Investigating the Effects of Iron Oxide Nanoparticles on the Expression of Biofilm Production Genes and Antibiotic Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Strains

Shirin Masoudian
Department of Microbiology, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran, sh.massoudian@gmail.com
Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
Farzaneh Hosseini*
Department of Microbiology, College of Bioscience, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, farzaneh953@yahoo.com
Kumarss Amini
Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran, dr_kumarss_amini@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Klebsiella pneumoniae* is a human opportunistic pathogen. Biofilm formation is one of the important properties of this bacteria that leads to the development of multidrug-resistant phenotypes. In recent years, Nanoparticle Technology (NP) has been an important field in a wide range of studies. In this study, the effects of chemical nanoparticles on biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* were investigated.

Materials and methods: Overall, 340 samples from patients were collected from different hospitals in Tehran. Colonies were tested to identify bacteria based on standard techniques. In each bacterium, the presence of important biofilm formation genes in *Klebsiella pneumoniae* was detected by Multiplex PCR and their expression levels were analyzed using the Real-time PCR method. The effect of chemical nanoparticles of iron oxide on biofilm formation and antibiotic resistance was also investigated.

Results: Sixty isolates of *Klebsiella pneumoniae* were identified based on standard techniques. The results showed that both types of iron oxide nanoparticles had a significant effect on inhibiting the formation of biofilm and antibiotic resistance of this bacterium ($p < 0.001$). In addition, the combination of iron oxide nanoparticles and ciprofloxacin had significant antimicrobial effects compared to other compounds ($p < 0.001$).

Discussion and conclusion: The formation of biofilm and the antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolates were effectively inhibited in response to iron oxide nanoparticles. The results could be useful in controlling multiple drug-resistant infections in hospitalized patients.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, Nanoparticles, Biofilm

* Corresponding author
Received: May 20, 2020 / **Accepted:** December 1, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)
سال دهم، شماره ۳۸، تابستان ۱۴۰۰، صفحه ۱۷ - ۲۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۳۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۱۱
Doi: 10.22108/BJM.2020.123026.1300

بررسی اثر نانوذرات اکسید آهن بر بیان ژن‌های تولید بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه*

شیرین مسعودیان: ۱-دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، پردیس علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران، sh.massoudian@gmail.com
۲-گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
فرزانه حسینی *: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، farzaneh953@yahoo.com
کیومرث امینی: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران، dr_kumarss_amini@yahoo.com

چکیده

مقدمه: *کلبسیلا پنومونیه* یک پاتوژن فرصت‌طلب انسانی است. تشکیل بیوفیلم، یکی از خواص مهم این باکتری است که به ایجاد فنوتیپ‌هایی با مقاومت دارویی چندگانه منجر می‌شود. در سال‌های اخیر، فناوری نانوذرات (NP) یکی از زمینه‌های مهم در طیف گسترده‌ای از مطالعات بوده است. در این مطالعه، اثرات نانوذرات زیستی و شیمیایی بر تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *کلبسیلا پنومونیه* بررسی شد.

مواد و روش‌ها: درمجموع، ۳۴۰ نمونه از بیماران در بیمارستان‌های مختلف شهر تهران جمع‌آوری شد. کلنی‌ها برای شناسایی باکتری‌ها براساس تکنیک‌های استاندارد بررسی شدند. در هر باکتری، وجود ژن‌های مهم بروز بیوفیلم در *کلبسیلا پنومونیه* با Multiplex PCR تشخیص داده و سطح بیان آنها با استفاده از Real-time PCR تجزیه و تحلیل شد. همچنین، اثر نانوذرات شیمیایی اکسید آهن بر تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بررسی شد.

نتایج: ۶۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* براساس تکنیک‌های استاندارد شناسایی شدند. داده‌های ما نشان دادند هر دو نوع نانوذرات اکسید آهن اثر مهمی در مهار تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری دارد ($p<0.001$). همچنین، ترکیب دارویی نانوذرات اکسید آهن و سیپروفلوکسازین در مقایسه با سایر ترکیبات به‌صورت معنی‌داری اثرات ضدمیکروبی دارد ($p<0.001$).

بحث و نتیجه‌گیری: تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به‌طور مؤثر در واکنش به نانوذرات اکسید آهن مهار شدند. داده‌های ما در کنترل عفونت‌های مقاوم در برابر چندین دارو در بیماران بستری می‌توانند مفید باشند.

واژه‌های کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، نانوذرات، بیوفیلم

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه[1] یک باکتری گرم منفی، متعلق به خانوادهٔ *انتروباکتریاسه* است که به‌عنوان پاتوژن فرصت‌طلب انسانی باعث عفونت‌های شدید مانند عفونت دستگاه ادراری، مننژیت، پنومونی و سپتی‌سمی، به‌ویژه در بیماران بستری می‌شود (۱، ۲). به‌طور 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 (۳). یک بیوفیلم شامل چندین باکتری است که در سطح کلنیزه می‌شوند و با یکدیگر و با ماتریکس خارج سلولی تماس دارند و از پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، کربوهیدرات‌ها و سایر ماکرومولکول‌ها تشکیل شده است (۴). تنظیم ژنی تولید بیوفیلم بر عهدهٔ دسته‌ای از ژن‌های مهم است. ژن *mrkD* پروتئین ساختاری فیمبریه را کد می‌کند و در شروع اتصال باکتری به کاتتر برای تشکیل بیوفیلم مهم است (۱، ۳، ۵). ژن‌های *treC* و *sugE* با تنظیم پلی‌ساکارید کپسول که در شکل‌گیری بیوفیلم ضروری‌اند، بر تشکیل بیوفیلم اثر می‌گذارند (۶). 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 فرایند کروم سنسینگ و تشکیل بیوفیلم است (۷). در سال‌های اخیر، فناوری نانوذرات (NP[2]) یکی از زمینه‌های مهم در طیف گسترده‌ای از مطالعات بوده است. در مطالعات میکروبیولوژیکی، نانوذرات عملکردهای جالبی در مهار میکروارگانیسم‌های مختلف بیماری‌زا داشته‌اند. یکی از خصوصیات مهم نانوذرات، نسبت سطح به حجم‌شان است که به آنها اجازهٔ برقراری ارتباط با ذرات دیگر را می‌دهد (۸، ۹). به نظر می‌رسد ماهیت سمی و شیمیایی فلزات با این مکانیسم‌ها تغییر یافته و به ایجاد نانوذرات با خصوصیات مختلف فیزیکی، حرارتی، شیمیایی، مغناطیسی، اپتیکال و الکتریکی منجر شده است (۱۰، ۱۱). نانوذرات فلزی مانند نقره و طلا از نانوذرات مهمی‌اند که می‌توانند برای هر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی خواص ضدباکتری داشته باشند (۱۲، ۱۳). امروزه علاوه بر روش‌های شیمیایی، روش‌های زیستی برای تولید نانوذرات فلزی به‌عنوان روش‌های سبز غیرسمی توسعه یافته‌اند. انواع مختلف نانوذرات فلزی با خواص ویژه توسط بسیاری از باکتری‌ها، گیاهان و قارچ‌ها می‌توانند ساخته شوند (۱۴–۱۶). اکسیدهای آهن نوعی از اکسیدهای فلزی‌اند که در سیستم‌های ذخیرهٔ انرژی، تحریک سلول‌ها، کاتالیزورها و حامل‌های دارویی مفیدند (۱۷–۱۹). مگنتیت (Fe_3O_4) یکی از نانوذرات اکسید آهن است که توسط باکتری‌های مغناطیسی تولید می‌شود (۲۰، ۲۱). سویه‌های *باسیلوس سرئوس*[3] و *باسیلوس سوبتیلیس*[4] نیز نانوذرات مغناطیسی را در مقادیر زیاد تولید می‌کنند (۲۲، ۲۳).

مطالعهٔ حاضر بر آن بوده است تا اثرات نانوذرات اکسید آهن را بر تشکیل بیوفیلم جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* در نمونه‌های بالینی مختلف تعیین کند.

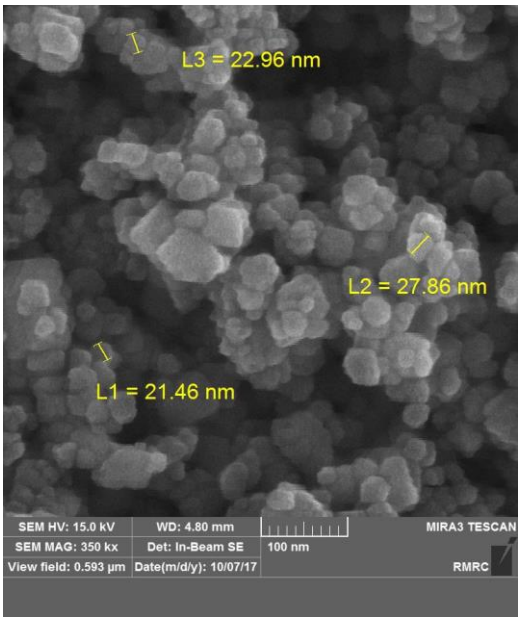
مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری‌های کشت‌شده: درمجموع، ۳۴۰ نمونهٔ بالینی از بیماران در بیمارستان‌های مختلف تهران جمع‌آوری شد. نمونه‌های بالینی شامل سواب زخم، ادرار، خلط و خون، با سیستم انتقالی کری

– بلیر به محیط کشت منتقل شدند. شناسایی باکتری‌ها براساس تکنیک‌های استاندارد انجام شد (۲۴، ۲۵). رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اندول و اوره‌آز، استفاده از سیترات، آزمایش‌های بیوشیمیایی در محیط اکسیداسیون و تخمیر (محیط OF) و اکسیداسیون گلوکز در محیط کشت کریگلر آیرون آگار (کیولب، کانادا) Krigler Iron Agar (KIA) برای شناسایی کلنی‌های باکتری استفاده شدند. سپس توالی 16srRNA کلنی‌های جداشده بررسی شد.

آزمایش حساسیت ضدمیکروبی: جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* برای حساسیت ضدمیکروبی با استفاده از روش انتشار دیسک (تکنیک کربی – بایر) بررسی شدند. برای آزمایش حساسیت از دیسک‌های ضدمیکروبی (پادتن طب، ایران) شامل سیپروفلوکساسین (۵ میلی‌گرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم) و سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) استفاده شد.

تعیین MIC نانوذرات اکسید آهن: نانوذرات اکسید آهن با اندازهٔ ۴۰ نانومتری به‌صورت تجاری (مرک، آمریکا) تهیه شدند و تصویر SEM آنها تهیه شد (شکل ۱). برای شناسایی حداقل غلظت‌های مهارکننده (MICs)، روش میکروتیتر پلیت براساس روش استاندارد پیشنهادی توسط کمیتهٔ استانداردهای آزمایشگاه‌های بالینی (CLSI) استفاده شد. تکنیک انتشار دیسک برای به دست آوردن بهترین غلظت نانوذره برای آزمایش MIC انجام شد و نتایج به‌صورت هالهٔ عدم رشد با استفاده از نانوذرهٔ آماده‌شده نشان داده شدند. تمام چاهک‌ها در پلیت میکروتیتر با ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث استریل پر شدند. رقت سریالی نانوذره در پلیت میکروتیتر، تهیه (به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذره با غلظت ۲۰۴۸ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد) و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند به هر چاهک اضافه شد. پلیت میکروتیتر در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. MIC به‌عنوان حداقل غلظت نانوذرات تعریف شد که از رشد ارگانیسم‌ها (*کلبسیلا پنومونیه*) در محیط کشت ممانعت می‌کند.



شکل ۱– عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی از نمونهٔ نانوذرات مغناطیسی آهن Fe_3O_4 خریداری‌شده در مقیاس ۱۰۰ نانومتر

تشخیص بیوفیلم: جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) (کیولب، کانادا) رشد کردند. کلنی‌ها برای تشکیل غلظت ۰/۵ مک‌فارلند رقیق شدند. بعد از آن، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانهٔ پلی‌استیرنی اضافه شد

که قبلا ۱۸۰ میکرولیتر TSB داشتند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. چاهک‌ها با محلول بافر فسفات (PBS) سه بار شسته شدند تا سلول‌های متصل‌نشده حذف شوند و سپس در حالت معکوس خشک و با متانول تثبیت شدند. کریستال ویوله ۰/۱ درصد (CV) به مدت ۵ دقیقه برای رنگ‌آمیزی پلیت‌ها استفاده شد. بعد از آن، چاهک‌ها یک بار دیگر شسته و خشک شدند. به‌منظور سنجش میزان رنگ متصل‌شده که نمایان‌کنندهٔ میزان بیوفیلم بود، ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری (OD) در محدودهٔ ۶۳۰ 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؛ ازجمله باکتری‌های متصل‌نشده (OD ≤ ODc)، باکتری‌های با اتصال ضعیف (ODc <OD ≤ 2 × ODc)، باکتری‌های با اتصال متوسط (۲ × ODc <OD ≤ 4 × ODc) و درنهایت، باکتری‌های با اتصال قوی (۴ × ODc <OD).

بررسی ژنتیکی: DNA با استفاده از کیت (پیشگامان، ایران) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. ژن‌های هدف با PCR چندگانه تکثیر شدند. پرایمرها با نرم‌افزار Gene Runner طراحی شدند (جدول ۱). PCR چندگانه با استفاده از مستر میکس (آمپلیکون، دانمارک) و دستگاه PCR (Bio-Rad، آمریکا) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر محلول کاری ۲X، ۴ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۶ میکرولیتر پرایمر و ۲/۱ میکرولیتر آب، به حجم کلی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. شرایط دمایی PCR به شرح زیر تنظیم شد: ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه (مرحلهٔ تقلیب اولیه)، ۳۵ چرخه به‌صورت ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه (مرحلهٔ تقلیب)، ۵۸ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه (مرحلهٔ اتصال پرایمرها)، ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه (مرحلهٔ طویل‌سازی) و سپس ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (مرحلهٔ طویل‌سازی نهایی). الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد برای تشخیص تکثیر ژن در نمونه‌ها، انجام و تصویر با دستگاه UV ترانس‌لومیناتور (آمریکا) گرفته شد.

پروتکل استخراج RNA و سنتز DNA مکمل (cDNA): برای استخراج RNA از کیت استخراج RNA سینا پیور با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. خلوص RNA استخراج‌شده نیز با دستگاه نانودراپ (2000c ,Thermo Fisher Scientific, USA)، ارزیابی و درنهایت، cDNA با استفاده از کیت 2-Steps RT-PCR (ویوانتیس- مالزی) طبق دستورالعمل‌های تولیدکننده ساخته شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای رفت و برگشت استفاده‌شده در PCR و real-time PCR

نام پرایمر	فوروارد (۳'- ۵')	ریورس (۳'- ۵')	طول محصول (bp)
MrkD	ACACCACCAACTATTCCCTCG	ATGGAACCCACATCGACATTC	۲۲۹
TreC	GTATCGTGCTGGATATGGTGC	TCACGGTAATCGCTGATGCTG	۸۵۶
SugE	TGGTTCCCAGCGTTATCACCA	TCACGATACAGACAAGGCTGG	۱۹۸
LuxS	ACTTACACCATGCACTCGCTG	CAGTTCGTCGTTGCTGTTGATG	۹۰
16S rRNA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	-

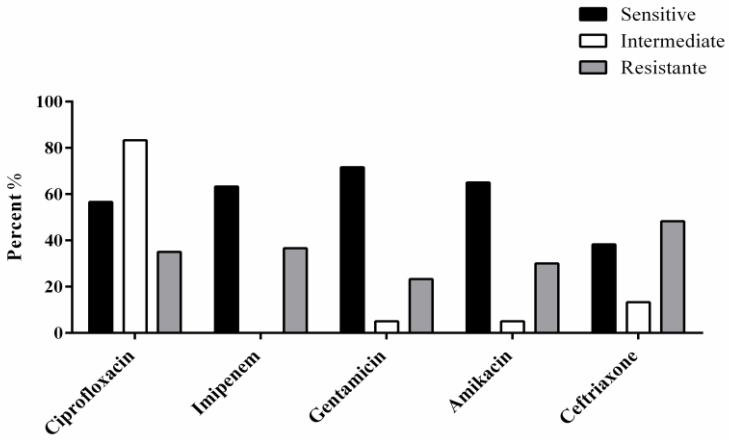
اندازه‌گیری سطح بیان ژن *luxS*: برای تجزیه و تحلیل سطح رونویسی ژن *luxS*، real-time PCR با استفاده از محلول کاری ۲X سایبر گرین، های راکس (امپلیکون – دانمارک) و دستگاه real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, USA) انجام شد. مخلوط واکنش حاوی ۱۰ میکرولیتر محلول کاری ۲X، ۱ میکرولیتر cDNA، ۲ میکرولیتر پرایمر (۱ میکرولیتر از هر پرایمر) و ۷ میکرولیتر آب عاری از RNase به حجم کل ۲۰ میکرولیتر بود. شرایط real-time PCR به این صورت تنظیم شد: ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه (مرحلهٔ تقلیب اولیه)، ۴۰ چرخه ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه (مرحلهٔ تقلیب)، ۵۶ درجهٔ سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه (مرحلهٔ اتصال پرایمرها) و ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (مرحلهٔ طویل‌سازی). برای اندازه‌گیری سطح بیان ژن *luxS*، از روش CT مقایسه‌ای استفاده شد (۲۶). سطح رونویسی ژن 16SrRNA به‌عنوان ژن خانه‌دار برای نرمال‌کردن سطوح کمی نسبی ژن *luxS* در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و برای ترسیم از برنامهٔ GraphPad Prism نسخهٔ ۷، استفاده و $p<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنادار آماری تعریف شد.

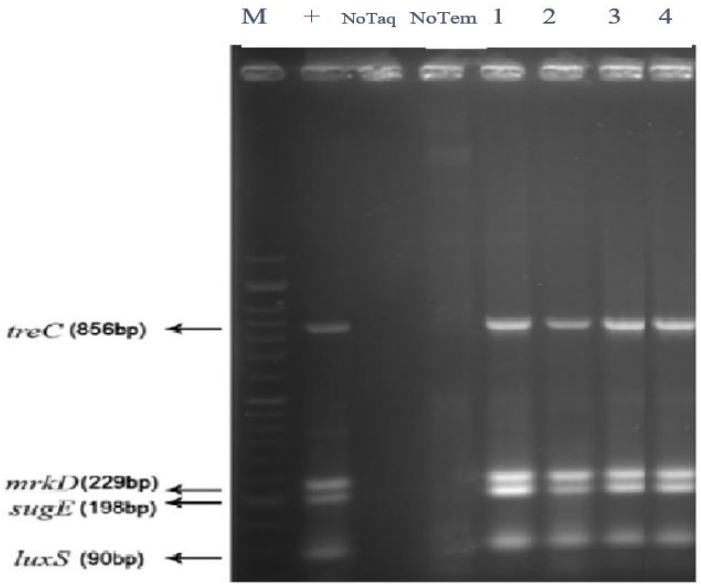
نتایج

جداسازی *کلبسیلا پنومونیه* و آزمایش حساسیت ضدمیکروبی: در این پژوهش از میان ۳۴۰ نمونه، ۶۰ سویه (۳۳ سویه از زنان و ۲۷ سویه از مردان) *کلبسیلا پنومونیه* از منابع مختلف بالینی جداسازی شدند. نمونه‌ها شامل ادرار (۵۷ درصد)، خلط (۲۱ درصد)، زخم (۱۳ درصد) و خون (۹ درصد) بودند. باکتری‌های جداشده کمترین مقاومت را به جنتامایسین (۲۳/۳۳ درصد) و بیشترین مقاومت را به سفتریاکسون (۴۸/۳۳ درصد) نشان دادند. جزئیات مقاومت در برابر تمام داروها در شکل ۲ نشان داده شده است.

بررسی حضور ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلم و ارتباط آنها با مقاومت آنتی‌بیوتیکی: حدود ۹۶/۶۶ درصد جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه*، ژن‌های *mrkD* و *treC* را دارند و به‌دنبال آن ۹۵ درصد و ۹۰ درصد از جدایه‌ها به‌ترتیب ژن‌های *luxS* و *sugE* را داشتند. داده‌ها نشان دادند حضور ژن *luxS* در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* فقط با مقاومت جنتامایسین رابطهٔ معنی‌داری داشت ($p<0.01$). همچنین، بین این ژن‌ها و تشکیل بیوفیلم رابطهٔ معنی‌داری دیده نشد. قطعات مشاهده‌شده روی ژل آگارز در شکل ۳ نشان داده شده‌اند.



شکل ۲- مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *کلبسیلا پنومونیه*



شکل ۳- قطعات PCR روی ژل آگارز. ستون ۱: لدر ۱۰۰ جفت‌بازی، ستون + کنترل مثبت (Template control)، ستون no taq control: ستون no template control، ستون‌های ۱ تا ۴ نمونه‌ها.

آزمایش حساسیت نانوذرات: با توجه به روش انتشار دیسک، بهترین هاله مهار *کلبسیلا پنومونیه* در برابر نانوذرات شیمیایی اکسید آهن (۱۱/۰۸ میلی‌متر) با غلظت ۲۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (جدول ۲). MIC نانوذرات شیمیایی اکسید آهن برای جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* بر طبق پروتکل CLSI تفسیر شد. MIC به‌دست‌آمده شامل ۸۰/۲۸ ± ۱۳۶/۲۹ برای نانوذرات شیمیایی اکسید آهن بود.

تأثیر نانوذرات بر تشکیل بیوفیلم *کلبسیلا پنومونیه*: باکتری‌ها براساس توانایی تشکیل بیوفیلم توسط *کلبسیلا پنومونیه* به ۴ دسته تقسیم شدند: قوی (۲۶/۶۷ درصد)، متوسط (۴۰ درصد)، ضعیف (۱۵ درصد) و عدم تشکیل بیوفیلم (۱۸/۱۳ درصد). جدایه‌های تشکیل‌دهندهٔ بیوفیلم با نانوذرات شیمیایی اکسید آهن تحت‌تأثیر قرار گرفتند. تفاوت‌های چشمگیری در تشکیل بیوفیلم در این جدایه‌ها یافت شدند (جدول ۳).

جدول ۲- هاله عدم رشد *کلبسیلا پنومونیه*

نمونه (ترکیب نانوذرات و سیپروفلوکساسین)	هاله عدم رشد (میلی‌متر) انحراف معیار ± میانگین	(P)
سیپروفلوکساسین غلظت ۲۵۶ نانوذرهٔ شیمیایی+ سیپروفلوکساسین	۱۹/۳ ± ۵/۴۶۵۷۶ ۲۰/۶۸۳۳ ± ۵/۵۵۵۵۵	<۰/۰۰۱**
غلظت ۲۵۶ نانوذرهٔ شیمیایی+ سیپروفلوکساسین غلظت ۲۵۶ نانوذرهٔ شیمیایی	۲۰/۶۸۳۳ ± ۵/۵۵۵۵۵ ۱۱/۰۸۹۳ ± ۱/۸۶۱۳۵	<۰/۰۰۱**
غلظت ۲۵۶ نانوذرهٔ شیمیایی سیپروفلوکساسین	۱۱/۰۸۹۳ ± ۱/۸۶۱۳۵ ۱۹/۳ ± ۵/۴۶۵۷۶	<۰/۰۰۱**

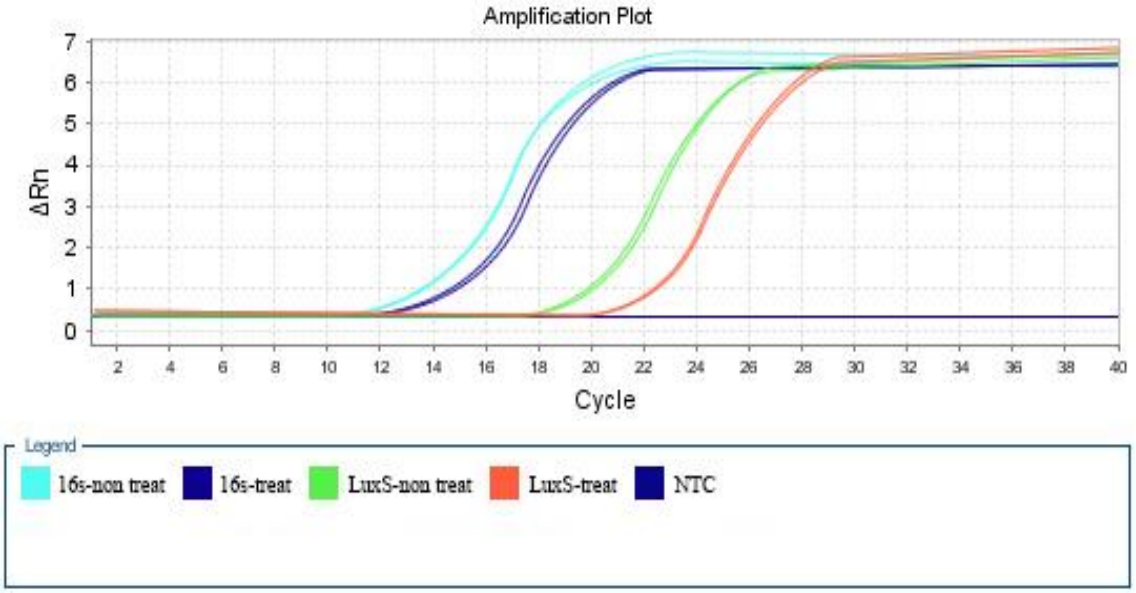
غلظت برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

(**) معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ است.

جدول ۳- درصد تشکیل بیوفیلم در حضور نانوذرهٔ شیمیایی با غلظت‌های متفاوت

توانایی تشکیل بیوفیلم	بدون نانو	۶۴ µg/ml	غلظت ۱۲۸ µg/ml	غلظت ۲۵۶ µg/ml
عدم اتصال	۱۸/۳۳ ٪	۳۰ ٪	۶۵ ٪	۸۶/۶۶ ٪
ضعیف	۱۵ ٪	۳۸/۳۳ ٪	۳۵ ٪	۱۳/۳۴ ٪
متوسط	۴۰ ٪	۳۱/۶۷ ٪	-	-
قوی	۲۶/۶۷ ٪	-	-	-

اثر نانوذرات بر سطح بیان ژن *luxS* در *کلبسیلا پنومونیه*: برای ارزیابی سطح بیان ژن *luxS*، یک جدایه با مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی و تشکیل بیوفیلم قوی انتخاب شد. مشخص شد سطح بیان ژن *luxS* با نانوذرات اکسید آهن ۱۸/۷۷ درصد کاهش یافته است که ازنظر آماری معنی‌دار تلقی می‌شود ($p<0.001$) (شکل ۴).



شکل ۴- نتایج Real–Time PCR برای ژن *luxS* در ایزولهٔ *کلبسیلا پنومونیه* تشکیل‌دهندهٔ بیوفیلم در حالت‌های تیمارشده (treat) و تیمارنشده (non treat) با نانوذرات اکسید آهن زیستی. ژن 16srRNA به‌عنوان ژن House-keeping استفاده شده است.

بحث

کلبسیلا پنومونیه یک پاتوژن فرصت‌طلب انسانی است که عفونت شدید در بیماران بستری‌شده ایجاد می‌کند و تهدید جهانی در سیستم مراقبت بهداشتی در نظر گرفته می‌شود (۱، ۲). یک مطالعهٔ قبلی نشان داده است مرگ‌ومیر ناشی از عفونت *کلبسیلا پنومونیه* حدود ۵۰ درصد در بیماران آلوده است و عمدتا به‌علت افزایش فنوتیپ‌های مقاومت چند دارویی به‌عنوان یک مسئله مهم در سیستم‌های مراقبت‌های بهداشتی تلقی می‌شود (۲۷).

پس از افزایش پدیدهٔ مقاومت چند دارویی در باکتری‌های مختلف، خصوصیات آنتی‌باکتریال

نانوذرات فلزی یکی از مهم‌ترین زمینه‌های مطالعات میکروبیولوژی شده است. نانوذرهٔ اکسید آهن یکی از نانوذرات فلزی است که به‌علت تولید رادیکال‌های اکسیژن، خواص آنتی‌بیوتیکی دارد که به شکستن رشتهٔ DNA، دپلیمریزه‌شدن پلی‌ساکارید، غیرفعال‌شدن آنزیم‌ها و پراکسیداسیون لیپید منجر می‌شود (۲۸).

در مطالعهٔ حاضر، ۶۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* حاصل از نمونه‌های مختلف بالینی تجزیه و تحلیل شدند که از بیمارستان‌ها جمع‌آوری شده بودند. حدود ۸۲ درصد از جدایه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند. تمامی جدایه‌ها برای حضور ژن‌های مرتبط در تشکیل بیوفیلم بررسی شدند. تقریبا بیش از ۹۰ درصد از جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* این ژن‌ها را داشتند که برای تشکیل بیوفیلم مهم‌اند. همچنین، نانوذرات اکسید آهن سطح بیان ژن *luxS* را به‌عنوان یک ژن مهم در تشکیل بیوفیلم *کلبسیلا پنومونیه* به‌صورت معنی‌داری کاهش دادند. در مطالعهٔ مشابهی ترابی و همکاران اثر ضدباکتریایی ترکیب نانوذرات MgO و Fe_2O_3 بر باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را در محیط مایع، ارزیابی و سپس اثر آنها را همزمان در آبمیوه‌های هویج، انار و سیب به‌صورت جداگانه به روش کلنی کانت بررسی کردند و نشان دادند اثر ترکیبی دو نانوذره باعث کاهش رشد هر دو باکتری می‌شود (۹). اثر ترکیبی از نانوذرات اکسید آهن و اکسید منیزیم باعث تخریب غشای سلولی و سپس نشت محتویات داخل سلولی و درنهایت، مرگ سلول‌های باکتریایی می‌شود؛ این اثر، مکانیسم اصلی ضدباکتریایی این نانوذرات است (۱۱-۱۰). با توجه به سایر مطالعات (۹-۱۲) به نظر می‌رسد فعالیت ضد بیان ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم نوع دیگری از اثرات این نانوذرات در روند فعالیت‌های ضدباکتریایی آنها باشد. در مطالعات دیگر کاهش اندازه و به‌دنبال آن، افزایش سطح مخصوص به‌عنوان عامل افزایش تعداد گروه‌های فعال روی سطح ذرات، مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر بر افزایش سمیت نانوذرات برشمرده شده‌اند. در مقایسه با سایر مطالعات (۹، ۲۲، ۲۳) می‌توان نتیجه گرفت نانوذرات ۴۰ نانومتری استفاده‌شده در این مطالعه از فعالیت ضدمیکروبی قوی برخوردارند.

داده‌های این مطالعه نشان دادند باوجود نیاز به بررسی‌های بیشتر دربارهٔ سمیت سلولی این ذرات، نانوذرات اکسید آهن می‌توانند برای کنترل عفونت در بیماران بستری، طراحی روش‌های جدید درمان برای جلوگیری از عفونت و کلونیزه‌شدن *کلبسیلا پنومونیه* و همچنین مهار سویه‌های مقاوم به چند دارو مفید باشند.

References

(1) Allen BL, Gerlach GF, Clegg S. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*. 1991; 173 (2): 916-20.

(2) Williams P, Tomas J. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Med Microbiol*. 1990; 1: 196-204.

(3) Jagnow J, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix-and collagen-coated surfaces. *Microbiology*. 2003; 149 (9): 2397-405.

(4) Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284 (5418): 1318-22.

(5) Jacobsen Sá, Stickler D, Mobley H, Shirtliff M. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical microbiology reviews*. 2008; 21 (1): 26-59.

(6) Wu MC, Lin TL, Hsieh PF, Yang HC, Wang JT. Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. *PloS one*. 2011; 6 (8): e23500.

(7) Zhu H, Liu HJ, Ning SJ, Gao YL. A luxS-dependent transcript profile of cell-to-cell communication in *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular bioSystems*. 2011; 7 (11): 3164-8.

(8) Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2010; 6 (2): 257-62.

(9) Torabi zarchi m, Mirhosseini M. Investigation of Combination Effect of Magnesium Oxide and Iron Oxide Nanoparticles on the Growth And Morphology of the Bacteria *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli* in Juice. *The Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2017; 24 (11): 924-37.

(10) Durán N, Marcato PD, De Souza GI, Alves OL, Esposito E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2007; 3 (2): 203-8.

(11) Husseiny MI, El-Aziz MA, Badr Y, Mahmoud MA. Biosynthesis of gold nanoparticles using Pseudomonas aeruginosa. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2007; 67 (3-4): 1003-6.

(12) Guzmán MG, Dille J, Godet S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *Int J Chem Biomol Eng*. 2009; 2 (3): 104-11.

(13) Lima E, Guerra R, Lara V, Guzmán A. Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Chemistry Central Journal*. 2013; 7 (1): 11.

(14) Suresh K, Prabagaran S, Sengupta S, Shivaji S. Bacillus indicus sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2004; 54 (4): 1369-75.

(15) Bhainsa KC, D'souza S. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2006; 47 (2): 160-4.

(16) Song JY, Kim BS. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2009; 32 (1): 79.

(17) Saif S, Tahir A, Chen Y. Green synthesis of iron nanoparticles and their environmental applications and implications. *Nanomaterials*. 2016; 6 (11): 209.

(18) Yin T, Wu H, Zhang Q, Gao G, Shapter JG, Shen Y, et al. In vivo targeted therapy of gastric tumors via the mechanical rotation of a flower-like Fe 3 O 4@ Au nanoprobe under an alternating magnetic field. *NPG Asia Materials*. 2017; 9 (7): e408.

(19) Zhang Q, Yin T, Xu R, Gao W, Zhao H, Shapter JG, et al. Large-scale immuno-magnetic cell sorting of T cells based on a self-designed high-throughput system for potential clinical application. *Nanoscale*. 2017; 9 (36): 13592-9.

(20) Blakemore R. Magnetotactic bacteria. *Science*. 1975; 190 (4212): 377-9.

(21) Zhang X, Yan S, Tyagi R, Surampalli R. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*. 2011; 82 (4): 489-94.

(22) Fatemi M, Mollania N, Momeni-Moghaddam M, Sadeghifar F. Extracellular biosynthesis of magnetic iron oxide nanoparticles by *Bacillus cereus* strain HMH1: Characterization and in vitro cytotoxicity analysis on MCF-7 and 3T3 cell lines. *Journal of biotechnology*. 2018; 270: 1-11.

(23) Sundaram PA, Augustine R, Kannan M.

Extracellular biosynthesis of iron oxide nanoparticles by *Bacillus subtilis* strains isolated from rhizosphere soil. *Biotechnology and bioprocess engineering*. 2012; 17 (4): 835-40.

(24) Nahar A, Anwar S, Saleh AA, Miah MRA. Isolation of Acinetobacter species and their antimicrobial resistance pattern in an Intensive Care Unit (ICU) of a tertiary care hospital in Dhaka, Bangladesh. Bangladesh *Journal of Medical Microbiology*. 2012; 6 (1): 3-6.

(25) Nahar A, Anwar S, Miah MRA. Association of biofilm formation with antimicrobial resistance among the *Acinetobacter* species in a tertiary care hospital in Bangladesh. *Journal of Medicine*. 2013; 14 (1): 28-32.

(26) Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. *Nat Protoc*. 2008; 3 (6): 1101-8.

(27) Borer A, Saidel-Odes L, Riesenberg K, Eskira S, Peled N, Nativ R, et al. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infection control and hospital epidemiology*. 2009; 30 (10): 972-6.

(28) Mohanraj V, Chen Y. Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*. 2006; 5 (1): 561-73.

[1]- *Klebsiella pneumoniae*
[2]- Nanoparticle
[3]- *Bacillus cereus*
[4]- *Bacillus subtilis*