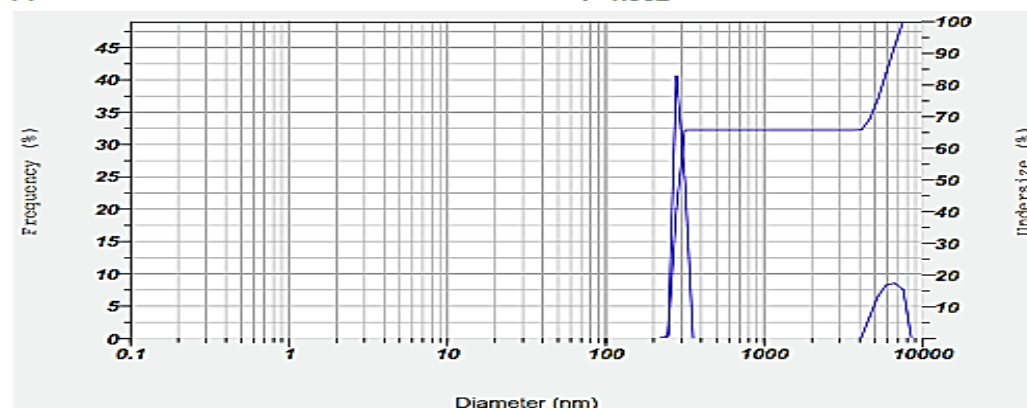
Cumulant Operations

Z-Average

: 602.1 nm

PI

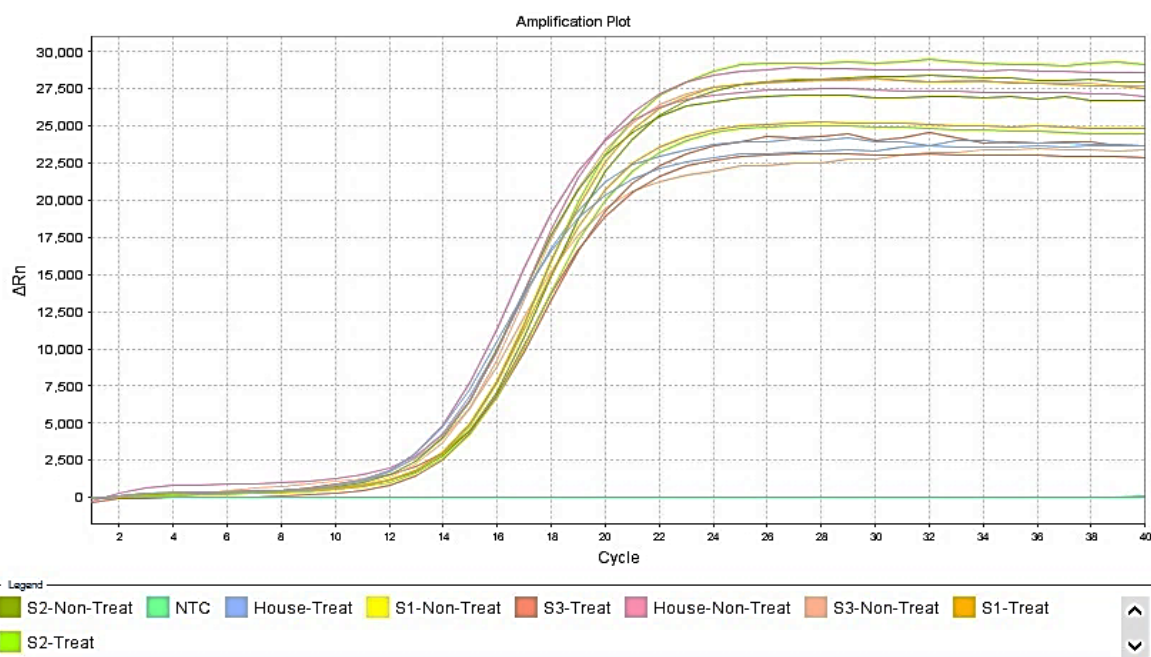
: 1.002



نمودار ۱ و ۲- بررسی قطر هیدرودینامیکی نانوذرات سنتز شده به روش DLS

هدف در آغاز واکنش است. هرچه میزان CT یک ژن کمتر باشد میزان بیان ژن بیشتر است.

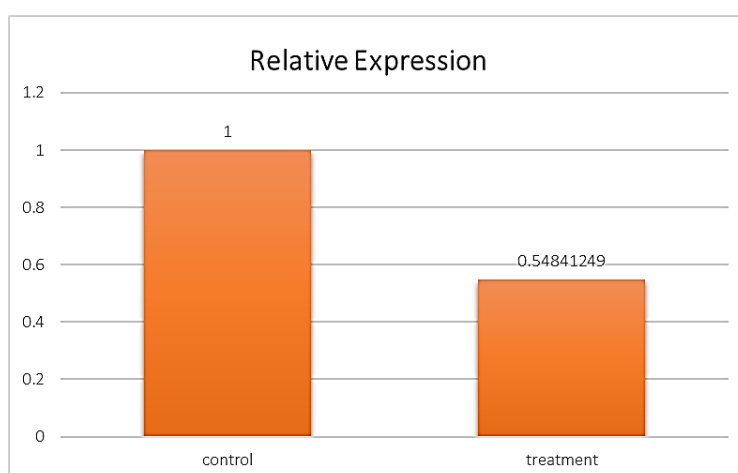
بررسی بیان ژن با استفاده از تکنیک Real time-PCR : نمودار (۳)
هر یک عدد تغییر در CT نشان دهنده دو برابر بودن تعداد مولکول های

نمودار ۳- نمودار منحنی تکثیر ژن *luxS* و *mrkD*، *sugE*

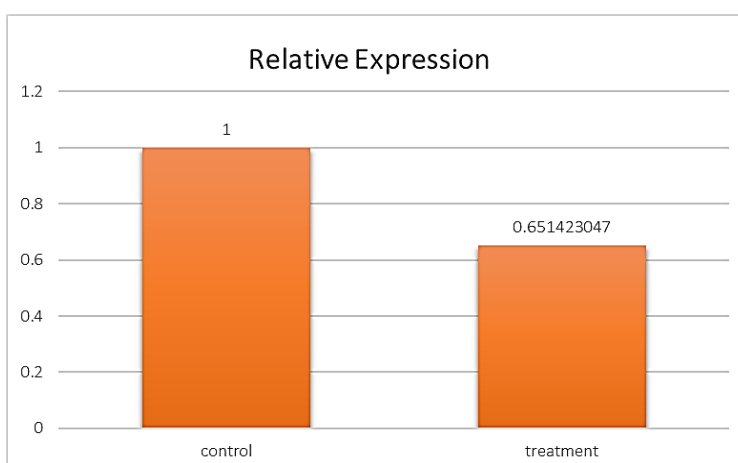
مقایسه بیان ژن *luxS* و *mrkD*، *sugE* در تیمارهای مختلف

مطابق نمودارهای زیر ۴ تا ۶ آنالیز داده‌ها نشان داد، بیان ژنهای *mrkD*، *luxS* و *sugE* در سلولهای تیمار شده با نانوذره نقره نسبت به گروه کنترل کاهش قابل توجهی داشته است، که نشان دهنده تأثیر بالای نانوذره

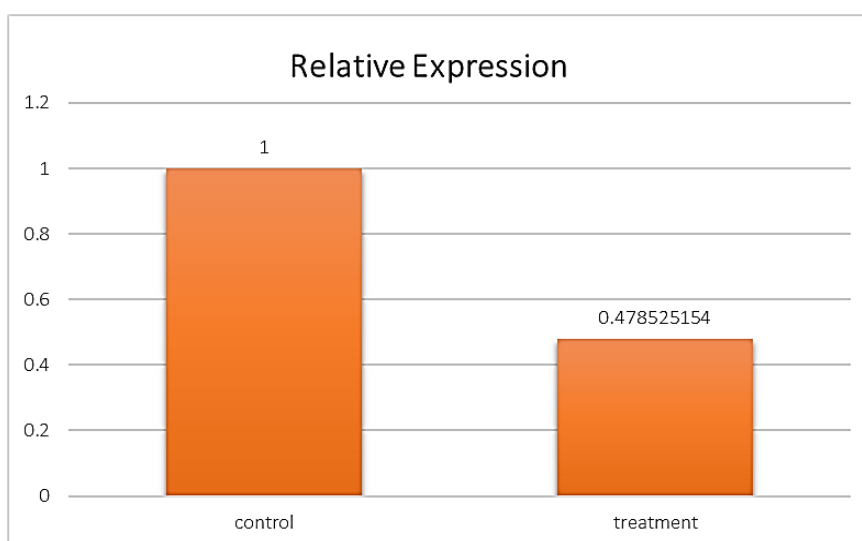
در کاهش بیان ژنهای *luxS* و *mrkD*، *sugE* سلولهای میکروارگانیسم کلبسیلا پنومونیه تیمار شده با نانوذره نقره میباشد. در سلولهای تیمار شده با نانوذره نقره بیان ژنهای *luxS* و *mrkD*، *sugE* به ترتیب ۳۵/۴۶ و ۵۳ درصد کاهش داشته است.



نمودار ۴- بیان ژن *mrkD* با استفاده از تکنیک Real time-PCR در سویه کلبسیلا پنومونیه



نمودار ۵- بیان ژن *sugE* با استفاده از تکنیک Real time-PCR در سویه کلبسیلا پنومونیه

نمودار ۶- بیان ژن *luxS* با استفاده از تکنیک Real time-PCR در سویه کلبسیلا پنومونیهمقایسه بیان ژن *luxS* و *mrkD*، *sugE* در تیمارهای مختلف

برای ژن های *luxS* و *mrkD*، *sugE* برابر ۰/۰۰۲۴۸۰۹۰۱، ۰/۰۰۶۱۰۹۶۲۸ و ۰/۰۰۳۸۱۷۳۸ به ترتیب به دست آمد. در این ژن ها مقدار $P < 0/05$ در سلول های تیمار شده با نانوذره نقره به دست آمد که نشان دهنده تأثیر این نانوذره در کاهش بیان ژن های مورد بررسی در این پژوهش می باشد.

مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵ درصد ($p \leq 0/05$) انجام شد. مطابق داده های آنالیز واریانس ژن های *mrkD*، *luxS* و *sugE* در سویه های کلبسیلا پنومونیه، میانگین داده ها در بیان ژن در سلول های تیمار شده با نانوذره نقره معنی دار بوده، مقدار P -value

House				
Name		CT	CT	Average (CT)
Treat		13.44	13.47	13.455
Non-Treat		13.7	13.77	13.735
Gene (mrkD)				
Name		CT	CT	Average (CT)
Sample 1 Treat		14.68	14.67	14.675
Sample 2 Treat		14.98	14.74	14.86
Sample 3 Treat		15.39	14.56	14.975
Sample 1 Non-Treat		14.21	14.21	14.21
Sample 2 Non-Treat		14.06	14.44	14.25
Sample 3 Non-Treat		14.27	14.31	14.29
ΔΔCT Method				
Name		ΔCT	ΔΔCT	Fold change
Sample 1 Treat		1.22	0.745	0.596667872
Sample 2 Treat		1.405	0.89	0.539614118
Sample 3 Treat		1.52	0.965	0.512278412
Sample 1 Non-Treat		0.475	-0.04	
Sample 2 Non-Treat		0.515	0	
Sample 3 Non-Treat		0.555	0.04	
Avg Fold change		0.54952		
T-Test				
P-value		Significant or Not		
0.002480901		Significant		

جدول ۳- آنالیز داده های Real time-PCR ژن *mrkD*

House				
Name		CT	CT	Average (CT)
Treat		25.34	25.36	25.35
Non-Treat		25.55	25.54	25.545

Gene (SugE)				
Name		CT	CT	Average (CT)
Sample 1 Treat		26.79	26.89	26.84
Sample 2 Treat		26.94	26.96	26.95
Sample 3 Treat		26.58	26.8	26.69
Sample 1 Non-Treat		26.41	26.49	26.45
Sample 2 Non-Treat		26.34	26.63	26.485
Sample 3 Non-Treat		26.46	26.09	26.275

$\Delta\Delta CT$ Method				
Name		ΔCT	$\Delta\Delta CT$	Fold change
Sample 1 Treat		1.49	0.585	0.666549339
Sample 2 Treat		1.6	0.66	0.632878297
Sample 3 Treat		1.34	0.61	0.655196702
Sample 1 Non-Treat		0.905	0.046666667	
Sample 2 Non-Treat		0.94	0.081666667	
Sample 3 Non-Treat		0.73	-0.128333333	
Avg Fold change		0.651575		

T-Test	
P-value	Significant or Not
0.006103628	Significant

جدول ۴- آنالیز داده های Real time-PCR ژن *sugE*

House				
Name		CT	CT	Average (CT)
Treat		12.41	12.34	12.375
Non-Treat		12.53	12.88	12.705

Gene (LuxS)				
Name		CT	CT	Average (CT)
Sample 1 Treat		13.29	13.29	13.29
Sample 2 Treat		13.45	13.66	13.555
Sample 3 Treat		13.89	13.57	13.73
Sample 1 Non-Treat		12.61	12.79	12.7
Sample 2 Non-Treat		12.95	12.87	12.91
Sample 3 Non-Treat		12.52	13.01	12.765

$\Delta\Delta CT$ Method				
Name		ΔCT	$\Delta\Delta CT$	Fold change
Sample 1 Treat		0.915	0.92	0.52850902
Sample 2 Treat		1.18	0.975	0.508739846
Sample 3 Treat		1.355	1.295	0.407536166
Sample 1 Non-Treat		-0.005	-0.091666667	
Sample 2 Non-Treat		0.205	0.118333333	
Sample 3 Non-Treat		0.06	-0.026666667	
Avg Fold change		0.481595		

T-Test	
P-value	Significant or Not
0.00381768	Significant

جدول ۵- آنالیز داده های Real time-PCR ژن *luxS*

بحث

کائور و همکاران نیز در سال ۲۰۲۰، بیان کردند که مقاومت جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلیم کلبسیلا پنومونیه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفوتاکسیم و سیپروفلوکساسین ۱۰-۱۲ بار بیشتر از جدایه‌هایی که بیوفیلیم تولید نمی‌کنند، مقاومت نشان می‌دهند (۲۰).

در مطالعه شیوایی و همکاران در سال ۲۰۱۹، ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به‌دست‌آمده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های مطهری و میلاد تهران با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. بیشترین مقاومت نسبت به سفوتاکسیم (۶۷ درصد) و کمترین مقاومت به ای‌می‌پنم و مروپنم گزارش شد (۲۱) که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

با بررسی نتایج این مطالعه با سایر مطالعات می‌توان نشان داد که جدایه‌های تولیدکننده بیوفیلیم دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالاتری نسبت

کلبسیلا پنومونیه یک پاتوژن فرصت‌طلب انسانی است که عفونت شدید در بیماران بستری شده ایجاد می‌کند و تهدید جهانی در سیستم مراقبت بهداشتی در نظر گرفته می‌شود (۲) مرگ‌ومیر ناشی از عفونت کلبسیلا پنومونیه حدود ۵۰ درصد در بیماران مبتلا است و عمدتاً به علت افزایش فنوتیپ‌های مقاومت چنددارویی به‌عنوان یک مسئله مهم در سیستم‌های مراقبت‌های بهداشتی تلقی می‌شود (۱۹). در مطالعه حاضر مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه بررسی شد که در این مطالعه بیشترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و سفوکسیتین (۹۴/۴۴ درصد) و کمترین مقاومت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم (۶۹/۴۴ درصد) گزارش شد.

نانوذرات فقط به ساختار دیواره سلولی مربوط نمی شود، بلکه ممکن است به پراکسیداسیون چربی و تولید گونه های فعال اکسیژن نیز مربوط باشد.

همچنین، نتایج بررسی بیان ژن های بیوفیلمی توسط روش Real time PCR نشان داد که نانوذرات نقره هنگامی که سویه ها تحت تأثیر نانوذره نقره در غلظت زیر حد مهارکنندگی قرار می گیرند توانایی تشکیل بیوفیلیم را ندارند؛ زیرا هر سه ژن *mrkD*، *sugE* و *luxS* کاهش معنی داری را نشان دادند؛ بنابراین هنگامی که سویه ها در مجاورت نانوذره نقره قرار می گیرند، از تولید آگزوپلی ساکارید در این سویه ها ممانعت می شود و ارگانیسم نمی تواند بیوفیلیم تشکیل دهد. باتوجه به مهار بیان ژن بیوفیلیم می توان نتیجه گرفت که نانوذرات نقره می توانند جایگزین مناسبی جهت از بین بردن بیوفیلیم در سویه های کلبسیلا پنومونیه باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات نقره سنتز شده کروی و با میانگین اندازه ۶۰/۱۷ نانومتر هستند. نانوذرات نقره تشکیل بیوفیلیم را در سویه های MDR کلبسیلا پنومونیه مهار می کنند و بیان ژن های *mrkA* و *LuxS* پس از تیمار با حداقل غلظت ممانعت کنندگی نانوذره نقره به طور قابل توجهی در این سویه ها کاهش می یابد (۲۷) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. فعالیت ضدباکتری نانوذرات نقره سنتز شده با چندین داروی آنتی بیوتیک به عنوان کنترل مقایسه شد. روش سنتزی پیشنهادی دوستدار محیط زیست بوده و قابلیت استفاده برای تولید نانوذرات نقره در مقیاس بزرگ را دارد (۲۸).

شیوایی و همکاران در سال ۲۰۱۸ بیان داشتند که از ۷۰ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مورد تحقیق، ۸۱ درصد تولید کننده بیوفیلیم بودند که تمام سویه های تولید کننده بیوفیلیم دارای ژن های *fimA*، *fimD*، *mrkA*، *ecpA* و *fimH* بودند (۲۱) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

نتیجه گیری

مکانیسم اصلی تأثیر نانوذرات نقره بر روی سویه های کلبسیلا پنومونیه از طریق آسیب به DNA و پروتئین ها و تخریب دیواره سلولی است. مطالعات نشان دادند که نانوذرات نقره رفتار فوتوکاتالیستی دارند و می توانند رادیکال های سمی اکسیژن تولید کنند و منجر به از بین رفتن غشای سلول باکتریایی شوند، درواقع یکپارچگی غشای سلول باکتری را مختل نموده و باعث کاهش سطح آب گریزی باکتری می شود و تنظیم رونویسی از ژن های مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو را کاهش می دهد.

تمامی سویه های تحقیق حاضر از نظر تست فنوتیپی بیوفیلیم مثبت بودند

به جدایه های غیر تولید کننده بیوفیلیم هستند. شاید تفاوت میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها در بین مطالعات گذشته به دلیل تفاوت در غلظت اولیه باکتری و یا بیان فاکتورهای اتصال اولیه باکتری در تولید بیوفیلیم و یا منبع نمونه ها و مکان های جغرافیایی مختلف باشد. پس از افزایش پدیده مقاومت چنددارویی در باکتری های مختلف، خصوصیات آنتی باکتریال نانوذرات فلزی یکی از مهم ترین زمینه های مطالعات میکروبیولوژی شده است (۲۲).

موسوی و همکارانش با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia turcomanica* نانوذرات نقره را سنتز کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره سنتز شده دارای میانگین اندازه ۲۲ نانومتر بوده و دارای خاصیت ضد میکروبی معناداری است (۲۳).

تولید بیوفیلیم و ایجاد مقاومت های دارویی در سویه های باکتریایی به خصوص کلبسیلا پنومونیه یکی از معضلات اخیر و مورد توجه محققان در سراسر دنیا است. استفاده از گیاهان برای تولید نانوذرات نقره به عنوان منابع تجدیدپذیر و ارزان جهت تهیه نانومواد زیستی مورد توجه خاصی قرار گرفته است (۲۴). از این رو، پژوهش حاضر باهدف بررسی سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از گیاه سیر و بررسی تأثیرات آن بر روی بیان ژن های بیوفیلمی در سویه های کلبسیلا پنومونیه برای اولین بار صورت گرفت.

قنبر و همکارانش در سال ۲۰۱۷ نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia quttensis* سنتز کردند. این محققان اثرات ضدباکتریایی را با روش میکرودايلوشن مورد مطالعه قرار دادند و نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره نقره دارای خاصیت ضدباکتریایی است (۲۵). نتایج تست های ضد میکروبی در پژوهش حاضر نشان داد که نانوذرات نقره دارای اثرات ضد میکروبی بر روی تمام سویه های مولد بیوفیلیم داشت به طوری که نانوذرات نقره سنتز شده از غلظت ۶/۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر خاصیت میکروب کشی داشتند.

در مطالعه صدیقی و همکاران در سال ۲۰۲۰، نشان داده شد که حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره بر علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه ۲۵/۶ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر است و درحالی که مقدار MBC آنها ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد که با پژوهش حاضر مطابقت دارد (۲۶). تفاوت در میزان MIC در مطالعات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت در روش های آماده سازی نانوذرات، اندازه نانوذره و تفاوت در سوش های باکتریایی مورد مطالعه باشد. حساسیت باکتری ها به

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد به شماره پژوهشی ۱۲۳۲۹۲۵۹۶۲۰۶۱۹۶۱۴۰۱۱۶۲۵۸۹۷۴۸ که در شورای پژوهشی دانشکده

به ثبت رسیده است

تعارض منافع

در این مطالعه تضاد منافع وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

در این مطالعه ملاحظات اخلاقی مطابق کدهای دانشگاه رعایت شده

است

مشارکت نویسندگان

نسترن پرکان: اجرای تحقیق و آنالیز داده‌ها

امیر میرزایی: طرح اصلی موضوع و ویرایش مقاله

کامبیز لاریجانی: آنالیز آماری و نگارش مقاله

و باکتری‌ها بر اساس توانایی تشکیل بیوفیلم به ۳ گروه قوی (۷۹ درصد)،

متوسط (۶ درصد) و ضعیف (۵ درصد) تقسیم شدند. نتایج تست حساسیت

آنتیبیوتیکی نشان داد که اکثر سویه‌ها مقاوم به چند دارو (MDR) بودند.

نانوذره نقره سبز سنتز شده توسط عصاره سیر دارای ساختار کروی

و سیاه‌رنگ و دارای میانگین سایز ۸۶/۶ نانومتر بود. نانوذر نقره سبز سنتز

شده بر روی تمامی جدایه‌های مورد مطالعه خاصیت ضدباکتریایی داشت

و کمترین غلظت MIC و بیشترین مقدار برابر با ۶/۲۵ و ۱۰۰ میکروگرم

بر میلی‌لیتر بود. در نتیجه بیشترین فراوانی مربوط به ژن *luxS* در ۳۰ جدایه

(۸۳/۳۳ درصد) است، همچنین فراوانی ژنهای *sugE* و *mrkD* هر کدام

۲۳ جدایه (۶۳/۸۸ درصد) بوده و تعداد ۲۳ جدایه (۶۸/۸۸ درصد) به‌طور

همزمان دارای هر سه ژن می‌باشند. بیان ژنهای *sugE*، *mrkD* و *luxS*

در باکتریهای تیمار شده با نانوذر نقره نسبت به گروه کنترل کاهش قابل

توجهی داشتند.

References

- Gupta M, Didwal G, Bansal S, Kaushal K, Batra N, Gautam V, et al. Antibiotic-resistant Enterobacteriaceae in healthy gut flora: A report from north Indian semiurban community. The Indian journal of medical research. 2019;149(2):276.
- Wyres KL, Wick RR, Judd LM, Froumine R, Tokolyi A, Gorrie CL, et al. Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. PLoS genetics. 2019;15(4):e1008114.
- Geller BL, Li L, Martinez F, Sully E, Sturge CR, Daly SM, et al. Morpholino oligomers tested in vitro, in biofilm and in vivo against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2018;73(6):1611-9.
- Juan C-H, Chuang C, Chen C-H, Li L, Lin Y-T. Clinical characteristics, antimicrobial resistance and capsular types of community-acquired, healthcare-associated, and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2019;8(1):1-9.
- Masoudian S, Hosseini F, Amini K. Investigating the Effects of Iron Oxide Nanoparticles on the Expression of Biofilm Production Genes and Antibiotic Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Strains. Biological Journal of Microorganism. 2021;10(38):17-26.
- Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice M, Libori M, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. Journal of applied microbiology. 2017;123(4):1003-18.
- Sanzari I, Leone A, Ambrosone A. Nanotechnology in plant science: to make a long story short. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2019;7:120.
- Bognár S, Putnik P, Šojić Merkulov D. Sustainable green nanotechnologies for innovative purifications of water: Synthesis of the nanoparticles from renewable sources. Nanomaterials. 2022;12(2):263.
- Akintelu SA, Folorunso AS. A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles using plant extracts and its biomedical applications. BioNanoScience. 2020;10(4):848-63.
- Jamil B, Habib H, Abbasi SA, Ihsan A, Nasir H, Imran M. Development of cefotaxime impregnated chitosan as nano-antibiotics: De novo strategy to combat

- biofilm forming multi-drug resistant pathogens. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:330.
11. Martinez-Gutierrez F, Boegli L, Agostinho A, Sánchez EM, Bach H, Ruiz F, et al. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling*. 2013;29(6):651-60.
 12. Liu S, Zhu L, Cao W, Li P, Zhan Z, Chen Z, et al. Defect-related optical properties of Mg-doped ZnO nanoparticles synthesized via low temperature hydrothermal method. *Journal of Alloys and Compounds*. 2021;858:157654.
 13. Liu Y, Sun Y, Huang G. Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;111:780-6.
 14. Salomoni R, Léo P, Montemor A, Rinaldi B, Rodrigues M. Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotechnology, science and applications*. 2017;115-21.
 15. Ansari MA, Khan HM, Khan AA, Cameotra SS, Pal R. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles against biofilm of extended spectrum β -lactamase isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Nanoscience*. 2014;4:859-68.
 16. Kavooosi S, Yaghoubi H. Synthesis of silver nanoparticles using green method of plant extract european marjoram (*Origanum majorana*) and their antibacterial effects. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 2017;30(2):161-73.
 17. Lim W, Macfarlane J, Boswell T, Harrison T, Rose D, Leinonen M, et al. Study of community acquired pneumonia aetiology (SCAPA) in adults admitted to hospital: implications for management guidelines. *Thorax*. 2001;56(4):296-301.
 18. Sabahi M, Hamdi S, Mirzaie A. Anti-biofilm activity of synthesized silver nanoparticles using asphodelus dendroides extract against antibiotic resistant and biofilm forming *Klebsiella pneumoniae* clinical strains: a laboratory study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2020;18(12):1233-52.
 19. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*. 2017;41(3):252-75.
 20. Kaur K. Detection of Mrk D gene and Antibiofilm of Biofilm Producing *Klebsiella pneumoniae* from Various Indwelling Devices. *International Journal of Microbiology Research*, ISSN. 2020:0975-5276.
 21. Shivaee A, Meskini M, Shahbazi S, Zargar M. Prevalence of *flmA*, *flmH*, *mrkA*, *ecpA*, and *mrkD* virulence genes affecting biofilm formation in clinical isolates of *K. pneumonia*. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2019;23(2):168-76.
 22. Altun E, Aydogdu MO, Chung E, Ren G, Homer-Vanniasinkam S, Edirisinghe M. Metal-based nanoparticles for combating antibiotic resistance. *Applied Physics Reviews*. 2021;8(4).
 23. Mousavi B, Tafvizi F, Zaker Bostanabad S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artemisia turcomanica* leaf extract and the study of anti-cancer effect and apoptosis induction on gastric cancer cell line (AGS). *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2018;46(sup1):499-510.
 24. Ahmad S, Munir S, Zeb N, Ullah A, Khan B, Ali J, et al. Green nanotechnology: A review on green synthesis of silver nanoparticles—An ecofriendly approach. *International journal of nanomedicine*. 2019;5087-107.
 25. Ghanbar F, Mirzaie A, Ashrafi F, Noorbazargan H, Dalirsaber Jalali M, Salehi S, et al. Antioxidant, antibacterial and anticancer properties of phyto-synthesised *Artemisia quttensis* Podlech extract mediated AgNPs. *IET nanobiotechnology*. 2017;11(4):485-92.
 26. Siddique MH, Aslam B, Imran M, Ashraf A, Nadeem H, Hayat S, et al. Effect of silver nanoparticles on biofilm formation and EPS production of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Biomed research international*. 2020;2020:1-9.

27. Foroohimanjili F, Mirzaie A, Hamdi SMM, Noorbazargan H, Hedayati Ch M, Dolatabadi A, et al. Antibacterial, antibiofilm, and antiquorum sensing activities of phytosynthesized silver nanoparticles fabricated from *Mespilus germanica* extract against multidrug resistance of *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. *Journal of basic microbiology*. 2020;60(3):216-30.
28. Heydari R, Rashidipour M, Azadpour M. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* L.: synthesis and antibacterial activities. 2016.