AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
Alborz University of Medical Sciences Journal, Winter 2025, Vol. 14, No 1: 1- 16

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

Nastaran Parkan[1]
Amir Mirzaei[2*]
Kambiz Larijani[3]

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 pneumonia" 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 pneumonia" 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 pneumonia" 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 pneumonia", 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 pneumonia" 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: Mirzaii 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

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

AUMJ Journal
Alborz University of Medical Sciences
نشریه دانشگاه علوم‌پزشکی البرز، زمستان ۱۴۰۳، دوره ۱۴، شماره ۱، صفحه‌های ۱۶-۱

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

نسترن پرکان[۱]
امیر میرزایی*[۲]
کامبیز لاریجانی[۳]

چکیده

مقدمه: کلبسیلا پنومونیه یک پاتوژن فرصت‌طلب انسانی است. تشکیل بیوفیلم، یکی از خواص مهم این باکتری اســـت 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 کلبسیسلا پنومونیه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار: در این مطالعه توصیفی – مقطعی تعداد ۶۰ نمونه از موارد ادراری جمع آوری و با اســـتفاده از تســـتهای 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 بیوفیلم کلبسیلا پنومونیه به کمک سنجش میزان رنگ متصل شده به بیوفیلم بررسی شد. الگوی مقاومتی کلبسیلا پنومونیه به روش دیســـک دیفیوژن تعیین شد. حداقل غلظت ممانعت کنندگی نانوذره نقره به روش میکرودایلوشـــن بر روی ســـویه‌های مولد بیوفیلم کلبسیلا پنومونیه ارزیابی شد. مالتی‌پلکس PCR جهت شناســـایی ژنهایsugE ،mrkD و luxS انجام شـــد. در نتیجه، بیان ژنهای sugE ،mrkD و luxS 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 بیوفیلم مثبت بودند. اکثر سویه‌ها مقاوم به چند دارو (MDR) بودند. نانوذره نقره سنتز شده دارای ســـاختار کروی و سیاهرنگ و دارای میانگین سایز ۶۰نانومتر بود. نانوذره نقره بر روی تمامی جدایه‌های مـــورد مطالعه خاصیت ضدباکتریایی داشـــت ولی کمتریـــن غلظت MIC برابر با ۶/۲۵ و بیشـــترین 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 ســـه ژن است. بیان ژنهای sugE ،mrkD و luxS در ســـلولهای تیمار شده با نانوذره نقره نسبت به گروه کنترل کاهش قابل توجهی داشـــت. تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به‌طور مؤثر در واکنش به نانوذرات اکسید نقره مهار شـــدند. نتایج تحقیق در کنترل عفونت‌های مقاوم در برابر چند دارو (MDR) در بیماران بستری می‌تواند مفید باشد.

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

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

نویسنده‌مسئول:
Amir.mirzaie@piau.ac.ir

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه باکتری گرم منفی، متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است که به‌عنوان پاتوژن فرصت‌طلب انسانی باعث عفونت‌های شدید؛ مانند عفونت دستگاه ادراری، مننژیت، پنومونی و سپتی‌سمی به‌ویژه در بیماران بستری می‌شود (۱). به طور طبیعی نرخ بیماری‌زایی مرتبط با این باکتری کم است، اما توانایی تشکیل بیوفیلم و تجمع باکتری‌ها، به بروز مقاومت آن به چندین آنتی‌بیوتیک منجر می‌شود که یک عامل مهم بیماری‌زا برای باکتری تلقی می‌شود (۲). ژن *mrkA* کدکننده Type ۳ Fimbria Shaft یک پروتئین ساختاری فیمبریه را کد می‌کند و در شروع اتصال باکتری به کاتتر برای تشکیل بیوفیلم مهم است (۳). حضور این ژن‌ها در کلبسیلا پنومونیه منجر به تولید عفونت‌های شدیدتری در بیماران میشود

ژن‌های *treC* و *sugE* با تنظیم پلی‌ساکارید کپسول که در شکل‌گیری بیوفیلم ضروری‌اند، بر تشکیل بیوفیلم اثر می‌گذارند (٤). ژن*mrkD* پروتئین ساختاری فیمبریه را کد می‌کند و در شروع اتصال باکتری به کاتتر برای تشکیل بیوفیلم مهم است. ژن‌های *treC* و*sugE* با تنظیم پلی‌ساکارید کپسول که در شکل‌گیری بیوفیلم ضروری‌اند، بر تشکیل بیوفیلم اثر می‌گذارند. سلول‌های باکتریایی با استفاده از مولکول‌های سیگنالینگ (پیام‌رسان)شیمیایی که به‌عنوان کروم سنسینگ شناخته می‌شوند، با یکدیگر ارتباط برقرار می‌کنند و در فنوتیپ‌های باکتریایی مانند تشکیل بیوفیلم اهمیت دارند. ژن*LuxS* یکی از ژن‌های مهم در فرآیند کروم سنسینگ و تشکیل بیوفیلم است(٦و٥).

یکی از محصولات فناوری نانو، نانوذرات نقره است توانایی ارائه نقره از طریق ساختار نانوکریستال به طرز شگرفی ارزش بیولوژیکی و ضدمیکروبی آن را بالا میبرد، زیرا نانوذرات نقره سطح تماس بیشتری در مقایسه با ذرات نقره به‌صورت توده دارد (۷). در روش سنتز سبز یون‌های فلزی با استفاده از ترکیبات گیاهی معمولاً یک واکنش تک مرحله‌ای بوده که بدون نیاز به سورفکتانت و سایر عوامل پایدارکننده به نانوذره تبدیل می‌شوند. مواد و ترکیبات فعال زیستی در عصاره گیاهان از جمله فلاونوئیدها و سایر متابولیت‌های مؤثر فعال محلول در آب می‌توانند برای احیا یونهای فلزی به نانوذرات در دمای اتاق مورد استفاده قرار گیرند(۸).

برخی از باکتری‌ها در برابر نقره مقاوم هستند و می‌توانند نقره را در دیواره سلولی خود تا حدود ۲۵ درصد به‌عنوان زیست‌توده از وزن خشک خود جمع کنند و این نشان‌دهنده استفاده فراوان آنها در بازیافت صنعتی نقره از مواد سنگی است. مهم‌ترین مزیت استفاده از عصاره‌های گیاهی برای سنتز نانوذرات نقره این است که در اکثر موارد بهراحتی در دسترس، ایمن و غیرسمی هستند و متابولیت‌های متنوعی دارند که میتوانند به کاهش یون‌های نقره کمک کنند و نسبت به میکروب‌ها، فرایند سنتز را سریع‌تر پیش میبرند (۹). نانوذرات نقره خارج سلولی در مدت ۱۰ دقیقه سنتز شدند و فعالیت ضدباکتریایی در برابر سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلای، کلبسیلا پنومونیه و انتروکوکوس فکالیس دیده شدند. نانوذرات فلزی مانند نقره می‌تواند برای هر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی خواص ضدباکتری داشته باشد (۱۰). از معایب روش‌های شیمیایی که نقش عوامل احیایی و تثبیت‌کننده را ایفا می‌کنند، این است که در طبیعت به‌صورت تجزیه نشده باقی می‌مانند و در نهایت موجب آلودگی شیمیایی محیط‌زیست میشوند. اخیراً سنتز زیستی نانوذرات نقره توسط عوامل طبیعی و زیستی؛ مانند گیاهان موردتوجه محققان قرار گرفته است (۱۰) در این مطالعه از گیاه سیر جهت سنتز سبز نانوذرات نقره استفاده شد.

امروزه علاوه بر روش‌های شیمیایی، روش‌های زیستی برای تولید نانوذرات فلزی به‌عنوان روش‌های سبز غیرسمی توسعه یافته‌اند (۱۱). یکی از راهکارهای مقابله با تولید بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده از علم نانوتکنولوژی میباشد. یکی از نانوذرات مورد استفاده جهت از بین بردن بیوفیلم باکتریایی، نانوذرات نقره میباشد(۱۱). تاکنون مطالعات کمی در زمینه بررسی اثرات ضدبیوفیلمی نانوذرات نقره به انجام رسیده است.

دانشمندان با استفاده از تقطیر بخار آب بر روی سیر موفق به دستیابی ترکیب دی آلیل دی سولفید همراه با مقادیر کمی دی آلیل تری سولفید و دی آلیل تترا سولفید شدند. سپس تحقیقات نشان داد هر ترکیب به‌دست‌آمده دارای خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی است (۱۲). بهجز ترکیبات گوگردی که عوامل اصلی خواص سیر هستند، ترکیبات دیگری از قبیل استرولها، فسفاتیدیل کولینها، فسفاتیدیل اتانول آمینها، لینولنات 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(۱۲, ۱۳).

نانوذرات با اجزای اصلی سلول‌های باکتریایی مانند DNA، لیزوزوم‌ها، ریبوزوم‌ها و آنزیم‌ها ارتباط برقرار میکنند نمی‌توانند منجر به استرس اکسیداتیو، تغییرات هتروژنوس، تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی،

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

اختلالات تعادل الکترولیت‌ها، مهار آنزیم‌ها، غیرفعال‌سازی پروتئین و تغییر در ژنوم شوند (۱٤). 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 داروئی سبب انجام پژوهش حاضر است. هدف از این مطالعه سنتز سبز نانوذرات نقره و بررسی اثرات ضد بیوفیلمی ژن‌های *lux*، *sug* و *mrkA* بر روی ایزولههای بالینی کلبسیلا پنومونیه است. تولید بیوفیلم و توانایی اتصال به بافت‌های میزبان در کلبسیلا پنومونیه توسط ژن‌های مختلفی مانند *mrkA*، *sug* و *lux* کنترل میشوند را مورد ارزیابی قرار گرفت

مواد و روش کار

نمونه‌گیری و ایزولاسیون میکروبی: در این مطالعه توصیفی – مقطعی تعداد ٦۰ 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 درمحیط‌های کشت TSI، SIM، MR–VP، سیمون سیترات، اورهآز (شرکت مرک آلمان) باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه جداسازی و تایید 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 شیشه‌ای نگهداری شدند. از پودر تهیه شده برای عصارهگیری اتانولی با استفاده از روش ماسراسیون استفاده شد. عصاره به‌دست‌آمده توسط کاغذ صافی (واتمن ٤۲، آلمان) فیلتر شد و عصاره اتانولی حاصل برای آزمایش‌های بعدی در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شد (۱٦).

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 غلظت۰/۰۰۱ mM از نیترات نقره (مرک، آلمان) تحت شرایط دمایی ٦۰ 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 UV۲۵۵۰ 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 شستوشوی 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 جمع آوری شد(۱٦).

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 ٤۵ 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 ایکس۱ XRD برای نانوذرات نقره به‌منظور تعیین ساختار کریستالوگرافی نانوذرات با استفاده از دستگاه پراش پرتو ایـــکس مدل PW ۱۷۳۰، تحت تابش Cu–Kα (λ°=۱/٥٤۰٥٦A)، در

1 X-ray powderdiffraction

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

ولتاژ ٤٠ کیلوولت و جریان۳۰ میلیآمپر انجام گرفت. محدوده اسکن ۲θ از۱۰-۸۰ 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 فوریر۱(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 سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد بیوفیلم، سویه‌ها بر روی محیط کشت کنگورد آگار(مرک – آلمان) کشت داده شدند و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس به مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. کلنیهای سیاه‌رنگ به‌عنوان سویه‌های مولد بیوفیلم و کلنی‌های قرمز روشن به‌عنوان سویه‌های فاقد قدرت بیوفیلم شناسایی شدند (۱۸).

تست تشخیص بیوفیلم به روش میکروپلیت ۹٦ خانه ای : جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) (کیولب، کانادا) رشد کردند. سپس۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری از محیط بالا به چاهک‌های میکروپلیت ۹٦ خانه پلیاستیرنی اضافه شد؛ که قبلاً ۱۸۰ میکرولیتر TSB افزوده و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. کریستال ویوله ۱/۰ درصد (CV) به مدت ۵ دقیقه برای رنگآمیزی پلیتها استفاده شد. سپس چاهکها شسته و خشک شدند و به‌منظور سنجش میزان رنگ متصل شده که نمایانکننده میزان بیوفیلم بود، ۲۰۰ میلیلیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری (OD) در محدوده ٦۳۰ نانومتر با دستگاه الایزا (BioTek, USA) با ۳ تکرار اندازه‌گیری شد.

ODc به‌عنوان سه انحراف معیار بیشتر از میانگین OD کنترل منفی تعیین شد. چهار گروه برای طبقه‌بندی نتایج در نظر گرفته شدند که از جمله باکتری‌های متصل نشده (ODc OD≤) باکتری‌های با اتصال ضعیف (۲≤ ODc <OD)، باکتری‌های با اتصال متوسط (۲×ODc OD <OD≤٤×ODc) و در نهایت باکتری‌های با اتصال قوی (۴×ODc <OD) است (۱۸).

تعیین الگوی مقاومتی کلبسیلا پنومونیه باتوجه‌به معیارهای استاندارد CLSI ۲۰۱۹ گزارش شد، و بر اساس قطر هاله عدم رشد، سویه‌ها به ۳ گروه مقاوم، حساس و نیمه حساس تقسیم‌بندی شدند. در این پژوهش از شش آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، ایران) سفتازیدیم (۳۰ mg)، سیپروفلوکساسین (۵ mg)، ایـــمیپنم (۱۰ mg)، سفتریاکسون (۳۰ mg)، سفوکسیتین (۳۰ mg)، سفوتاکسیم (۳۰ mg) و نالیدیکسیک اسید (۳۰ mg) به روش دیسک دیفیوژن بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد که تأثیر ضدمیکروبی آنتی بیونیک‌های فوق به روش دیسک دیفیوژن آگار ارزیابی شد (۱۸).

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

مالتیپلکس PCR یکی از روش‌های تغییریافته واکنش زنجیرهای پلیمراز PCR است که در آن چند جایگاه ژنی مورد بررسی قرار می‌گیرد و با استفاده از پرایمرهای مختلف می‌توان چندین جایگاه را مورد بررسی قرار داد و از چندین جفت پرایمر اختصاصی جهت تکثیر استفاده می‌شود. پس از تأیید باکتری کلبسیلا پنومونیه، نهایتاً تعداد ۳٦ ایزوله مولد بیوفیلم جهت استخراج DNA و انجام PCR جداسازی شد. در این آزمایش از سویه کلبسیلا پنومونیه ATCC۷۰۰٦۰۳ به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تکثیر ژن‌های *sugE*، *mrkD* و *luxS* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) و به روش واکنش زنجیرهای پلیمراز انجام شد. اختصاصی بودن پرایمرها توسط primer–blast به آدرس tools/primer–blasthttp://www.ncbi.nih.gov ارزیـــابی که ساختار ثانویه پرایمرها توسط نرم افزار oligo analyzer تأیید شد.

آماده‌کردن 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 ۵۰۰UTaq DNA polymerase با حجم ۰/۸ میکرولیتر و برای رقیق کردن از بافر ۱۰xPCR به حجم ۲/۵ میکرولیتر کاربرد دارد. از ۵۰ MgCl۲ میلی‌مولار به حجم ۰/۸ میکرولیتر و محلول ۱۰mM dNTP به‌اندازه ۱/۵میکرولیتر که نهایتاً از آب مقطر استریل تزریقی برای رقیق‌شدن ٦/٤ میکرولیتر بکار رفت.

برنامه‌ریزی دستگاه ترموسایکلر برای مالتی‌پلکس PCR برای ژن‌های *sugE*، *mrkD* و *luxS* مطابق برنامه زیر تنظیم گردید. در پایان، DNA حاصل از تکثیر توسط واکنش PCR، به‌منظور آنالیز کیفی بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. تکثیر قطعه‌های موردنظر در دستگاه

1 Fourier Transform Infrared Spectroscopy

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

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

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

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

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

به‌منظور مقایسه کمی و میزان بیان ژن‌های *sugE*، *mrkD* و *luxS* بررسی بیان ژن موردنظر به روش Real Time– PCR انجام شد. در این مطالعه از ژن ۱۶srRNA 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 *sugE*، *mrkD* و *luxS* آنالیز Real time–PCR انجام شد. در این مطالعه از ژن *۱۶srRNA* 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 موردمطالعه، 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 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 سایبر 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 ABI** ۷۳۰۰ **Biosystems**) رسم منحنی ذوب به وسیله اندازه گیری تغییرات میزان فلورسانس در زمانهای مختلف در طیف حرارتی ۶۰–۹۵ درجه سانتیگراد صورت گرفت.

مفهوم **Fold change** و نحوه محاسبه دلتا دلتا **Ct** (ΔΔCt) در **Real time** : در واکنش ریل تایم هنگامی‌که 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

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

"چندبرابر" است، به‌عبارت‌دیگر بیان ژن موردنظر در نمونه‌های کنترل نسبت به تیمارهای مختلف چندبرابر افزایش و یا کاهش‌یافته است.

روش تحلیل آماری: تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS۲۲ مورد تجزیه آماری قرار گرفت. آزمون واریانس یک‌طرفه One-way ANOVA جهت مقایسه تفاوت معنی‌دار مقادیر به‌دست‌آمده از بیان ژن موردنظر در سطح آماری ۵ درصد و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) استفاده شد. نتایج به‌صورت Mean ± SD گزارش و $p < ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

در ایـــن مطالعه توصیفی – مقطعی از تعداد ۶۰ نمونهای که از 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 به‌عنوان کلبسیلا پنومونیه تأیید شدند.

نتایج تست فنوتیپی بیوفیلم: در این مطالعه، از محیط کشت کنگورد آگار برای بررسی فنوتیپی بیوفیلم استفاده شد. باکتری‌های بیوفیلم مثبت کلنیهای مشکی رنگ تولید میکنند درصورتی‌که باکتری‌های فاقد بیوفیلم به همان حالت اولیه یعنی قرمزرنگ باقی میمانند. از میان ۳۶ سویه بالینی کلبسیلا پنومونیه، تمامی سویه‌ها از نظر تست فنوتیپی بیوفیلم مثبت بودند.

نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی: طبق دستورالعمل CLSI ۲۰۱۹، نتایج تست حساسیت میکروبی نشان داد که سویه کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده دارای مقاومت آنتیبیوتیکی متنوعی بوده و بیش از ۸۵ درصد سویه‌ها مقاومت به چند دارو (MDR) را از خود نشان دادند (جدول ۲).

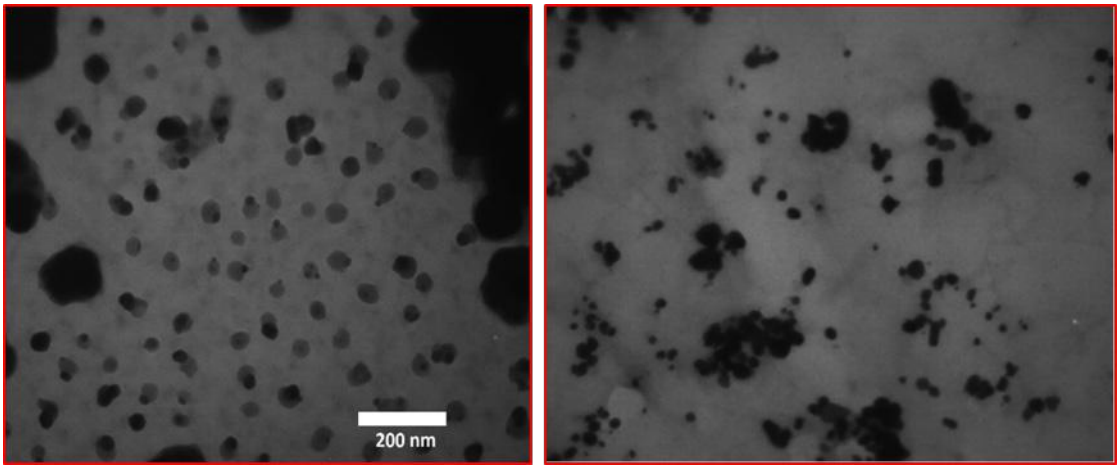
جدول ۲- نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری کلبسیلا پنومونیه

آنتی‌بیوتیک	مقاوم	نیمه حساس	حساس
سفتریاکسون 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)
سفوتاکسیم 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)
سفوکسیتین FOX (30µg)	۳۴ (۹۴/۴۴ درصد)	۱ (۲/۷۷ درصد)	۱ (۲/۷۷ درصد)

آنالیز **TEM** : به‌منظور بررسی و آنالیز ریخت‌شناسی 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 سیاه‌رنگ، دارای میانگین سایز ۶۰ نانومتر با انحراف معیار ۵ نانومتر بود(شکل ۱).

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]



شکل ۱- آنالیز دستگاهی TEM نانوذره نقره سنتز شده

آنالیز **DLS** یا تفرق نور پویا (**Dynamic light scattering**)

نانوذرات نقره با استفاده از پراکندگی دینامیک نوری مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج قابل‌مشاهده در نمودار ۱، نانوذرات سنتز شده دارای قطر ۱۰٦٤ نانومتر بودند که نشان‌دهنده سنتز هیدرودینامیکی ذرات در ابعاد نانو است. شاخص توزیع ذرات ۰/۸۵۸ بود که نشان‌دهنده توزیع یکنواخت اندازه نانوذرات است و بیانگر همگونی خوب نانورذرات نقره بود.

بر اساس نتایج قابل‌مشاهده در نمودار ۲، نانوذرات سنتز شده دارای قطر ۲۱۷۷/۲ نانومتر بودند که نشان‌دهنده سنتز هیدرودینامیکی ذرات در ابعاد نانو است. شاخص توزیع ذرات ۱/۲۰۰ بود که نشان‌دهنده توزیع یکنواخت اندازه نانوذرات است و بیانگر همگونی خوب نانورذرات نقره بود. آنالیزهای DLS و TEM نشان می‌دهند که نانوذرات نقره غالباً کروی شکل بوده و اندازه آنها در محدوده ۴۰-۲۰ نانومتر می‌باشند.

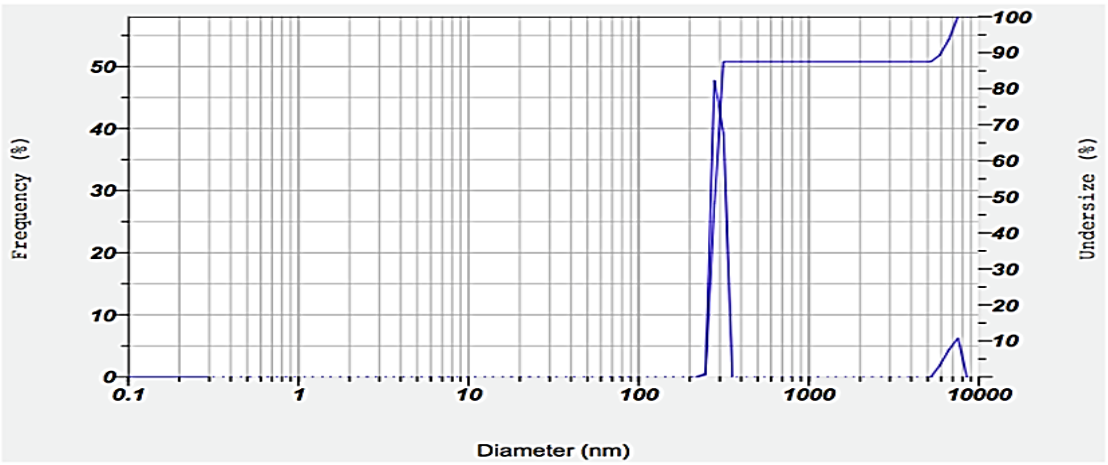
Calculation Results

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 : 626.7 nm

PI : 0.858



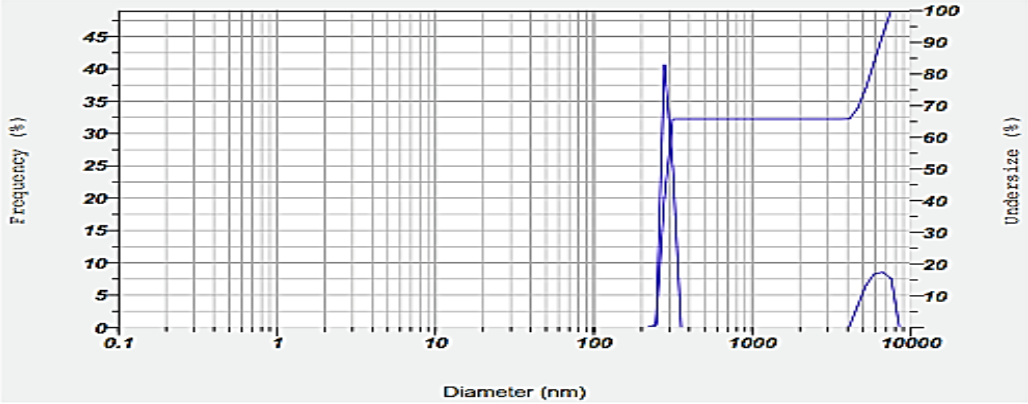
[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

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	--- nm
Total	1.00	2177.2 nm	2686.0 nm	272.2 nm

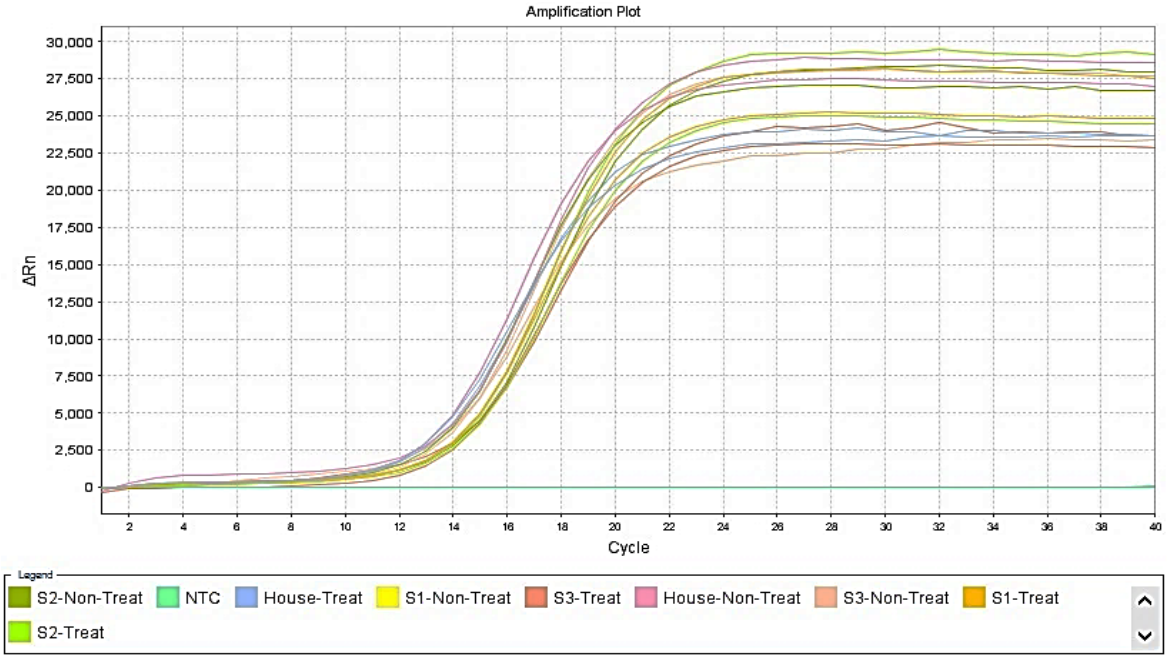
Cumulant Operations

Z-Average : 602.1 nm
PI : 1.002



نمودار ۱ و۲- بررسی قطر هیدرودینامیکی نانوذرات سنتز شده به روش DLS

بررسی بیان ژن با استفاده از تکنیک **Real time-PCR** : نمودار (۳) هر یک عدد تغییر در CT نشان‌دهنده دو برابر بودن تعداد مولکول‌های هدف در آغاز واکنش است. هرچه میزان CT یــک ژن کمتر باشد میزان بیان ژن بیشتر است.



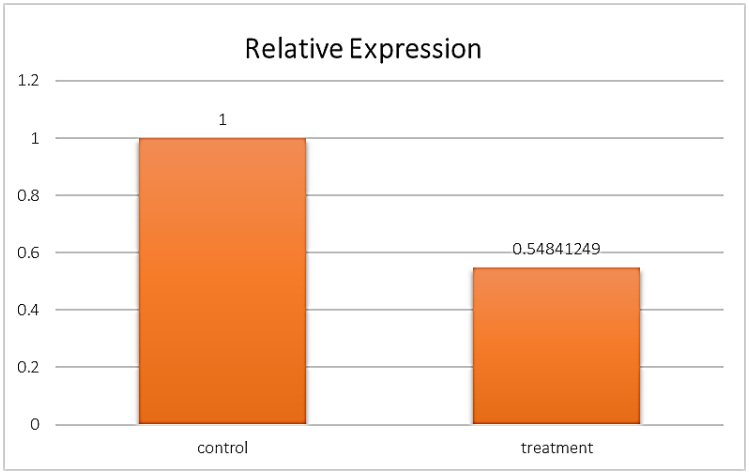
نمودار ۳- نمودار منحنی تکثیر ژن *sugE*، *mrkD* و *luxS*

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]

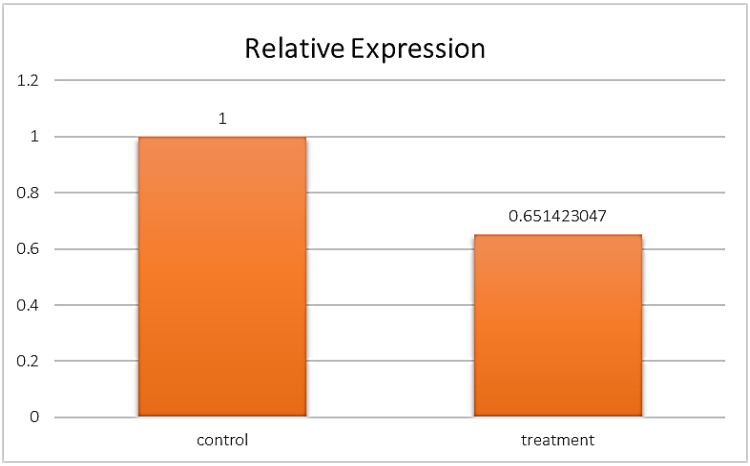
[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

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

مطابق نمودارهای زیر ٤ تا ٦ آنالیز دادهها نشان داد، بیان ژنهای *mrkD*، *sugE* و *luxS* درسلولهای تیمار شده با نانوذره نقره نسبت به گروه کنترل کاهش قابل توجهی داشته است، که نشان دهنده تأثیر بالای نانوذره درکاهش بیان ژنهای *sugE*، *mrkD* و *luxS* سلولهای میکروارگانیسم کلبسیلا پنومونیه تیمار شده با نانوذره نقره میباشد. در سلولهای تیمار شده با نانوذره نقره بیان ژنهای *sugE*، *mrkD* و *luxS* به ترتیب ۳۵/٤٦ و ۵۳ درصد کاهش داشته است.



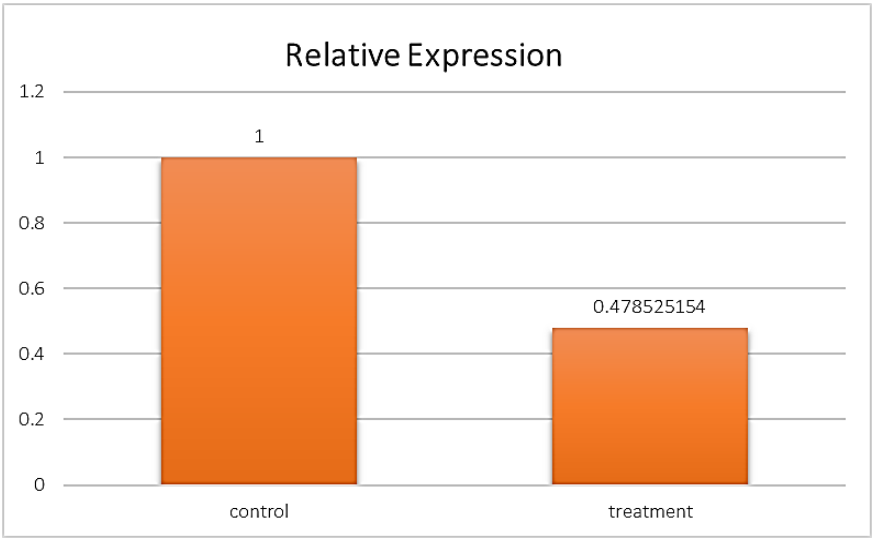
نمودار ٤- بیان ژن *mrkD* با استفاده از تکنیک Real time-PCR در سویه کلبسیلا پنومونیه



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

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]



نمودار ٦- بیان ژن *luxS* با استفاده از تکنیک Real time-PCR در سویه کلبسیلا پنومونیه

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

مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد ($p\leq ۰,۰۵$) انجام شد. مطابق داده‌های آنالیز واریانس ژن های *mrkD*، *sugE* و *luxS* در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه، میانگین داده‌ها در بیان ژن در سلول‌های تیمار شده با نانوذره نقره معنی دار بوده، مقدار P-value برای ژن‌های *sugE*، *mrkD* و *luxS* برابر ۰/۰۰۲۴۸۰۹۰۱، ۰/۰۰۶۱۰۹۶۲۸ و ۰/۰۰۳۸۱۷۶۸ به ترتیب به دست آمد. در این ژن‌ها مقدار P<۰/۰۵ در سلول‌های تیمار شده با نانوذره نقره به دست آمد که نشان دهنده تأثیر این نانوذره در کاهش بیان ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش می‌باشد.

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*

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

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
ΔΔCT Method				
Name		ΔCT	ΔΔCT	Fold change
Sample 1 Treat		1.49	0.585	0.666849339
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	-0.12833333	
Avg Fold change		0.651575		
T-Test				
P-value		Significant or Not		
0.006109628		Significant		

جدول ٤- 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
ΔΔCT Method				
Name		ΔCT	ΔΔCT	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	-0.09166667	
Sample 2 Non-Treat		0.205	0.118333333	
Sample 3 Non-Treat		0.06	-0.02666667	
Avg Fold change		0.481595		
T-Test				
P-value		Significant or Not		
0.00381768		Significant		

جدول ٥- آنالیز داده های Real time-PCR ژن *luxS*

بحث

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 چندداروییِ 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 ایمیپنم (۶۹/۴۴ درصد) گزارش شد.

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

در مطالعه شیوایی و همکاران در سال ۲۰۱۹، ایـــزوله‌های کلبسیلا پنومونیه به‌دست‌آمده از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های مطهری و میلاد تهران با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. بیشترین مقاومت نسبت به سفتازیدیم و 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 بیوفیلم دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالاتری نسبت

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]
[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

به جدایه‌های غیر تولیدکننده بیوفیلم هستند. شاید تفاوت میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در بین مطالعات گذشته به دلیل تفاوت در غلظت اولیه باکتری و یا بیان فاکتورهای اتصالی اولیه باکتری در تولید بیوفیلم و یا منبع نمونه‌ها و مکان‌های جغرافیایی مختلف باشد. پس از افزایش پدیده مقاومت چنددارویی در باکتری‌های مختلف، خصوصیات آنتی‌باکتریال نانوذرات فلزی یکی از مهم‌ترین زمینه‌های 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 ضدمیکروبی معناداری است (۲۳).

تولید بیوفیلم و ایجاد مقاومت‌های دارویی در سویه‌های باکتریایی به‌خصوص کلبسیلا پنومونیه یکی از معضلات اخیر و موردتوجه محققان در سرتاسر دنیا است. استفاده از گیاهان برای تولید نانوذرات نقره به‌عنوان منابع تجدیدپذیر و ارزان جهت تهیه نانومواد زیستی موردتوجه خاصی قرار گرفته است (۲٤). ازاین‌رو، پژوهش حاضر باهدف بررسی سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از گیاه سیر و بررسی تأثیرات آن بر روی بیان ژن‌های بیوفیلمی در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه برای اولینبار 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 میکرودایلوشن موردمطالعه قرار دادند و نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره نقره دارای خاصیت ضدباکتریایی است (۲۵). نتایج تست‌های ضدمیکروبی در پژوهش حاضر نشان داد که نانوذرات نقره دارای اثرات ضدمیکروبی بر روی تمام سویه‌های مولد بیوفیلم داشت به‌طوری که نانوذرات نقره سنتز شده از غلظت ٦/۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر خاصیت میکروب‌کشی داشتند.

در مطالعه صدیقی و همکاران در سال ۲۰۲۰، نشان داده شد که حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره بر علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه ۲۵/٦ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر است و درحالی‌که مقدار MBC آن‌ها ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد که با پژوهش حاضر مطابقت دارد (۲٦). تفاوت در میزان MIC در مطالعات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت در روش‌های آماده‌سازی نانوذرات، اندازه نانوذره و تفاوت در سوش‌های باکتریایی موردمطالعه باشد. حساسیت باکتری‌ها به نانوذرات فقط به ساختار دیواره سلولی مربوط نمی‌شود، بلکه ممکن است به پراکسیداسیون چربی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن نیز مربوط باشد.

همچنین، نتایج بررسی بیان ژن‌های بیوفیلمی توسط روش Real time PCR نشان داد که نانوذرات نقره هنگامی که سویه‌ها تحت‌تأثیر نانوذره نقره در غلظت زیر حد مهارکنندگی قرار می‌گیرند توانایی تشکیل بیوفیلم را ندارند؛ زیرا هر سه ژن *sugE*، *mrkD* و *luxS* کاهش معنی‌داری را نشان دادند؛ بنابراین هنگامی‌که سویه‌ها در مجاورت نانوذره نقره قرار می‌گیرند، از تولید اگزوپلی‌ساکارید در این سویه‌ها ممانعت می‌شود و ارگانیسم نمی‌تواند بیوفیلم تشکیل دهد. باتوجه‌به مهار بیان ژن بیوفیلم می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات نقره می‌توانند جایگزین مناسبی جهت ازبین‌بردن بیوفیلم در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد نانوذرات نقره سنتز شده کروی و با میانگین اندازه ٦۰/۱۷ نانومتر هستند. نانوذرات نقره تشکیل بیوفیلم را در سویه‌های MDR کلبسیلا پنومونیه مهار می‌کنند و بیان ژن‌های *mrkA* و *LuxS* پس از تیمار با حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی نانوذره نقره به طور قابل‌توجهی در این سویه‌ها کاهش می‌یابد (۲۷) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. فعالیت ضدباکتری نانوذرات نقره سنتز شده با چندین داروی آنتی‌بیوتیک به‌عنوان کنترل مقایسه شد. روش سنتزی پیشنهادی دوستدار محیط‌زیست 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 بیوفیلم بودند که تمام سویه های تولیدکننده بیوفیلم دارای ژن های *ecpA*، *mrkA*، *fimD* و *fimA* ۹۲ درصد آنها حاوی ژن *fimH* بودند (۲۱) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

مکانیسم اصلی تأثیر نانوذرات نقره بر روی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه از طریق آسیب به DNA و پروتئین‌ها و تخریب دیواره سلولی است. مطالعات نشان دادند که نانوذرات نقره رفتار فوتوکاتالیستی دارند و می‌توانند رادیکال‌های سمی اکسیژن تولید کنند و منجر به ازبین‌رفتن غشای سلول باکتریایی شوند، درواقع یکپارچگی غشای سلول باکتری را مختل نموده و باعث کاهش سطح آب‌گریزی باکتری می‌شود و تنظیم رونویسی از ژن‌های مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد.

تمامی سویه‌های تحقیق حاضر از نظر تست فنوتیپی بیوفیلم مثبت بودند

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

و باکتری‌ها بر اساس توانایی تشکیل بیوفیلم به ۳ گروه قوی (۷۹ درصد)، متوسط (٦ 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 ۸٦/٦ نانومتر بود. نانوذره نقره سبز سنتز شده بر روی تمامی جدایه‌های مورد مطالعه خاصیت ضدباکتریایی داشت و کمترین غلظت MIC و بیشترین مقدار برابر با ٦/۲۵ 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* هرکدام ۲۳ جدایه (٦۳/۸۸ درصد) بوده و تعداد ۲۳ جدایه (٦۸/۸۸ درصد) به‌طور همزمان دارای هر سه ژن می باشند. بیان ژنهای *sugE*، *mrkD* و *luxS* در باکتریهای تیمار شده با نانوذره نقره نسبت به گروه کنترل کاهش قابل توجهی داشتند.

تشکر و قدردانی

ایـــن مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد به شماره پژوهشی ۱۲۳۲۹۲۵۹٦۲۰٦۱۹٦۱٤۰۱۱٦۲۵۸۹۷٤۸ 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 داده ها

امیر میرزایی: طرح اصلی موضوع و ویرایش مقاله

کامبیز لاریجانی: آنالیز آماری و نگارش مقاله

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Sanzari I, Leone A, Ambrosone A. Nanotechnology in plant science: to make a long story short. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2019;7:120.
8. 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.
9. 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.
10. 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

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

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. Kavoosi 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 Antibiogram 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.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]

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.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOI: 10.61186/aums.14.1.1]