**مقاله پژوهشی**
**مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان**
**دوره ۱۸، اسفند ۱۳۹۸، ۱۲۵۲-۱۲۳۳**

# اثرات ضد بیوفیلمی‌نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه سریشک (*Asphodelus dendroides*) بر روی ایزوله‌های بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک و مولد بیوفیلم *کلبسیلا پنومونیه*: یک مطالعه آزمایشگاهی

**مهتاب صباحی[۱]، سید محمد مهدی حمدی[۲]، امیر میرزایی[۳]**

**دریافت مقاله: ۹۸/۴/۹ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۸/۸/۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۸/۸/۱۸ پذیرش مقاله: ۹۸/۹/۹**

**چکیده**

**زمینه و هدف:** سنتز نانوذرات نقره توسط عصاره گیاهان یکی از روش‌های مقرون به صرفه می‌باشد و یکی از کاربردهای نانوذرات نقره، اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی‌آن می‌باشد و هدف از این مطالعه تعیین اثرات ضدبیوفیلمی نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه سریشک بر روی ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به آنتی‌بیوتیک و مولد بیوفیلم است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه آزمایشگاهی، ابتدا نانوذرات نقره توسط عصاره گیاه سریشک سنتز گردید و خصوصیات ساختاری آن توسط روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلف تأیید شد. به دنبال آن اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره سنتز شده بر روی ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* مولد بیوفیلم به ترتیب توسط روش‌های کم‌ترین غلظت بهینه و Real Time PCR بررسی گردید.

**یافته‌ها**: نتایج تست UV-vis نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده دارای بیشینه جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر بود. نتایج SEM (scanning electron microscope)، TEM (transmission electron microscopy) و XRD ( X-ray powder diffraction) نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده دارای ساختار کروی و دارای اندازه میانگین و انحراف معیار ۲۲±۳۰/۴۱ نانومتر بودند. هم‌چنین نانوذرات نقره دارای اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی معنی‌داری علیه سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* داشتند، به‌طوری‌که نانوذرات نقره باعث کاهش بیان معنی‌دار ژن کدکننده بیوفیلم (*mrkA*) در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* شده بود ($P <۰/۰۰۱$).

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره علیه سویه‌های کلبسیلا پنومونیه را نشان داد. با توجه به نتایج این مطالعه، با انجام مطالعات تکمیلی احتمالاً بتوان از این ترکیب در آینده برای مهار بیوفیلم استفاده نمود.

**واژه‌های کلیدی:** نانوذرات نقره، *کلبسیلا پنومونیه*، اثرات ضد میکروبی، اثرات ضد بیوفیلمی، ژن *mrkA*

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- (نویسنده مسئول) دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
تلفن: ۸۸۰۷۴۹۰۷-۰۲۱، دورنگار: ۸۸۰۷۴۹۰۷-۰۲۱، پست الکترونیکی: m.hamdi@iauctb.ac.ir
۳- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

## مقدمه

امروزه گسترش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ایجاد مقاومت‌های دارویی و به‌وجود آمدن باکتری‌های مقاوم به چند دارو (Multi Drug Resistant) شده است [۲-۱]، به‌طوری‌که ۷۰ درصد از باکتری‌هایی که باعث ایجاد عفونت در بیمارستان‌ها می‌شوند، حداقل به یکی از داروهای رایج درمانی مقاوم شده‌اند [۴-۳]. باکتری‌های تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف یکی از معضلات جدید در درمان باکتری‌ها شده‌اند، به‌طوری‌که این باکتری‌ها توانایی از بین بردن سفالوسپورین‌های نسل سوم را دارند [۵].

یکی از مهم‌ترین باکتری‌های تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه به‌خصوص *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد [۶]. یکی دیگر از دلایل مقاومت های دارویی باکتری‌ها بخصوص *کلبسیلا پنومونیه*، تولید بیوفیلم می‌باشد. بیوفیلم‌ها جمعیتی از باکتری‌های درحال رشد هستند که تولید ماتریکس اگزوپلیمری می‌کنند و به سطوح متصل می‌شوند [۷]. از طرف دیگر، ماتریکس یک بیوفیلم موجب نفوذ آرام و ناکافی ترکیبات ضدمیکروبی شده و گرادیان غلظتی موجود در نقاط مختلف آن قادر به خنثی سازی برخی از ترکیبات راه یافته به درون بیوفیلم می‌شود [۸].

یکی از ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلم در سویه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه*، ژن *mrkA* ( Type 3 Fimbrial Shaft) می‌باشد و مطالعات نشان داده است که این ژن اتصال سویه‌های کلبسیلا پنومونیه را به سطوح مختلف تسهیل نموده و سبب تشکیل بیوفیلم می‌گردد [۹]. توانایی تولید بیوفیلم در باکتری *کلبسیلا پنومونیه* توانایی زنده ماندن آن را در محیط‌های خشن در میزبان را می‌دهد و مسئول ایجاد عفونت‌های مزمن و پایدار می‌باشد [۱۰].

یکی از راه‌کارهای مقابله با تولید بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده از علم نانوتکنولوژی می‌باشد [۱۱]. یکی از نانوذرات مورد استفاده جهت از بین بردن بیوفیلم باکتریایی، نانوذرات نقره می‌باشد [۱۳-۱۲]. تاکنون مطالعات کمی در زمینه بررسی اثرات ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره به انجام رسیده است. Gutierrez و همکارانش اثرات ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره را بروی باکتری‌های مختلف پاتوژن مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث جلوگیری از تولید بیوفیلم در سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* می‌شود [۱۴].

امروزه به منظور سنتز نانوذرات نقره روش‌های فیزیکی و شیمیایی از جمله احیاء شیمیایی، لیتوگرافی، الکتروشیمیایی، لیزر و امواج میکروویو متفاوتی وجود دارد. از معایب روش‌های شیمیایی که نقش عوامل احیایی و تثبیت کننده را ایفاء می‌کنند، این است که در طبیعت به صورت تجزیه نشده باقی می‌مانند و در نهایت موجب آلودگی شیمیایی محیط زیست می‌شوند [۱۵]. اخیراً سنتز زیستی نانوذرات نقره توسط عوامل طبیعی و زیستی مانند گیاهان مورد توجه محققان قرار گرفته است [۱۶]. تاکنون از گیاهان مختلفی مانند *Albizia* ،*Plumbago zeylanica*

*Acacia leucophloea, Chrysanthemum adianthifolia indicum L., Achillea biebersteinii, Lantana camara.* جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده کرده‌اند [۱۷].

در این مطالعه از عصاره گیاه سریشک (*Asphodelus dendroides*) جهت سنتز سبز نانوذرات نقره استفاده شد. سریشک نام یک سرده از زیرخانواده علف درختان آسفودلویداً است. سریشک گیاهی است که غالباً در جنوب و کشورهای شمال آفریقا و پاکستان و هندوستان مشاهده می شود و فصل گلدهی آن از اواسط اردیبهشت ماه تا اواسط خرداد است. عصاره این گیاه، در درمان ناراحتی‌های کبد و معده مؤثر است و به عنوان ضد عفونی کننده در طب سنتی استفاده می‌شود [۱۸]. با توجه به این‌که مطالعات نشان می دهد که عصاره این گیاه دارای ترکیبات ثانویه فلاوونوئیدها و ترپنوئیدها می‌باشد و این ترکیبات نقش به‌سزایی در سنتز نانوذرات نقره دارند و بنا به اثرات درمانی عصاره این گیاه و کاربردهای وسیع نانوذرات نقره، هدف از این مطالعه برای اولین بار سنتز بیولوژیک نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه سریشک و اثرات ضد بیوفیلمی آن بروی ایزوله‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی که از اردیبهشت ماه ۹۷ تا شهریور ماه ۹۷ در دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد تهران مرکز به انجام رسیده است و دارای کد اخلاق IR.IAU, Tehran.REC.1397.019 می‌باشد، تعداد ۵۰ نمونه مشکوک به *کلبسیلا پنومونیه* از بیماران مراجعه کننده بیمارستان امام خمینی شامل ادرار، زخم، مایع مغزی-نخاعی، خون و خلط جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبشناسی روی محیط‌های کشت ائوزین متیلن بلو آگار (EMB) و مک کانکی (مرک، آلمان) آگار کشت داده شدند و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از تهیه لام و مشاهده باسیل‌های گرم منفی، تست‌های بیوشمیایی معمول نظیر کشت در محیط‌های کشت SIM (Sulfide, Indole, Motility)، Triple Sugar Iron Agar (TSI)، Voges-Proskauerو Methyl Red(MRVP)، اوره و سیترات و تست اکسیداز (مرک، آلمان) برای تأیید *کلبسیلا پنومونیه* انجام شد. سپس باکتری‌ها در محیط ترپتیک سوی براث (TSB) و گلیسرول در ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام تست‌های بعدی مطالعه و ذخیره شدند [۱۹]. تست حساسیت ضد میکروبی با روش کربی بائر انتشار (دیسک دیفیوژن) روی محیط کشت مولر هینتون آگار، نسبت به دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (MAST, UK) سفتری اکسون (CRO, 30 µg)، سفتازیدیم (CAZ, 30 µg)، سفوکسیتین (FOX, 30 µg)، سفوتاکسیم (CTX, 30 µg)، نالیدیکسیک اسید (NA, 30 µg)، سیپروفلوکساسین (CP, 5 µg)، ایمی‌پینم (IPM, 10 µg) انجام شد و نتایج طبق راهنمای CLSI (۲۰۱۸) بررسی شد [۲۰].

جهت تعیین سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مولد بیوفیلم، سویه‌ها بر روی محیط کشت گنگورد آگار دارای ۴۰ گرم سوکروز کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گذاری شدند (Memert, Germany)

و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. کلنی های سیاه رنگ به عنوان سویه‌های مولد بیوفیلم و کلنی‌های قرمز روشن به عنوان سویه‌های فاقد قدرت بیوفیلم شناسایی شدند [۲۱].

گیاه سریشک از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی با شماره هرباریومی ۱۳۹۵ خریداری شد. اندام هوایی گیاه ابتدا در جریان هوا قرار داده و سپس در سایه کاملاً خشک شدند و توسط دستگاه آسیاب برقی ( IKA M20 Universal, China) کاملا پودر گردیده و درون ظرف‌های شیشه‌ای نگهداری شدند. از پودر تهیه شده برای عصاره‌گیری اتانولی با استفاده از روش ماسراسیون استفاده شد. عصاره به دست آمده توسط کاغذ صافی (واتمن، آلمان) فیلتر شد و جهت سنتز نانوذرات نقره، از روش رسوب‌گذاری با احیای یون‌های نقره توسط عصاره گیاه سریشک انجام گرفت. به این صورت که نانوذرات نقره با افزودن ۲ میلی‌لیتر عصاره با غلظت mM ۰/۰۰۱ 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. پس از سپری شدن یک ساعت از زمان واکنش و تغییر رنگ محلول، سه مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر انجام می‌گیرد. تمامی مراحل شستشو با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (Hettich, Germany) می‌گردد. در نهایت رسوب نهایی بعد از خشک شدن در شیشه ساعت جمع‌آوری می‌شود [۲۲].

بعد از گذشت ۶۰ دقیقه از زمان واکنش رسوب‌گذاری، تغییر رنگ واکنش و سنتز نانوذرات نقره، آنالیز طیف سنجی مرئی فرابنفش نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از دستگاه طیف سنجی UV-vis ( JASCO V-670 Spectrophtometer, USA) بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۷]. به منظور تعیین ساختار کریستالوگرافی نانوذرات نقره از آزمون اشعه ایکس توسط دستگاه XRD با تشعشع لامپ CuKa (Olympus ، ژاپن) در دامنه ۰ تا ۱۱۰ درجه استفاده شد. به منظور بررسی ریخت شناسی و تأیید اندازه نانوذرات نقره، یک قطره از نمونه سوسپانسیونی ذرات نقره بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شد و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره (Leo 906) (TEM مدل Zeiss۱۰۰ KV )، ساخت کشور آلمان با ولتاژ شتاب دهنده ۱۲۰Kv تصویر برداری شد.

مورفولوژی نانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (شرکت KYKY، کشور ژاپن) بررسی شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و مطالعه نقطه به نقطه، جهت بررسی اندازه و مورفولوژی نانوذرات پس از پوشش دهی با طلا در ولتاژ زیر ۳۰ KV و تحت فشار خلاء ($10^{-5}$ Torr) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی - مدل XL30 شرکت فیلیپس ساخت کشور ژاپن مورد مطالعه قرار گرفت. نانوذرات در مقداری آب حل شده و سوسپانسیون حاصل روی گرید طلا مورد تصویربرداری SEM قرار گرفت. دستگاه لایه نشانی طلا Sputter coater،

ساخت شرکت KYKY، کشور ژاپن و مدل دستگاه SBC12 بود [۲۳].

به منظور بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات نقره از روش کم‌ترین غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد. آزمایش MIC به‌صورت سه بار تکرار بر اساس استاندارد CLSI به روش میکرودایلوشن در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای انجام گرفت. حداقل غلظت مهاری (MIC) به کم‌ترین غلظت از نانوذره نقره که رشد میکروارگانیسم را مهار می‌نماید، اطلاق می شود. به این منظور ابتدا، نانوذرات نقره در غلظت‌های (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵ میکرو گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. طرز تهیه غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره، استفاده از روش رقیق‌سازی متوالی بود یعنی ابتدا غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذرات نقره ساخته شد و به صورت متوالی رقیقسازی شد (به نسبت ۱/۲) [۲۳]. به دنبال آن پلیت‌های ۹۶ چاهکی به کمک توزیع ۹۵ میکرولیتر از محیط مولرهینتون براث و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی (نمونه‌های جداسازی شده *کلبسیلا پنومونیه*) به داخل هر یک از چاهک‌ها فراهم گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذرات در غلظت‌های مختلف در چاهک‌ها ریخته شد. چاهک آخر شامل ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هینتون براث و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی در هر ردیف به منزله کنترل مورد استفاده قرار گرفت. پلیت با درپوش پلیت‌استریل پوشانده شد و محتویات هر چاهک روی شیکر ( Cleaver Scientific، UK) به مدت ۶۰ ثانیه با دور ۱۰۰ rpm مخلوط گردید و سپس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت رشد یا عدم رشد میکروبی بررسی شد [۲۳].

به منظور تعیین اثرات ضدبیوفیلمی نانوذرات نقره از روش Real Time PCR استفاده شد [۲۴] به‌طوری که ابتدا سویه های *کلبسیلا پنومونیه* با غلظت زیرحد MIC (SubMIC) نانوذرات نقره تیمار شدند و به دنبال آن از سویه‌های تحت تیمار با نانوذره، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن، آمریکا) بر طبق دستورالعمل انجام گرفت. در ادامه، سنتز cDNA با استفاده از کیت Quanti Tect Reverse Transcription kit (کیاژن، آمریکا) انجام گرفت. به منظور ارزیابی بیان ژن بیوفیلم *mrkA* از روش Real Time PCR کمی (qRT-Quantitative Real-Time-PCR (PCR) با استفاده مسترمیکس حاوی سایبرگرین ( Applied Biosystem، انگلستان) انجام گرفت. مواد مورد استفاده در حجم ۲۰ میکرولیتر مسترمیکس شامل ۲ میکرولیتر از cDNA، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس حاوی سایبر گرین بود که در دستگاه Bioneer کره انجام گرفت برنامه دمایی مورد استفاده در qPCR شامل ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۱ دقیقه دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود که در ۴۰ سیکل انجام شد. هم چنین ژن *16S rRNA* به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. در انتها بیان نسبی ژن *mrkA* توسط روش $\Delta\Delta C_T$ محاسبه گردید. لازم به ذکر است پرایمرهای مورد استفاده برای ژن - *mrkA* F 5/- TTCTTCTCTCTGCAGCAATG - 3’ و *mrkA* R-5’- TACCGGAGACAGGTAAACGT - F5’- GAGCGGCGGACGGGTGAGTA 3’ و هم‌چنین

16SrRNA -3’ و 16SrRNA -5’- R- GGGCACATCTGATGGCATGA -3’ بود [۲۴].

در این مطالعه تمامی‌تست ها به‌صورت ۳ بار تکرار انجام شد و نتایج توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و P<۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت انحراف از معیار ± میانگین گزارش شد.

## نتایج

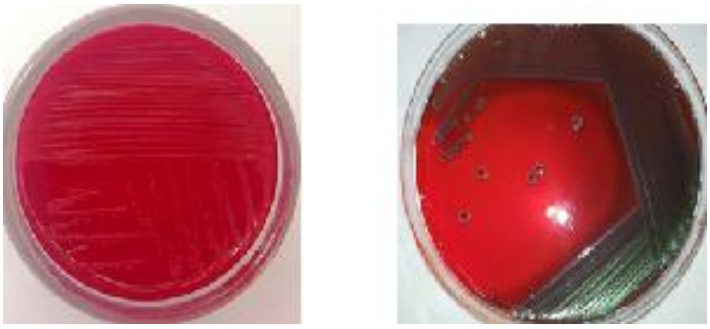
در این مطالعه، از میان ۵۰ نمونه بالینی مشکوک به *کلبسیلا پنومونیه*، کلنی‌های لاکتوز مثبت و موکوئیدی جداسازی شد و با استفاده از تست‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی، تعداد ۲۰ سویه *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی گردید. نتایج تست حساسیت میکروبی نشان داد که سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداسازی شده دارای پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی متنوعی هستند که در جدول ۱ نشان داده شده است، به‌طوری‌که اکثر سویه‌ها مقاوم به چند دارو (MDR) بودند.

***جدول ۱- نتایج تست آنتی بیوگرام ۲۰ سویه کلبسیلا پنومونیه جداسازی شده از نمونه های بالینی***

| شماره سویه | نام آنتی بیوتیک | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | سفتری اکسون | سفتازیدیم | سفوکسیتین | سفوتاکسیم | نالیدیکسیک اسید | سیپروفلوکساسین | ایمی‌پنم |
| ۲ | R | R | R | R | R | R | S |
| ۶ | R | R | S | R | R | R | R |
| ۷ | R | R | R | R | S | R | R |
| ۹ | R | S | R | R | R | R | R |
| ۱۱ | S | R | R | R | R | R | S |
| ۱۶ | R | R | R | R | R | R | R |
| ۱۹ | R | R | I | S | R | R | R |
| ۲۲ | S | R | R | R | R | R | S |
| ۲۳ | R | R | R | R | S | R | S |
| ۲۵ | S | R | R | R | R | R | S |
| ۲۶ | R | R | R | R | R | I | S |
| ۳۱ | S | R | R | R | S | R | R |
| ۳۳ | R | R | R | I | R | S | S |
| ۳۹ | R | S | I | R | R | R | R |
| ۴۰ | R | R | R | R | R | R | I |
| ۴۲ | R | S | R | R | R | R | S |
| ۴۴ | R | R | R | R | R | R | S |
| ۴۶ | I | R | R | R | R | S | I |
| ۴۹ | R | R | R | R | I | R | S |
| ۵۰ | R | R | R | S | R | R | S |

***R: مقاوم، I: نیمه حساس، S: حساس***

در این مطالعه، از محیط کشت کنگورد آگار برای بررسی فنوتیپی بیوفیلم استفاده شد. باکتری‌های بیوفیلم مثبت کلنی‌های مشکی رنگ تولید می‌کنند در صورتی که باکتری‌های فاقد بیوفیلم به همان حالت اولیه یعنی قرمز رنگ باقی می‌مانند. از میان ۲۰ سویه بالینی *کلبسیلا پنومونیه*، تمامی‌سویه‌ها از نظر تست فنوتیپی بیوفیلم مثبت بودند (شکل ۱).



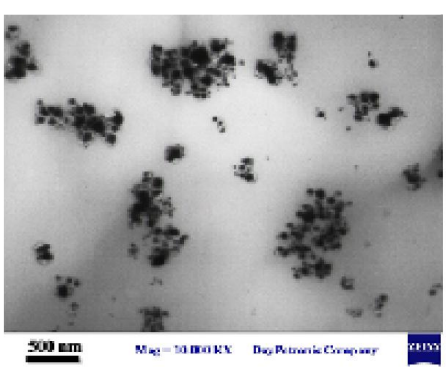
A B

***شکل ۱- نتایج تست فنوتیپی بیوفیلم. A: کلنی های بی رنگ (بیوفیلم منفی)، B: کلنی های مشکی رنگ (بیوفیلم مثبت).***

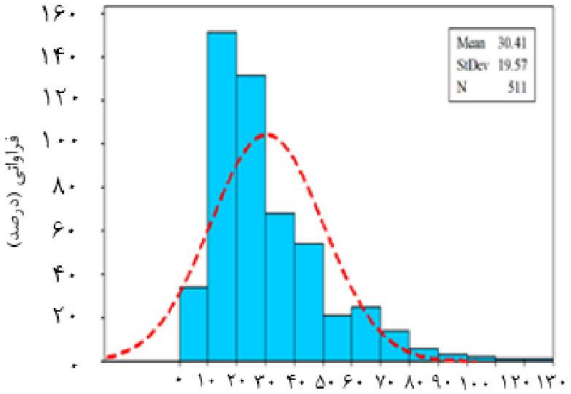
واکنش احیاء محلول نیترات نقره در دمای اتاق بعد از اضافه کردن عصاره خشک شده به محلول نیترات نقره صورت گرفت و تغییر رنگ حاصل گردید که این تغییر رنگ نشان دهنده ساخت نانوذرات نقره بود (شکل ۲). بعد از سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۹۰۰۰ و به دست آوردن رسوب نانوذرات نقره و چندین مرحله شست و شو از پودر خشک شده نانوذرات نقره برای آنالیز TEM، SEM، XRD، UV-Vis استفاده شد. به منظور بررسی و آنالیز ریخت‌شناسی و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی TEM و SEM استفاده شد. نتایج TEM و SEM نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده دارای ساختار کروی و دارای میانگین سایز ۳۰/۴۱ نانومتر بود (شکل B۳-A۳ و C۳). همان طورکه نتایج سنجش چگالی نوری نانوذرات نقره نشان می‌دهد حداکثر میزان جذب محلول‌های حاوی نانوذرات نقره در طول موج ۴۲۰ نانومتر است (شکل ۴). طیف سنجی XRD به منظور اثبات نانوکریستال‌های فلزی نقره، انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده که در طیف نشان داده شده است (شکل A۵)، نانوذرات کریستالی نقره در سطوح ۱۱۱، ۲۰۰، ۲۲۰ و ۳۱۱ به ترتیب پیک هایی با مقادیر ۳۸/۱، ۴۶/۲۲۵، ۶۴/۵۱ و ۷۶/۸۲ را نشان داد که با نمونه استاندارد نانوکریستال‌های نقره (شکل B۵) کاملاً همخوانی دارد. پیک‌های اضافی مربوط به ناخالصی‌هایی است که در بافت گیاه وجود داشته و دارای ساختار کریستالی است.



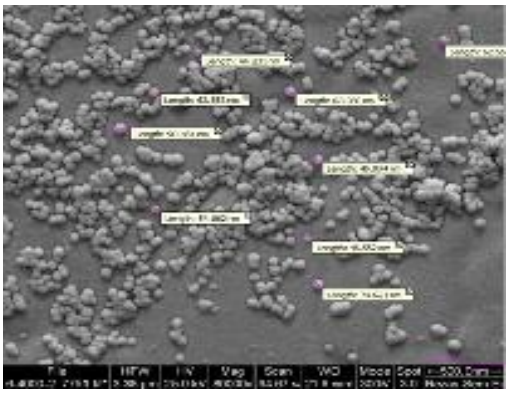
***شکل ۲- سنتز نانوذرات نقره (سمت راست، محلول نیترات نقره و سمت چپ، پس از افزودن عصاره گیاهی)***




A

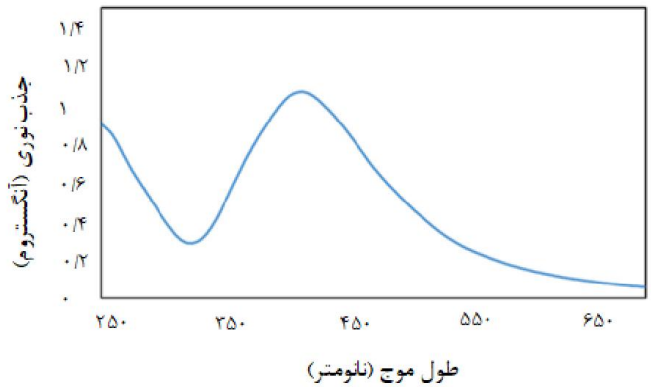



C

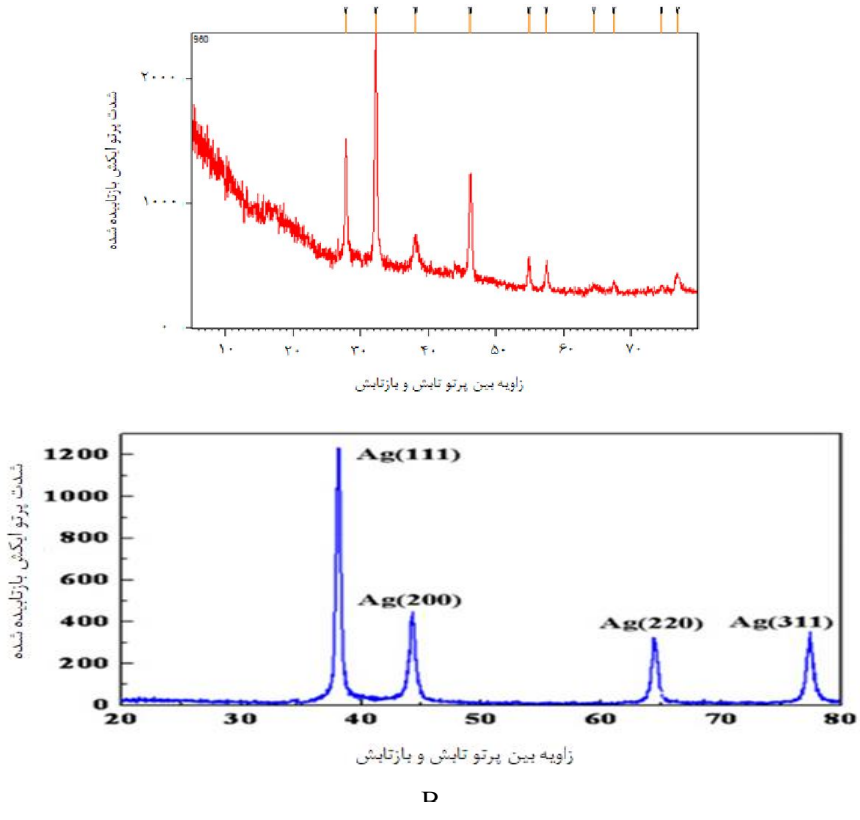


B

***شکل ۳- نتایج میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) (A)، نگاره (SEM) (B) و میانگین سایز نانوذرات (C). همان‌طور که مشاهده می‌شود نانوذرات سنتز شده دارای ساختاری کروی و دارای میانگین اندازه ۳۰/۴۱ نانومتر می باشد.***




***شکل ۴- طیف سنجی UV-Vis نانوذرات نقره سنتز شده. با توجه به شکل، جذب UV نانوذرات نقره سنتز شده در طول موج بین ۲۵۰ تا ۷۰۰ نانومتر خوانده شد و ماکزیمم جذب در طول موج ۴۳۸ نانومتر بود.***



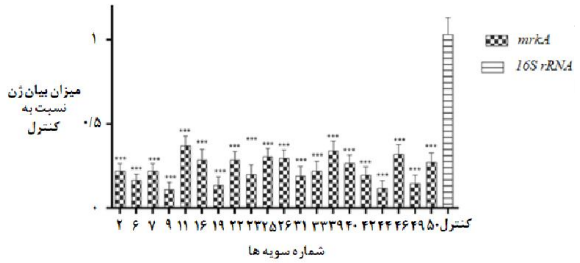

***شکل ۵- (A): طیق XRD نانونقره سنتز شده، B: طیف XRD نمونه استاندارد نانوکریستال‌های نقره***

در این مطالعه، به منظور تعیین اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره از روش MIC استفاده شد. در روش MIC سویه‌های باکتریایی *کلبسیلا پنومونیه* تحت غلظت‌های ۳/۱۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نانوذره نقره روی تمامی‌باکتری‌های مورد مطالعه خاصیت ضد باکتریایی دارد و کم‌ترین و بیش‌ترین غلظت MIC برابر بود با ۶/۲۵ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (جدول ۲).

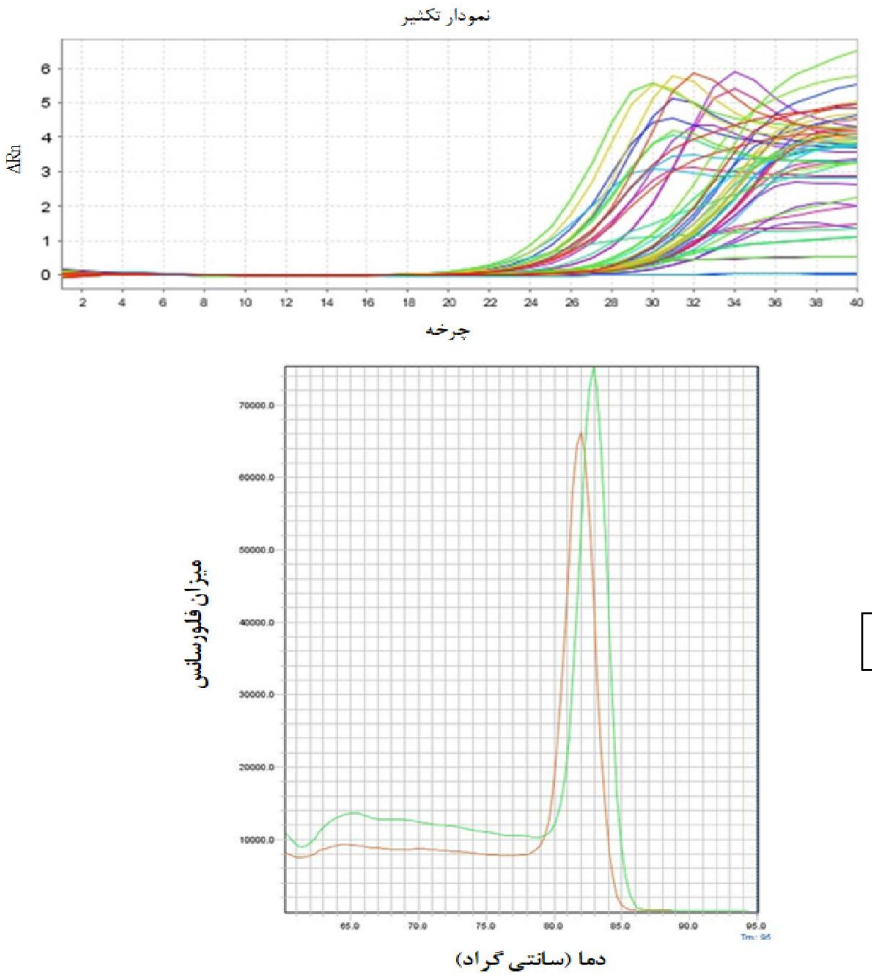
***جدول ۲- نتایج MIC نانوذرات نقره علیه سویه‌های کلبسیلا پنومونیه***

| شماره سویه | ۲ | ۶ | ۷ | ۹ | ۱۱ | ۱۶ | ۱۹ | ۲۲ | ۲۳ | ۲۵ | ۲۶ | ۳۱ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **MIC (میکروگرم در میلی لیتر)** | ۶/۲۵ | ۲۵ | ۲۵ | ۱۲/۵ | ۶/۲۵ | ۱۲/۵ | ۲۵ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۵۰ | ۵۰ | ۲۵ |
| **شماره سویه** | **۴۹** | **۵۰** | **۳۳** | **۳۹** | **۴۰** | **۴۲** | **۴۴** | **۴۶** | **۴۹** | **۵۰** | - | - |
| **MIC (میکروگرم در میلی لیتر)** | ۲۵ | ۶/۲۵ | ۶/۲۵ | ۱۲/۵ | ۱۲/۵ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۵۰ | ۶/۲۵ | | |

بیان نسبی ژن بیوفیلم *mrkA* در ایزوله‌های بیوفیلم مثبت که تحت تأثیر نانوذرات نقره قرار گرفته بودند، توسط روش Real Time PCR مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه‌های مختلف در غلظت subMIC از نانوذرات نقره، تغییر بیان ژن *mrkA* را داشتند و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در کاهش بیان ژن *mrkA* در مقایسه با بیان ژن *16S rRNA* داشتند ($p<0/05$). نتایج حاصل از تغییر بیان ژن *mrkA* در سویه‌های بیوفیلم مثبت در نمودار ۱ و نمودار




***شکل ۶- میزان بیان ژن mrkA در سویه‌های مختلف کلبسیلا پنومونیه تحت تیمار با نانوذره نقره در مقایسه با ژن خانه‌دار 16S rRNA. نتایج معنی‌دار بیان ژن mrkA در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه به صورت مقایسه با ژن کنترل (16S rRNA) گزارش شده است ( *** P <۰/۰۰۱ : n=3). همان‌طور که مشاهده می‌شود با در نظر گرفتن ژن مرجع، تمامی سویه‌ها کاهش بیان معناداری داشته اند.***




***شکل ۷- A: نمودار تکثیر Real Time PCR نمونه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه*، B: نمودار آنالیز منحنی ذوب. قرمز: ژن 16S rRNA، سبز: ژن mrkA***

## بحث

در این مطالعه برای اولین بار نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه سریشک سنتز شدند. نانوذرات نقره با استفاده از روش‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی و گذاره تعیین ساختار شدند. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده کروی و دارای اندازه میانگین ۳۰/۴۱ نانومتر می‌باشد. به دنبال آن اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی‌نانوذرات نقره به روش Real Time PCR بررسی شد. تولید بیوفیلم و ایجاد مقاومت‌های دارویی در سویه‌های باکتریایی بخصوص *کلبسیلا پنومونیه* یکی از معضلات اخیر و مورد توجه محققان در سرتاسر دنیا می‌باشد، اما هنوز اطلاعات کمی‌در مورد مهارکننده‌های تولید بیوفیلم در سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *کلبسیلا پنومونیه* وجود دارد [۲۵]. تاکنون ترکیبات ضد بیوفیلمی‌کمی‌توسط محققان گزارش شده‌اند. Wood و همکارانش چندین ترکیب ضد بیوفیلم باکتری اشرشیا کلی مانند brominated furanones، ursolic acid،

مشتقات ایندول و ۵ فلئورویوراسیل را گزارش کرده‌اند [۲۶]. مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیک توسط سویه‌های تولید کننده بیوفیلم هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است اما یکی از عوامل تولید گلیکوکالیکس در سلول‌ها می‌باشد که می‌توانند از دفاع ایمنی میزبان و فعالیت آنتی‌بیوتیک‌ها فرار کنند [۲۷]. به منظور از بین بردن سلول‌های میکروبی تولید کننده بیوفیلم، ترکیبات آنتی‌بیوتیکی باید به ماتریکس پلی‌ساکاریدی نفوذ کنند تا به سلول برسند. علم نانوتکنولوژی با استفاده از نانوذرات می‌تواند به معضل پاسخ دهد، به‌طوری که یکی از نانوذرات فلزی، نانوذرات نقره می‌باشد که مطالعات مختلفی به اثرات ضد میکروبی آن اشاره کرده‌اند [۲۸].

تاکنون از عصاره گیاهان مختلفی جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده شده است. Mousavi 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 می‌باشد [۲۹]. Ghanbar و همکارانش نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره گیاه *Artemisia quttensis* podlech سنتز کردند. این محققان اثرات ضد باکتریایی را با روش میکرودایلوشن مورد مطالعه قرار دادند و نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره نقره دارای خاصیت ضدباکتریایی می‌باشد [۳۰]. هم‌چنین Khanna P و همکارانش با استفاده از عصاره جلبک سیانوفیسه نانوذرات نقره را سنتز نموده و ذراتی با اندازه میانگین بین ۱۰۰-۲۰ نانومتر به‌دست آوردند [۳۱]. نتایج مطالعه ما نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده کروی و دارای اندازه میانگین ۳۰/۴۱ نانومتر می‌باشد. یکی از دلایل اختلاف در اندازه نانوذرات نقره سنتز شده در مطالعات مختلف به دلیل محتوای ترکیبات احیاء کننده عصاره‌های گیاهی مختلف و هم‌چنین شرایط واکنش مختلف می‌باشد.

در ادامه مطالعه، به دنبال جداسازی سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مولد بیوفیلم، اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج تست‌های ضد میکروبی نشان داد که نانوذرات نقره دارای اثرات ضدمیکروبی بر روی تمامی سویه‌های مولد بیوفیلم داشت به طوری‌که نانوذرات نقره سنتز شده از غلظت ۶/۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر خاصیت میکروب کشی داشتند. هم‌چنین، نتایج تست ضد بیوفیلمی‌توسط روش Real Time PCR نانوذرات نقره نشان داد که هنگامی‌که سویه‌ها تحت تأثیر نانوذرات نقره در غلظت زیر حد مهارکنندگی قرار می‌گیرند، توانایی تشکیل بیوفیلم را ندارند. بنابراین هنگامی‌که سویه‌ها در مجاورت نانوذرات نقره قرار می‌گیرند، تولید اگروپلی‌ساکارید در این سویه‌ها ممانعت می‌شود و ارگانیسم نمی‌تواند بیوفیلم تشکیل دهد. مکانیسم اصلی تأثیر نانوذرات نقره بر روی سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* از طریق آسیب به DNA، پروتئین و تخریب دیواره سلولی می‌باشد [۳۲]. مطالعات نشان داده است که نانوذرات نقره رفتار فوتوکاتالیستی دارند و می‌توانند رادیکال‌های سمی‌اکسیژن تولید کنند و منجر به از بین رفتن غشای سلول باکتریایی

شوند در واقع نانوذرات یکپارچگی غشای سلول باکتری را مختل نموده و باعث کاهش سطح آب‌گریزی سلول می‌شود و تنظیم رونویسی از ژن‌های مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد [۳۳].

Moteriya و همکارانش نشان دادند که نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه *Caesalpinia pulcherrima* که دارای اندازه ۸ نانومتر بودند، دارای اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی معنی‌داری علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تایفی موریوم* می‌باشد، به‌طوری‌که هر یک از سویه‌ها دارای میزان MIC متفاوتی بودند که میزان MIC آن با نتایج مطالعه ما هم‌خوانی نداشت [۳۴]. تفاوت میزان MIC در مطالعات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت در روش‌های آماده‌سازی نانوذرات، اندازه نانوذره و تفاوت در سوش‌های باکتریایی مورد مطالعه 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.

نتایج مشابهی توسط Kalishwaralal و همکارانش گزارش شد، به‌طوری‌که این محققان نشان دادند که در غلظت ۱۰۰ نانومولار نانوذرات نقره سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تا ۹۵ درصد توانایی تشکیل بیوفیلم را از دست می‌دهند [۳۵]. Moulavi P و همکارانش، اثرات نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره گیاه درمنه را بروی بیوفیلم سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و بیان ژن‌های بیوفیلم مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده دارای اندازه میانگین زیر ۱۰۰ نانومتر می‌باشند و نانوذرات نقره باعث مهار تشکیل بیوفیلم شده و بیان ژن‌های *icaA* و *icaR* را در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* کاهش می‌دهند [۳۶]. Rajivgandhi G و همکارانش، اثرات ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره سنتز شده را در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره سنتز شده دارای اندازه میانگین ۲۰ تا ۵۰ نانومتر بوده و دارای اثرات ضد بیوفیلمی می‌باشد و گزارش کردند که این نانوذرات می‌توانند جایگزین ترکیبات ضدبیوفیلمی دیگر باشند [۳۷]. نقطه نظر تمامی‌این مطالعات با مطالعه ما، اثرات ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره می‌باشد اما نقطه نظر متفاوت، میزان درصد تشکیل بیوفیلم و میزان کاهش بیان ژن *mrkA* می‌باشد. یکی از دلایل این تفاوت می‌تواند به دلیل مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در کشورهای مختلف می‌باشد که موجب ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و هم‌چنین ظهور مکانیسم‌های جدید مقاومت از جمله بیوفیلم می‌باشد و میزان بیان ژن بیوفیلم (*mrkA*) در سویه‌های مختلف که تحت تأثیر نانوذرات نقره قرار می‌گیرند متفاوت است، چون میزان تشکیل بیوفیلم به دلیل میزان متفاوت بیان ژن *mrkA* در سویه‌ها متفاوت می‌باشد.

یکی دیگر از اهداف مطالعه حاضر تعیین تأثیر نانوذرات نقره بر بیان ژن تولید کننده بیوفیلم *mrkA* در سویه‌های

*کلبسیلا پنومونیه* بود. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره در تمامی‌سویه‌ها باعث کاهش بیان ژن معنی-دار در تمامی‌سویه‌های مولد بیوفیلم شدند و بنابراین می-توانند باعث مهار تشکیل بیوفیلم شوند. با توجه به مهار بیان ژن بیوفیلم می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات نقره می‌توانند باعث مهار بیان ژن تولید کننده بیوفیلم شده و بنابراین نانوذرات نقره کاندید مناسبی جهت از بین بردن بیوفیلم در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* باشد. مطالعات مختلفی در مورد بررسی اثرات ضدبیوفیلمی نانوذرات نقره به انجام رسیده است. Loo و همکارانش اثرات ضد بیوفیلمی نانوذرات نقره را برروی بیوفیلم سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که نانوذرات با اندازه کوچک بر روی بیوفیلم کلنی‌های سودوموناس آئروژینوزا به میزان ۹۰ درصد مؤثر است [۳۸] و بنابراین وجه اشتراک تمامی مطالعات با مطالعه ما اثرات ضد بیوفیلمی‌معنی‌دار نانوذرات نقره می‌باشد.

یکی از محدودیت‌های این مطالعه، محدود بودن تعداد سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو و تشکیل دهنده بیوفیلم می‌باشد، به همین دلیل پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی از تعداد سویه‌های بیش‌تر مقاوم به دارو کلبسیلا پنومونیه که از نقاط مختلف جغرافیایی جداسازی شده‌اند استفاده شود تا میزان بیان ژن *mrkA* در سویه‌های مختلف بررسی شود. هم‌چنین می‌توان میزان اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی‌نانوذرات نقره سنتز شده در این مطالعه را با نانوذرات تجاری مقایسه نمود.

نتایج این مطالعه اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی‌نانوذرات نقره علیه سویه‌های کلبسیلا پنومونیه را نشان داد. از آن‌جایی‌که مطالعات کمی‌در مورد تأثیر نانوذرات نقره بر روی بیوفیلم سویه های *کلبسیلا پنومونیه* انجام گرفته است، با توجه به اهمیت بالینی این باکتری، بتوان در آینده با انجام مطالعات تکمیلی احتمالاً بتوان از این ترکیب برای مهار بیوفیلم استفاده نمود.

## تشکر و قدردانی

این مقاله منتهج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی می‌باشد، لذا محققان برخود لازم می دانند که از معاونت محترم پژوهشی به دلیل فراهم نمودن اعتبار مالی و هم‌چنین از کلیه پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی که جهت فراهم نمودن سویه‌های باکتریایی *کلبسیلا پنومونیه* همکاری نمودند، تشکر و قدردانی نمایند.

# References

[1] Li B, Webster TJ. Bacteria antibiotic resistance: New challenges and opportunities for implant-associatedorthopedic infections. *J Orthop Res* 2018; 36(1): 22-32.

[2] Gupta M, Didwal G, Bansal S, Kaushal K, Batra N, Gautam V, Ray P. Antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* in healthy gut flora: A report from north Indian semiurban community. *Indian J Med Res* 2019; 149(2): 276-80.

[3] 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 Genet* 2019; 15(4): e1008114.

[4] Juan CH, Chuang C, Chen CH, Li L, Lin YT. Clinical characteristics, antimicrobial resistance and capsular types of community-acquired, healthcare-associated, and nosocomial *Klebsiella Pneumoniae* bacteremia. *Antimicrob Resist Infect Control* 2019; 8(1): 12-23.

[5] Gautam V, Thakur A, Sharma M, Singh A, Bansal S, Sharma A, et al. Molecular characterization of extended-spectrum β-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae*: A multi-centric study from tertiary care hospitals in India. *Indian J Med Res* 2019; 149(2): 208-15.

[6] Caliskan E, Say Coskun US, Dulger G, Kilincel O, Ankarali H, Sahin I. Investigation of plasmid mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates by phenotypic and genotypic. *J Pak Med Assoc* 2019; 69(6): 834-39.

[7] Singh AK, Yadav S, Chauhan BS, Nandy N, Singh R, Neogi K, et al. Classification of clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* based on their *in vitro* biofilm forming capabilities and elucidation of the biofilm matrix chemistry with special reference to the protein content. *Front Microbiol* 2019; 10(1): 669-78.

[8] Mohammadi M, Masoumipour F, Hassanshahian M, Jafarinasab T. Study the antibacterial and antibiofilm activity of *Carum copticum* against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm forms. *Microb Pathog* 2019; 129 (2): 99-105.

[9] Türkel İ, Yıldırım T, Yazgan B, Bilgin M, Başbulut E. Relationship

between antibiotic resistance, efflux pumps, and biofilm formation in extended-spectrum β-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Chemother* 2018; 30(6-8): 354-63.

[10] Alcántar-Curiel MD, Ledezma-Escalante CA, Jarillo-Quijada MD, Gayosso-Vázquez C, Morfín-Otero R, Rodríguez-Noriega E, et al. Association of antibiotic resistance, cell adherence, and biofilm production with the endemicity of nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 7012958.

[11] 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. *Front Microbiol* 2016; 7(1): 330-41.

[12] Cardoso MH, Santos VPM, Costa BO, Buccini DF, Rezende SB, Porto WF, et al. A short peptide with selective anti-biofilm activity against Pseudomonas aeruginosa and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Microb Pathog* 2019; 103605.

[13] Salomoni R, Léo P, Montemor AF, Rinaldi BG, Rodrigues M. Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotechnol Sci Appl* 2017; 10: 115-21

[14] 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.

[15] Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci* 2014;9(6):385-406.

[16] Poulose S, Panda T, Nair PP, Théodore T. Biosynthesis of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2014; 14(2): 2038-49.

[17] Baharara J, Namvar F, Ramezani T, Mousavi M, Mohamad R. Silver nanoparticles biosynthesized using *Achillea biebersteinii* flower extract: apoptosis induction in MCF-7 cells via caspase activation and regulation of *Bax*

and *Bcl-2* gene expression. *Molecules* 2015; 20(2): 693-706.

[18] Angiosperm phylogeny group. "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV". *Botanical Journal of the Linnean Society* 2016; 181(1): 1–20.

[19] Hansen DS, Aucken HM, Abiola T, Podschun R. Recommended test panel for differentiation of Klebsiella species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3665-9.

[20] Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI, Wayne, Pa. M100-S16, 26, no. 3.2018.

[21] Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J Appl Microbiol* 2017; 123(4): 1003-18.

[22] Erdogan O, Abbak M, Demirbolat GM, Birtekocak F, Aksel M, Pasa S, et al. Green synthesis of silver nanoparticles via *Cynara scolymus* leaf extracts: The characterization, anticancer potential with photodynamic therapy in MCF7 cells. *PLoS One* 2019; 14(6): e0216496.

[23] Fard NN, Noorbazargan H, Mirzaie A, Hedayati Ch M, Moghimiyan Z, Rahimi A. Biogenic synthesis of AgNPs using *Artemisia oliveriana* extract and their biological activities for an effective treatment of lung cancer. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(sup3): S1047-S1058.

[24] Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J Appl Microbiol* 2017; 123(4): 1003-18.

[25] Alkhudhairy MK, Alshadeedi SMJ, Mahmood SS, Al-Bustan SA, Ghasemian A. Comparison of adhesion genes expression among *Klebsiella oxytoca* ESBL-non-producers in planktonic and biofilm mode of growth, and imipenem sublethal exposure. *Microb Pathog* 2019; 134(1): 103558.

[26] Wood TK. Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from

whole-transcriptome profiling. *Environ Microbiol* 2009; 11(1): 1-15.

[27] Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol J* 2017; 11(1): 53-62.

[28] Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002; 292(2): 107-13.

[29] 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). *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(sup1): 499-510.

[30] 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 Nanobiotechnol* 2017; 11(4): 485-92.

[31] Khanna P, Kaur A, Goyal D. Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. *J Microbiol Methods* 2019; 105656.

[32] Qing Y, Cheng L, Li R, Liu G, Zhang Y, Tang X, et al. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int J Nanomedicine* 2018; 13: 3311-27.

[33] Cao H, Liu X. Silver nanoparticles-modified films versus biomedical device-associated infections. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2010; 2(6):670-84

[34]MoteriyaP.Biosynthesis of silver nanoparticles for mation from *Caesalpinia pulcherrima* stem meta bolites and their broad spectrum biological activities. *J Genet Eng Biotechnol* 2018; 16(1): 105–13.

[35] Kalishwaralal K, Barath Mani Kanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 79(2): 340-4.

[36] Moulavi P, Noorbazargan H, Dolatabadi A, Foroohimanjili F, Tavakoli Z, Mirzazadeh S, et al. Antibiofilm effect of green engineered silver nanoparticles fabricated from *Artemisia scoporia*

of methicillin-resistant coagulase negative Staphylococci. *Bioorg Chem* 2019; 89:103008.

[38] Loo CY1, Young PM, Cavaliere R, Whitchurch CB, Lee WH, Rohanizadeh R. Silver nanoparticles enhance Pseudomonas aeruginosa PAO1 biofilm detachment. *Drug Dev Ind Pharm* 2014; 40(6):719-29.

extract on the expression of *icaA* and *icaR* genes against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Basic Microbiol* 2019: 29.

[37] Rajivgandhi G, Maruthupandy M, Muneeswaran T, Anand M, Quero F, Manoharan N, Li WJ. Biosynthesized silver nanoparticles for inhibition of antibacterial resistance and biofilm formation

# Anti-biofilm Activity of Synthesized Silver Nanoparticles Using *Asphodelus dendroides* Extract against Antibiotic Resistant and Biofilm Forming *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains: A Laboratory Study

**M. Sabahi[1], S. M. M. Hamdi[2], A. Mirzaie[3]**

**Received: 30/06/2019 Sent for Revision: 30/07/2019 Received Revised Manuscript: 09/11/2019 Accepted: 30/11/2019**

**Background and Objectives:** Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using plant extract is cost effective, while, one of the applications of AgNPs is its antimicrobial and anti-biofilm activities. The aim of this study was to investigate the anti-biofilm activity of synthesized AgNPs using *A. dendroides* against antibiotic resistant and biofilm forming clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*.

**Materials and Methods**: In this laboratory study, the AgNPs were first synthesized using *Asphodelus dendroides* extract and their size and structural characteristics were determined using various physico-chemical methods. Subsequently, the antimicrobial and anti-biofilm activities of synthesized AgNPs on antibiotic resistant and biofilm forming clinical isolates of *K. pneumoniae* were investigated via minimum inhibitory concentration (MIC) and Real Time PCR, respectively.

**Results**: The results of the UV-vis test showed that the synthesized AgNPs had a maximum absorbance at 420 nm. The SEM (scanning electron microscope), TEM (transmission electron microscopy) and XRD (X-ray powder diffraction) results showed that the synthesized AgNPs had a spherical structure with a mean size of 30.41±22 nm. Also, AgNPs had significant antimicrobial and anti-biofilm activities against *K. pneumoniae* strains, so that the AgNPs down-regulated the expression of biofilm coding gene (*mrkA*) in *K. pneumonia* strains ($p<0.001$).

**Conclusion**: The results of this study showed the antimicrobial and anti-biofilm activities of AgNPs against *K. pneumoniae* strains. According to the results, with further studies, the synthesized AgNPs may be used as biofilm inhibitors in future.

**Key words:** Silver nanoparticle, *Klebsiella pneumoniae,* Antibacterial activity, Anti-biofilm activity, *mrkA* gene

**Funding:** This research was funded by Islamic Azad University, Central Tehran Branch.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethical Committee of Islamic Azad University of Central Branch approved the study (IR.IAU, Tehran.REC.1397.019)

**How to cite this article:** Sabahi M, Hamdi S M M, 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. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2020; 18 (12): 1233-52 [Farsi]

***1- MSc, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0002-8214-6315***
***2- Associate Prof., Dept. of Biology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0001-7167-1352***
***(Corresponding Author): Tel: (021) 88074907, Fax: (021) 88074907, E-mail: m.hamdi@iauctb.ac.ir***
***3- Assistant Prof., Dept. of Biology, Islamic Azad University, Roudehen Branch, Roudehen, Iran, ORCID: 0000-0002-0941-7828***