



بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نانوذرات آلومینیوم (Al_2O_3) و تأثیر آن بر بیان ژن بیوفیلیم (*mrkA*) در ایزوله‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه

آتنا سیفی: کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
امیر میرزایی: استادیار، گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران (* نویسنده مسئول) Amir_mirzaie92@yahoo.com
احسان احسانی: استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران
افشین محمودزاده: استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

کلبسیلا پنومونیه،
نانوذرات آلومینیوم،
اثرات ضد میکروبی،
ضد بیوفیلمی،
بیان ژن

زمینه و هدف: کلبسیلا پنومونیه یکی از پاتوژن‌های فرصت طلب بیمارستانی می‌باشد که به دلیل مقاومت‌های آنتی بیوتیکی و تشکیل بیوفیلیم بیماری‌های شدید ایجاد می‌کند و بنابراین استفاده از ترکیبات ضد میکروبی جدید علیه آن پیشنهاد می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی، ضد بیوفیلمی و آنالیز بیان ژن بیوفیلیم *mrkA* در سویه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی خون، ادرار، مایع مغزی- نخاعی و زخم جمع آوری گردید و سویه‌های کلبسیلا پنومونیه با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی جداسازی و شناسایی شد. به دنبال آن اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نانوذرات آلومینیوم به ترتیب با استفاده از روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و میکروتیتر پلیت بررسی شد. در انتها میزان بیان ژن بیوفیلمی *mrkA* در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه با استفاده از روش Real Time PCR مطالعه شد.

یافته‌ها: نتایج جداسازی میکروبی نشان داد که از میان ۱۰۰ نمونه بالینی، تعداد ۲۰ ایزوله مربوط به کلبسیلا پنومونیه بودند. نتایج ضد میکروبی نشان داد که سویه‌های کلبسیلا پنومونیه دارای MIC بین ۲۵۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بودند. هم چنین نتایج نشان داد که در غلظت زیر حدمهارکنندگی، نانوذرات آلومینیوم دارای اثرات ضد بیوفیلمی معناداری بودند ($P < 0.05$). هم چنین نانوذرات آلومینیوم میزان بیان ژن بیوفیلیم *mrkA* را بطور معناداری در سویه‌ها کاهش دادند ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، نانوذرات آلومینیوم دارای اثرات چشمگیر ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی داشتند که می‌توان با مطالعات بیشتر از این نانوذره به عنوان کاندید ترکیب ضد میکروبی استفاده نمود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شيوه استناد به این مقاله:

Seifi A, Mirzaie A, Ehsani E, Mahmoodzadeh A. Evaluating the antibacterial biofilm inhibitory activity of aluminium (Al_2O_3) nanoparticles against clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Razi J Med Sci. 2021;28(7):37-49.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با **CC BY-NC-SA 3.0** صورت گرفته است.

Evaluating the antibacterial biofilm inhibitory activity of aluminium (Al_2O_3) nanoparticles against clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*

Atena Seifi: MA, Department of Biology, Roodehen Branch, Islamic Azad University, Roodehen, Iran

Amir Mirzaei: Assistant Professor, Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran (*Corresponding author) Amir_mirzaie92@yahoo.com

Ehsan Ehsani: Assistant Professor, Department of Biology, Roodehen Branch, Islamic Azad University, Roodehen, Iran

Afshin Mahmoodzadeh: Assistant Professor, Department of Biology, Roodehen Branch, Islamic Azad University, Roodehen, Iran

Abstract

Background & Aims: The genus *Klebsiella* belongs to the family Enterobacteriaceae, which consists of gram-negative and immobile species that have mucosal colonies and live in the gastrointestinal tract (1). Among *Klebsiella* species, *Klebsiella pneumoniae* is one of the most common opportunistic pathogens that cause serious diseases (3). These strains have become resistant to many antibiotics and one of the strategies of antibiotic resistance of *K. pneumoniae* strains is biofilm formation (4-6). One of the important genes in biofilm formation in this bacterium is *mrkA* gene and this gene encodes MrkA protein, which is one of the important proteins of type 3 fimbriae (7). Excessive use of antibiotics leads to increasing antibiotic resistance of these bacteria and therefore the use of alternatives to treatment other than antibiotics is important. One of these solutions is the use of nanotechnology (8). So far, few studies have been conducted to investigate the antimicrobial and antifouling effects of aluminum nanoparticles against bacterial clinical strains. The aim of this study was to investigate the antimicrobial and anti-biofilm effects of Al_2O_3 nanoparticles against clinical strains of *K. pneumoniae*.

Methods: In this experimental study, 100 clinical samples including wounds, blood, urine, and cerebrospinal fluid were collected from different hospitals in Tehran (Imam Khomeini Hospital and Pars Hospital). Subsequently, strains of *K. pneumoniae* were identified by growing one in McConkey agar medium, Gram staining, and biochemical tests (9). Antibiotic resistance pattern of *K. pneumoniae* strains was determined by disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) instruction. Briefly, adjusted cultures to give a 0.5 McFarland concentrations of the *K. pneumoniae* strains were inoculated into Muller-Hinton broth (Oxoid, UK) and the susceptibility of the strains to the antibiotics including ampicillin, gentamicin, amikacin, tetracycline, cefepime, ciprofloxacin, levofloxacin and trimethoprim sulfamethoxazol was evaluated (10). In order to investigate the presence of biofilm in *K. pneumoniae* strains, microtiter plate quantification method was used (11). In this study, Al_2O_3 nanoparticles were purchased from the American company US nano. In order to investigate the physicochemical properties of Al_2O_3 nanoparticles, FTIR, electron microscopy (SEM), XRD and DLS tests were used. The SEM, DLS, XRD and FTIR were used for study of morphology, size, nanomaterial characterization and analyze the structure of matter at the molecular scale based on the resonant vibration modes of various molecules on the aluminum nanoparticles, respectively. In order to investigate the antibacterial effects of Al_2O_3 nanoparticles, the microdilution method was used in a 96-well plate according to the CLSI standard (16). Briefly, various concentrations of Al_2O_3 nanoparticles including 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, were added into 96-well containing each *K. pneumoniae* strain (500 μl) with 5×10^5 concentration, and the 96-well plates were incubated 24 h at 37 $^\circ\text{C}$. The next day, absorbance was taken using UV-visible spectrophotometer at 600 nm and the concentration giving the least optical density corresponds to minimum inhibitory concentration (MIC) of nanoparticles for that particular

Keywords

Culture of football fans,
Psycho-social factors

Received: 29/06/2021

Published: 28/09/2021

microorganism. In order to quantitatively study the anti-biofilm effects of aluminum nanoparticles, Crystal violet (CV) assay was used (12). A 96-well plate-based Crystal violet (CV) assay was used for evaluating of anti-biofilm efficacy of Al₂O₃ nanoparticles. The biofilm-forming *K. pneumoniae* strains were cultured into 96 well microtiter plates for 24 h at 37 °C. The *K. pneumoniae* strains were then treated with sub-MIC values of Al₂O₃ nanoparticles for 24 h incubation at 37 °C. All the wells were then again washed with PBS three times and fixed with methanol for 15 minutes. The plate was air dried for 30 minutes and 0.1% CV solution was added to each well and incubated at room temperature for 20 minutes. After washing with distilled water, 33% acetic acid was added to each well and absorbance was taken at 590 nm. Mean absorbance values of each sample was calculated and compared with the mean values of controls.

Expression analysis of *mrkA* gene in *K. pneumoniae* strains under control MIC of free curcumin and curcumin were investigated using the Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) method through specific primers. For this purpose, after treating strains, total RNA was extracted using a high purity RNA extraction kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer protocol. Then, cDNA synthesis was performed through the Qiagen Press Kit based on the manufacturer protocol. The qRT-PCR method was performed using SYBER Green containing Master Mix (Ampriqon, Denmark). The 16S rRNA gene is used as your home gene and the relative expression of the gene was calculated by $\Delta\Delta C_T$ method.

Statistical calculation of this study was performed using Graph pad prism software and the results were analyzed by one way ANOVA. The results are displayed as mean \pm standard deviation (SD) and $P < 0.05$ was considered significant.

Results: In this study, lactose positive and mucoid colonies were isolated from 100 clinical specimens suspected of *K. pneumoniae* and 15 strains of *K. pneumoniae* were isolated using microscopic and biochemical tests. The results of antibiotic resistance showed that 10 samples (66%) had a pattern of multidrug-resistant resistance (MDR). (MDR: strains resistant to one of the antibiotics from three different classes of antibiotics).

Microtiter plate test was used to evaluate the quantitative biofilm formation and the results showed that out of 15 strains of *K. pneumoniae*, all MDR strains (10 strains) formed biofilm, so that 5 strains formed strong biofilm (50%). 3 strains forming moderate biofilm (30%) and 2 strains (20%) forming weak biofilm.

The results of SEM and DLS showed that Al₂O₃ nanoparticles have a polyhedral structure and have an average size of 164.1 nm. The FTIR results also showed the chemical bonds associated with Al₂O₃ nanoparticles. XRD results showed the presence of peaks of 31.8, 35.5, 40.5, 46.7 and 47.98, which confirms the Al₂O₃ nanoparticles.

Antimicrobial and anti-biofilm effects of Al₂O₃ nanoparticles

The results showed that Al₂O₃ nanoparticles had antimicrobial properties at the lowest concentration of 500 $\mu\text{g/ml}$ and the highest concentration of 2000 $\mu\text{g/ml}$. The results of this test showed that Al₂O₃ nanoparticles at sub-inhibitory concentration (sub-MIC) significantly reduced the biofilm formation (light absorption was significantly reduced compared to the control group) ($P < 0.05$).

The results showed that the amplification of the gene was done correctly and the analysis of the melting curve shows the amplification of the target gene. Also, after treatment of biofilm-forming strains with sub-inhibitory concentrations of Al₂O₃ nanoparticles, the expression of *mrkA* gene in all biofilm-forming strains decreased significantly compared to the 16S rRNA reference gene ($P < 0.05$), so that in some Strains expression was reduced 5 to 6-fold.

Conclusion: The results of this study showed that aluminum nanoparticles have antimicrobial and anti-biofilm effects against drug-resistant *K. pneumoniae* strains and can reduce the expression of biofilm gene. Therefore, this nanoparticle can be used as a candidate for antimicrobial and antifouling film for future studies.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Seifi A, Mirzaie A, Ehsani E, Mahmoodzadeh A. Evaluating the antibacterial biofilm inhibitory activity of aluminium (Al₂O₃) nanoparticles against clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Razi J Med Sci. 2021;28(7):37-49.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

اتمهای اکسیژن هستند که بسته بندی نزدیک شش ضلعی را با یونهای آلومینیوم پر می کنند و دارای کاربردهای فراوان در تشخیص، تحویل دارو و اثرات ضد میکروبی می باشد (۱۱). رفتار ضد میکروبی نانوذرات آلومینیوم در برخی از مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است. Mohammad Azam Ansari و همکارانش در سال ۲۰۱۳ اثرات ضد میکروبی نانوذرات اکسید آلومینیوم را علیه سویه های مقاوم به دارو *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این نانوذرات دارای کمترین غلظت مهار کنندگی بین ۱۷۰۰ تا ۳۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بودند. هم چنین سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* هیچ رشدی در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نداشتند (۱۲). تاکنون مطالعات کمی در زمینه بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی نانوذرات اکسید آلومینیوم علیه سویه های بالینی باکتریایی انجام گرفته است و هم چنین به دلیل افزایش بیش از حد مقاومت های آنتی بیوتیکی استفاده از راهکارهای جایگزین جهت درمان این باکتری حایز اهمیت است و بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی نانوذرات اکسید آلومینیوم علیه سویه های بالینی کلبسیلا پنومونیه می باشد.

روش کار

جمع آوری نمونه، جداسازی و شناسایی سویه های کلبسیلا پنومونیه

در این مطالعه تجربی، تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی شامل زخم، خون، ادرار و مایع مغزی نخاعی از بیمارستان های مختلف شهر تهران (بیمارستان امام خمینی و بیمارستان پارس) جمع آوری شد. به دنبال آن، شناسایی سویه های کلبسیلا پنومونیه توسط کشت در محیط های کشت مک کانکی آگار، رنگ آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی شناسایی شد (۱۳).

بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های کلبسیلا پنومونیه توسط روش دیسک دیفیوژن بر اساس استاندارد Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) انجام گرفت. ابتدا غلظت نیم مک

جنس کلبسیلا متعلق به خانواده انتروباکتریاسه می باشد که متشکل از گونه های گرم منفی و فاقد حرکت است که دارای کلنی های مخاطی شکل می باشند و در مجاری گوارشی زیست می کند (۱). جنس کلبسیلا دارای ۴ گونه کلبسیلا پنومونیه، کلبسیلا اکسی توکا، کلبسیلا تری جنا و کلبسیلا پلانیتیکولا می باشد (۲). از میان این گونه ها، کلبسیلا پنومونیه از پاتوژنها فرصت طلب شایع می باشد که بیماری های جدی مانند سپتی سمی، پنومونی، عفونت مجاری ادراری، ناهنجاری های مزمن ریوی و عفونت های فرصت طلب بیمارستانی در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی ایجاد می کنند (۳). این سویه ها به دلیل تولید آنزیم های بتالاکتاماز وسیع الطیف به بساری از آنتی بیوتیک ها مانند آنتی بیوتیک های بتالاکتام، آمینوگلیکوزیدها و فلئوروکینولون ها مقاوم شده اند (۴). یکی از استراتژی های مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های کلبسیلا پنومونیه تشکیل بیوفیلیم می باشد (۵). سویه های کلبسیلا پنومونیه می توانند یک لایه ضخیم از بیوفیلیم خارج سلولی تولید کنند که اتصال باکتری به سطوح زنده و غیرزنده را میانجی گری می کند و باعث ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک ها می شود (۶). یکی از ژنهای مهم در تشکیل بیوفیلیم در این باکتری ژن *mrkA* می باشد و این ژن، پروتئین MrkA را کد می کند که یکی از پروتئین ها مهم فیمبریه تیپ ۳ می باشد (۷). استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک ها باعث مقاومت آنتی بیوتیکی روزافزون این باکتری ها می شود و بنابراین استفاده از جاگزین های درمانی غیر از آنتی بیوتیک حایز اهمیت می باشد. یکی از این راهکارها، استفاده از تکنولوژی نانو می باشد (۸).

نانوتکنولوژی یکی از حوزه های در حال پیشرفت است که کاربردهای فراوان در علم و تکنولوژی به منظور مهندسی مواد جدید دارد. بطور کلی نانوذرات فلزی دارای خصوصیات منحصر به فرد نسبت به فلزات خود می باشند (۹). نانوذرات اکسید فلزی دارای پایداری بیشتر، سمیت کمتر و انتخابی می باشند و یکی از این نانوذرات فلزی، نانوذرات اکسید آلومینیوم می باشد، بطوری که این نانوذرات پایدار ترمودینامیکی در دامنه وسیعی از دما هستند (۱۰). آنها مانند سنگ بنایی با

نانوذرات آلومینیوم از تست‌های FTIR، میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، XRD و DLS استفاده گردید.

میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

بررسی ریخت شناسی و اندازه نانوذرات آلومینیوم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) بررسی شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و مطالعه نقطه به نقطه، جهت بررسی اندازه و مورفولوژی نانوذرات پس از پوشش دهی با آلومینیوم در ولتاژ زیر 30 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 آلومینیوم مورد تصویربرداری SEM قرار گرفت. دستگاه لایه نشانی آلومینیوم Sputter coater، ساخت شرکت KYKY و مدل دستگاه SBC12 بود.

الگوی پراش اشعه ایکس (XRD)

به منظور تعیین فازهای بلورین (کریستالی) نانوذرات آلومینیوم شده هم چنین اندازه گیری ثابت‌های کریستالی نانوذرات آلومینیوم از الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) نمونه‌ها استفاده شد. تفرق اشعه ایکس امکان شناخت نوع ساختار کریستالوگرافی نانوذرات آلومینیوم را فراهم می‌کند. در این مطالعه آزمون اشعه ایکس توسط دستگاه XRD با تشعشع لامپ CuKa، در دامنه 0 تا 110 درجه انجام شد.

طیف‌سنجی FTIR

جهت تشخیص شناسایی پیوندهای شیمیایی ایجاد شده از دستگاه مادون قرمز (Thermo Nicolet مدل Nexus 870) ساخت کشور آمریکا) استفاده شده است.

بررسی اثرات ضد میکروبی

به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات آلومینیوم، روش میکرودايلوشن در پلیت 96 خانه ای بر طبق استاندارد CLSI استفاده شد. به این منظور ابتدا سوبه های کلبسیلا پنومونیه در محیط کشت مولر هینتون برات به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد کشت داده شدند. نانوذره در غلظت های 250 میکروگرم در هر میلی لیتر تا 2000 میکروگرم در هر میلی لیتر به داخل چاهک ها ریخته و با محیط کشت مولر هینتون برات (MHB : Mueller-Hinton)

فارلند از تمامی سوبه‌ها تهیه شد و در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و میزان حساسیت سوبه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامایسین، آمیکاسین، تتراسایکلین، سفپیم، سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و تری متوپریم سولفامتاکسازول (پادتن طب-ایران) بررسی شد (14).

بررسی تولید بیوفیلم

به منظور بررسی وجود بیوفیلم در سوبه های کلبسیلا پنومونیه، از روش سنجش کمی میکروتیتربلیت استفاده شد. به این منظور ابتدا باکتری های جداسازی شده در محیط کشت تریپتیکاس سوی برات (TSB) به مدت 24 ساعت کشت داده شدند. به دنبال آن از هر باکتری میزان 2 میکرولیتر به 198 میکرولیتر از محیط کشت TSB در پلیت‌های 96 خانه ای میکروتیتربلیت اضافه گردید و به مدت 24 ساعت انکوبه گذاری در دمای 37 درجه سانتی گراد انجام شد. به دنبال آن، تمامی چاهک های پلیت با 200 میکرولیتر از بافر فسفات سالین (PBS) سه مرتبه شستشو داده شدند. چاهک ها با 50 میکرولیتر از کریستال ویوله 0.1٪ رنگ شدند و به دنبال شستشو با آب PBS سه مرتبه انجام شد. در نهایت میزان 200 میکرولیتر از ایزوپروپانول 0.5٪ به چاهک اضافه گردید و میزان جذب نوری (OD) در طول موج 570 نانومتر اندازه گیری گردید و بر اساس میزان OD باکتری ها به 4 دسته بیوفیلم قوی، بیوفیلم متوسط، بیوفیلم ضعیف و بیوفیلم منفی تقسیم بندی شدند. هم چنین در این روش، از چاهک حاوی 200 میکرولیتر محیط کشت TSB به عنوان کنترل منفی استفاده گردید (15).

نانوذرات آلومینیوم و بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی

در این مطالعه نانوذرات آلومینیوم (Al_2O_3) از شرکت آمریکایی US nano با مشخصات زیر خریداری شد:

- نانو پودر اکسید آلومینیوم آلفا
- سایز نانو ذرات 50 نانومتر
- دسته نانوذرات اکسیدی
- درجه خلوص: 99.9٪
- دانسیته نانوذره: 3.97 g/cm^3
- رنگ نانوذره: سفید

به منظور بررسی خصوصیات فیزیکی شیمیایی

در نظر گرفته شد (۱۷).

بررسی اثرات نانوذرات بر بیان ژن بیوفیلیم *mrkA*

به منظور بررسی اثر نانوذرات آلومینیوم بر میزان تغییرات بیان ژن بیوفیلیم *mrkA* در سویه های تشکیل دهنده بیوفیلیم، از روش quantitative Real Time PCR استفاده شد. به این منظور ابتدا سویه های کلبسیلا پنومونیه با غلظت زیر حد مهار کنندگی (*Sub-MIC*) تیمار شدند و RNA سلول توسط کیت استخراج RNA (Takara, Japan) استخراج گردید. RNA های استخراج شده توسط کیت سنتز cDNA (Takara, Japan) به DNA مکمل (cDNA) تبدیل گردید. جهت انجام تست Real Time PCR، از پرایمر اختصاصی ژن هدف *mrkA* استفاده نموده و ژن *16S rRNA* به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرهای رفت و برگشت (Forward and reverse) ژن هدف *mrkA* به صورت 5'-TGCCAGTTCGCCACTAAC-3' رفت، و 5'-GACAACAATAACCGGGATGG-3' برگشت، بود. توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن مرجع *16S rRNA* به صورت 5'-CGTCTGCCCTATCAACTTTCG-3' رفت، و 5'-CGTTTCTCAGGCTCCCTCT-3' برگشت است. در ادامه، اختلاف چرخه های آستانه به دست آمده از نمونه های مورد آزمایش (نمونه های تیمار شده با نانوذره) و نمونه های کنترل (نمونه های تیمار نشده با نانوذره) محاسبه و میزان بیان ژن با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع (*16S rRNA*) از طریق $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار Graph pad prism انجام گردید و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و تفاوت بیان ژن های هدف، بین نمونه های کنترل و تیمار شده با روش آماری Tukey's HSD post-hoc test محاسبه گردید. نتایج به صورت mean \pm standard deviation (SD) نمایش داده شده اند و $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

(broth) (مرک-آلمان)، تا حجم ۱۹۵ میکرولیتر رسانده شد. همه چاهک ها با مقدار ۵ میکرولیتر از کشت میکروبی سویه های کلبسیلا پنومونیه با غلظت نیم مک فارلند اضافه گردید. مقدار MIC (Minimum Inhibitory Concentration) به عنوان کمترین غلظت مهار کننده رشد باکتری محسوب می شود. لازم به ذکر است که جهت تعیین غلظت MIC، از چاهک حاوی باکتری فاقد نانوذره به عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی نانو ذره به همراه محیط کشت به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (۱۶).

بررسی اثرات ضد بیوفیلیمی نانوذرات

به منظور مطالعه کمی اثرات ضد بیوفیلیمی نانوذرات آلومینیوم از روش میکروتیتر پلیمت استفاده شد. ابتدا از باکتری های مورد مطالعه یک کشت ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط کشت جامد ائوزین متیلن بلو آگار (EMB agar) تهیه گردید و سپس از باکتری های رشد یافته سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند تهیه گردید. سپس از هر سویه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به داخل چاهک ها ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گرفت. به دنبال آن، مقدار ۵۰ میکرولیتر از غلظت زیر حد مهار کنندگی (*Sub-MIC*) نانوذرات آلومینیوم به چاهک ها اضافه گردید و پلیمت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محلول رویی چاهک ها را خارج گردید و هر چاهک ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شسته شد. سپس باکتری های متصل به دیواره با ۲۵۰ میکرولیتر از اتانل ۹۶٪ تثبیت شدند. بعد از خشک شدن پلیمت ها، به آن ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله اضافه گردید. بعد از گذشت این مدت زمان، رنگ های اضافی با استفاده از PBS شسته شدند. بعد از خشک کردن پلیمت ها، سنجش کمی بیوفیلیم بوسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به هر چاهک صورت گرفت و جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader (JASCO, V-530، ژاپن) خوانده شد. از محیط کشت TSB بدون تلقیح باکتری به عنوان کنترل منفی و از چاهک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری به عنوان کنترل مثبت

یافته‌ها

شناسایی سویه‌های کلبسیلا پنومونیهو الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی

در این مطالعه از بین ۱۰۰ نمونه بالینی مشکوک به کلبسیلا پنومونیه، کلنی‌های لاکتوز مثبت و موکوییدی جداسازی شد و با استفاده از تست‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی تعداد ۱۵ سویه کلبسیلا پنومونیه جداسازی گردید. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که تعداد ۱۰ نمونه (۶۶ درصد) دارای الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی (MDR: multidrug-resistant) بودند. MDR: سویه‌های دارای مقاومت به یکی از آنتی‌بیوتیک‌ها از سه خانواده مختلف آنتی‌بیوتیکی (جدول ۱).

بررسی تشکیل بیوفیلم

به منظور بررسی تشکیل کمی بیوفیلم از تست میکروتیتراپلیت استفاده گردید و نتایج نشان داد که از میان ۱۵ سویه کلبسیلا پنومونیه، تمامی سویه‌های MDR (۱۰ سویه) تشکیل دهنده بیوفیلم بودند، بطوری که تعداد ۵ سویه تشکیل دهنده قوی بیوفیلم (۵۰٪)، ۳ سویه تشکیل دهنده بیوفیلم متوسط (۳۰٪) و ۲ سویه تشکیل دهنده بیوفیلم ضعیف بودند (شکل ۱).

تعیین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوذرات آلومینیوم

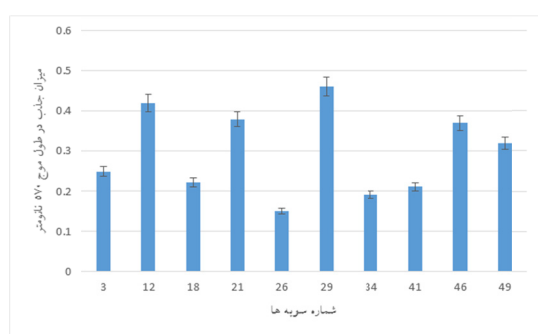
نتایج میکروسکوپ الکترونی نگاره و DLS نشان داد که نانوذرات آلومینیوم دارای ساختار چندوجهی و دارای میانگین اندازه ۱۶۴/۱ نانومتر می‌باشند (شکل ۲). هم چنین نتایج FTIR پیوندهای شیمیایی مربوط به نانوذرات آلومینیوم را نشان داد (شکل ۳). پیک‌های ۴۶۷، ۵۸۳ و ۶۸۲ نشان دهنده پیوندهای کششی Al-O در حالت اکتاهیدرال می‌باشد. هم چنین پیک‌های ۷۲۸ و ۱۰۶۵ به ترتیب نشان دهنده پیوندهای کششی Al-O در حالت تتراهیدرون و پیوند Al-O-H می‌باشد. نتایج XRD وجود پیک‌های ۳۱/۸، ۳۵/۵، ۴۰/۵ و ۴۶/۷ و ۴۷/۹۸ را نشان داد که تایید کننده نانوذرات آلومینیوم می‌باشد (شکل ۴).

بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی نانوذرات آلومینیوم

در این مطالعه، به منظور بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات آلومینیوم علیه سویه‌های تشکیل دهنده

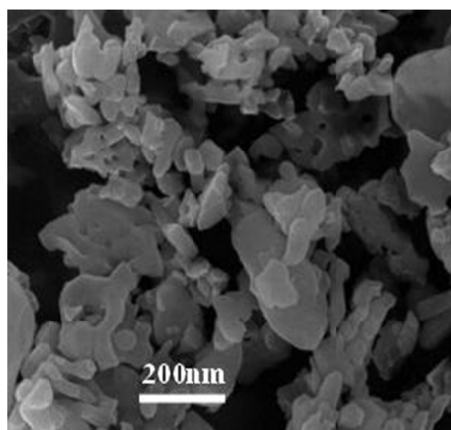
جدول ۱- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های کلبسیلا پنومونیه

شماره سویه	الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی	مقاوم به چند دارو (MDR)
۳	آمپی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، سولفامتازول	+
۱۲	تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین	+
۱۸	آمپی‌سیلین، سفپیم، لوفلوکساسین، سولفامتازول	+
۲۱	آمیکاسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین	+
۲۶	آمیکاسین، تتراسایکلین، سفپیم، تری متوپریم سولفامتازول	+
۲۹	آمپی‌سیلین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، تری متوپریم سولفامتازول	+
۳۴	آمپی‌سیلین، جنتامایسین، تتراسایکلین، لوفلوکساسین	+
۴۱	جنتامایسین، آمیکاسین، تتراسایکلین، لوفلوکساسین	+
۴۶	آمیکاسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، لوفلوکساسین	+
۴۹	آمپی‌سیلین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین، تری متوپریم سولفامتازول	+

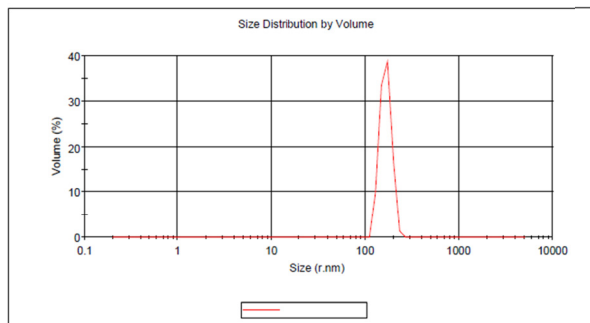


شکل ۱- میزان جذب سویه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر. نتایج نشان می‌دهد که تمامی سویه‌ها تشکیل دهنده بیوفیلم هستند.

بیوفیلم از روش MIC استفاده شد. در روش MIC، سویه‌های باکتریایی تحت غلظت‌های ۱۲۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر تا ۱۵۰۰ میکروگرم در هر قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نانوذرات آلومینیوم در کمترین غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و بیشترین غلظت



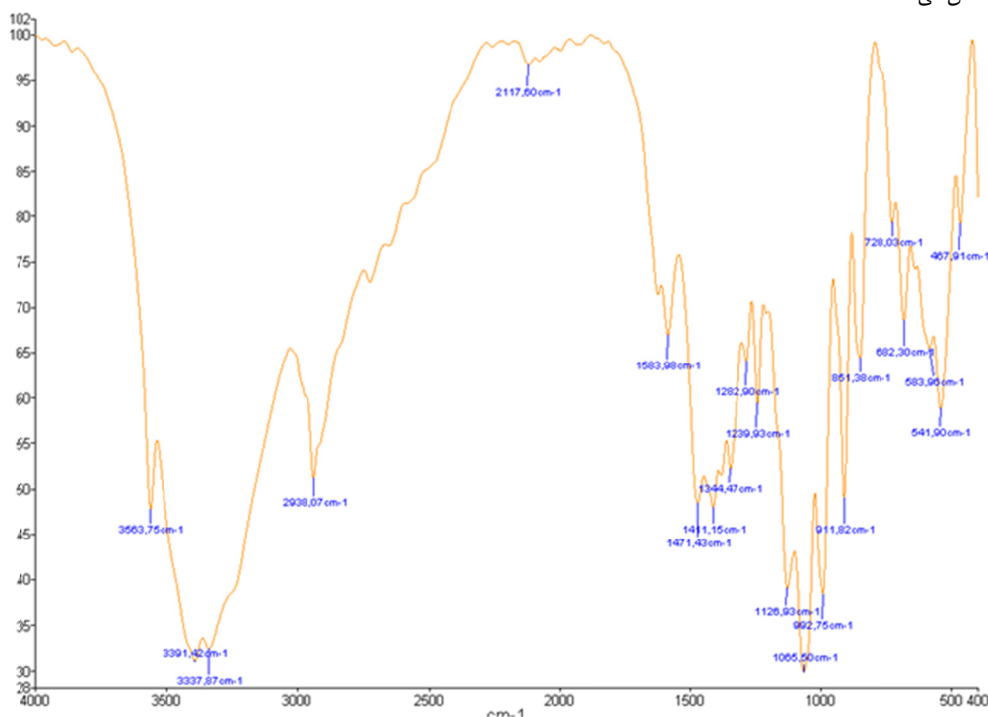
	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (r.nm): 397.7	Peak 1: 164.1	100.0	22.15
Pdl: 0.693	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.984	Peak 3: 0.000	0.0	0.000



a

b

شکل ۲- (a): میکروگراف میکروسکوپ الکترونی نگاره که ساختار چندوجهی نانوذرات آلومینیوم را نشان می‌دهد و (b): DLS نانوذرات آلومینیوم که اندازه ۱۶۴/۱ نانومتر را نشان می‌دهد.



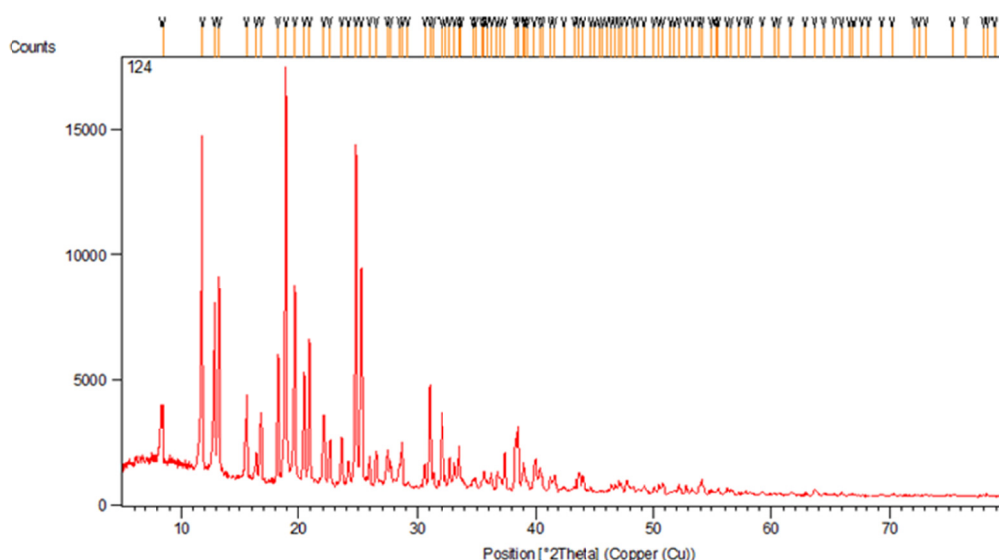
شکل ۳- FTIR نانوذرات آلومینیوم. پیک‌های ۴۶۷ cm⁻¹، ۵۸۳ cm⁻¹ و ۶۸۲ cm⁻¹ نشان دهنده پیوندهای کششی Al-O در حالت اکتاهیدرال می‌باشد. هم چنین پیک‌های ۷۲۸ cm⁻¹ و ۱۰۶۵ cm⁻¹ به ترتیب نشان دهنده پیوندهای کششی Al-O در حالت تتراهیدرون و پیوند Al-O-H می‌باشد.

گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود) ($P < 0.05$) (شکل ۵).

بررسی میزان بیان ژن بیوفیلم mrka

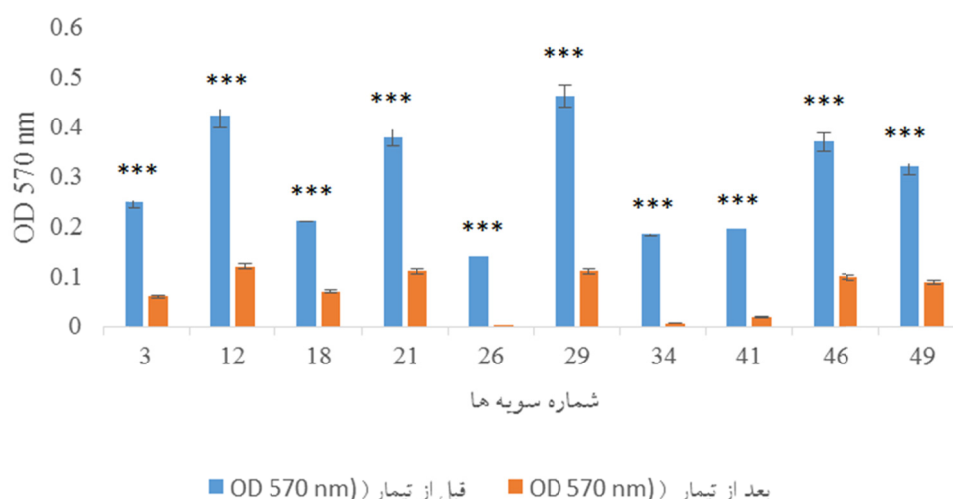
به منظور بررسی اثرات نانوذرات آلومینیوم بر روی بیان ژن بیوفیلم mrka از روش Real Time PCR استفاده گردید. بدین منظور ابتدا سویه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم تحت تاثیر غلظت‌های sub-MIC قرار

۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر خاصیت ضد میکروبی داشتند (جدول ۲). هم چنین به منظور بررسی اثرات ضد بیوفیلمی نانوذرات آلومینیوم از روش میکروتیتراپلیم استفاده شد. نتایج این تست نشان داد نانوذرات آلومینیوم در غلظت زیر حد مهار کنندگی (sub-MIC) بطور معناداری میزان تشکیل بیوفیلم را کاهش دادند (میزان جذب نوری بطور معناداری در مقایسه با



شکل ۴- XRD نانوذرات آلومینیوم. وجود پیک های ۳۱/۸، ۳۵/۵، ۴۰/۵ و ۴۶/۷ و ۴۷/۹۸ را نشان داد که تایید کننده نانوذرات آلومینیوم می باشد.

نمودار بررسی اثرات ضدبیوفیلمی نانوذرات آلومینیوم



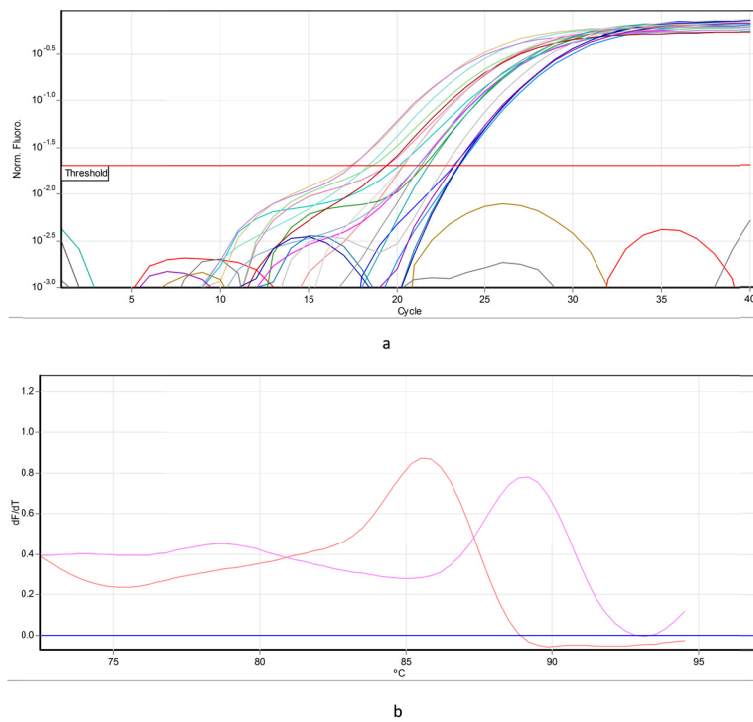
شکل ۵- بررسی اثرات ضدبیوفیلمی نانوذرات آلومینیوم توسط روش میکرو تیترا پلیت. داده بصورت مقایسه با نمونه قبل از تیمار مقایسه شده اند (***) $P < 0.001$ ، اختلاف معناداری با گروه قبل از تیمار (کنترل: $n=3$). نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه مورد بررسی قرار گرفت. ستون افق مربوط به شماره سویه های کلبسیلا پنومونیه و محور عمودی میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر را نشان می دهد (میزان تشکیل بیوفیلم). ستون های با رنگ آبی مربوط به سویه های کلبسیلا پنومونیه قبل از تیمار با نانوذرات و ستون های با رنگ نارنجی مربوط به همان سویه ها بعد از تیمار با نانوذرات آلومینیوم می باشد.

نسبت به ژن مرجع *16S rRNA* کاهش معناداری داشته است ($P < 0.05$)، بطوری که در برخی از سویه ها میزان بیان به میزان ۵ تا ۶ برابر کاهش یافته بود (شکل ۷).

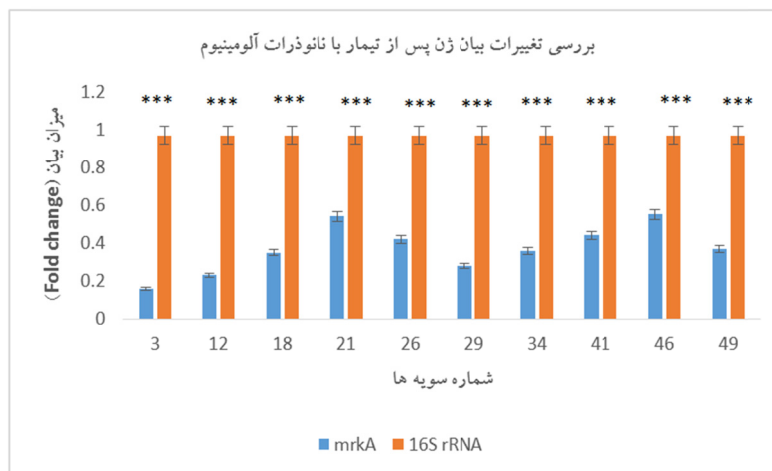
بحث و نتیجه گیری

علی رغم تولید نسل های جدید آنتی بیوتیک علیه سویه های کلبسیلا پنومونیه، این باکتری هنوز به عنوان

گرفتند و میزان بیان ژن *mrkA* را مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که تکثیر ژن به درستی صورت گرفته است و آنالیز منحنی ذوب نشان دهنده تکثیر ژن هدف می باشد (شکل ۶). هم چنین، پس از تیمار سویه های تشکیل دهنده بیوفیلم با غلظت زیرحدمهارکنندگی نانوذرات آلومینیوم میزان بیان ژن *mrkA* در تمامی سویه های تشکیل دهنده بیوفیلم



شکل ۶- a: نمودار تکثیر ژن *mrkA* و *16S rRNA* در نمونه های تیمار شده با نانوذرات آلومینیوم. b: آنالیز منحنی ذوب ژن *mrkA* و *16S rRNA*. رنگ قرمز مربوط به ژن *16S rRNA* و رنگ بنفش مربوط به ژن *mrkA* می باشد.



شکل ۷- بررسی تغییرات بیان ژن *mrkA* پس از تیمار سویه ها با نانوذرات آلومینیوم. میزان بیان ژن بیوفیلیم *mrkA* در سویه ها پس از تیمار با نانوذرات آلومینیوم روی بطور معناداری کاهش یافته اند (*** $P < 0.001$) (اختلاف معناداری با گروه کنترل :: $n=3$). نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه مورد بررسی قرار گرفت. محور افقی شماره سویه های کلبسیلا پنومونیه و محور عمودی میزان بیان ژن می باشد. ستون های نارنجی رنگ مربوط به ژن کنترل و ستون آبی رنگ مربوط به ژن *mrkA* می باشد.

سویه های عفونت زای کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو هستند (۱۹). هم چنین یکی از دلایل مقاوم به چند دارو بودن سویه های کلبسیلا پنومونیه تشکیل بیوفیلیم می باشد، بطوریکه بیوفیلیم ها مانع از ورود آنتی بیوتیک ها به درون ساختار بیوفیلیم می شوند. بنابراین، محققان و شرکت های داروسازی در پی توسعه

یکی از مهمترین سویه های تشکیل دهنده عفونت های بیمارستانی با میزان مرگ و میر بالا مطرح می باشد (۱۸). در حال حاضر این باکتری به عنوان یکی از پاتوژن های جهانی مطرح می باشد که نسبت به چنددارو مقاوم بوده (MDR) بخصوص به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزید و کوئینولون ها. بر طبق مطالعات، ۵۲٪ از

جدول ۲- میزان MIC نانوذرات آلومینیوم علیه سویه های تشکیل دهنده بیوفیلیم

شماره سویه	غلظت MIC (میکروگرم در میلی لیتر)	غلظت Sub-MIC (میکروگرم در میلی لیتر)
۳	۱۰۰۰	۵۰۰
۱۲	۱۰۰۰	۵۰۰
۱۸	۲۰۰۰	۱۰۰۰
۲۱	۱۰۰۰	۵۰۰
۲۶	۵۰۰	۲۵۰
۲۹	۱۰۰۰	۵۰۰
۳۴	۲۰۰۰	۱۰۰۰
۴۱	۵۰۰	۲۵۰
۴۶	۱۰۰۰	۵۰۰
۴۹	۲۰۰۰	۱۰۰۰

در ادامه اثرات ضدبیوفیلیمی نانوذرات آلومینیوم علیه سویه های کلبسیلا پنومونیه تشکیل دهنده بیوفیلیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوذرات آلومینیوم در غلظت زیرحد مهارکنندگی دارای اثرات ضدبیوفیلیمی معناداری نسبت به گروه کنترل بودند. نتایج مطالعه ما با بسیاری از مطالعات دیگر تشابه داشت. Chrzanowska و همکارانش اثرات ضدبیوفیلیمی نانوذرات آلومینیوم را علیه سویه های تشکیل دهنده بیوفیلیم و پلانکتونی سودوموناس پوتیدا و آئروموناس هیدروفیلا مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات آلومینیوم دارای اثرات ضدبیوفیلیمی بوده بطوریکه مقاومت سویه های تشکیل دهنده بیوفیلیم نسبت به نانوذرات بیشتر از سلول های پلانکتونی بودند (۲۳). مطالعات نشان داده است که اثرات ضدبیوفیلیمی نانوذرات آلومینیوم دارای اثرات ضدبیوفیلیمی در غلظت ۱/۶ تا ۳/۲ میلی گرم در میلی لیتر می باشد (۲۴). هم چنین تیمار ۲ میلی گرم در میلی لیتر از نانوذرات آلومینیوم از رشد سویه های تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف و متالوبیتالاکتاماز بطور کامل مهار به عمل آورده می آورد (۲۵). مطالعات نشان داده است که اثرات ضد میکروبی ارتباط مستقیمی با اثرات ضدبیوفیلیمی دارد. هم چنین، نوع روش سنتز نانوذره، سایز و شکل آن در اثرات ضد میکروبی و ضدبیوفیلیمی دارد (۲۶).

مکانیسم اثرات ضدبیوفیلیمی نانوذرات آلومینیوم در برخی از مطالعات به آن اشاره شده است. مطالعات نشان داده است که نانوذرات آلومینیوم ابتدا به سطح بیوفیلیم متصل می شوند و به دنبال آن به داخل ساختار ماتریکس بیوفیلیم مهاجرت می کنند. نوع اتصال نانوذرات به بیوفیلیم به بار سطحی بیوفیلیم و پتانسیل زتا نانوذره بستگی دارد. به محض ورود نانوذرات به داخل بیوفیلیم باعث تخریب مکانیکی دیواره سلولی شده و استرس اکسیداتیو را در سلول ایجاد کرده و عملکرد پروتئین های سلولی را مختل می کند (۲۷).

یکی از اهداف این مطالعه بررسی اثرات نانوذرات آلومینیوم بر بیان ژن بیوفیلیم *mrkA* بود. نتایج نشان داد که نانوذرات آلومینیوم میزان بیان ژن بیوفیلیم *mrkA* بطور معناداری نسبت به ژن مرجع کاهش داده است. به نظر می رسد یکی از مکانیسم های کاهش بیان

راهکارهای جدید جهت درمان این باکتری می باشند (۲۰). یکی از این راهکارها، استفاده از تکنولوژی نانو و نانوذرات فلزی می باشد. یکی از این نانوذرات، نانوذرات آلومینیوم می باشد که رفتار ضد میکروبی آن در بسیاری از مقالات مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۱). در این مطالعه نانوذرات آلومینیوم ابتدا توسط روش های میکروسکوپ الکترونی نگاره، DLS، FTIR و XRD تعیین ماهیت شدند و به دنبال آن اثرات ضد میکروبی آن علیه سویه های کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوذرات آلومینیوم دارای اثرات ضد میکروبی معناداری علیه سویه های کلبسیلا پنومونیه بودند بطوریکه میزان MIC بین ۵۰۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود و هیچ گونه ارتباطی بین سویه های تشکیل دهنده قوی بیوفیلیم و غلظت MIC وجود نداشت و این نشان دهنده ورود تسهیل شده نانوذرات آلومینیوم به درون ساختار بیوفیلیم و مرگ سول های باکتریایی بود. Sawai و همکارانش نشان دادند که نانوذرات آلومینیوم در غلظت های ۶۲/۵ و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر بر روی سویه های اشرشیا کلی خاصیت مهارکنندگی دارد. مطالعات نشان می دهد که نانوذرات آلومینیوم نه تنها به سطح غشای سلولی متصل می شوند بلکه به داخل سلول های میکروبی نفوذ می کنند و در غشای باکتری حفره ایجاد می کنند. ایجاد حفره در غشا باعث افزایش نفوذپذیری غشا شده و در ادامه تنظیم ورود و خروج مختل شده و مرگ سلول اتفاق می افتد (۲۲).

Zagieboylo AP. Adaptive evolution of virulence and persistence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Nat Med. 2020;26(5):705-711.

3. Yang X, Dong N, Chan EW, Zhang R, Chen S. Carbapenem resistance-encoding and virulence-encoding conjugative plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. Trends Microbiol. 2021;29(1):65-83.

4. Liao W, Liu Y, Zhang W. Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: A review over the last 10 years. J Glob Antimicrob Resist. 2020;23:174-180.

5. Ashurst JV, Dawson A. *Klebsiella* Pneumonia. 2021. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

6. Sá-Pessoa J, Przybyszewska K, Vasconcelos FN, Dumigan A, Frank CG, Hopley L, Bengochea JA. *Klebsiella pneumoniae* Reduces SUMOylation To Limit Host Defense Responses. mBio. 2020;11(5):e01733-20.

7. Fang R, Liu H, Zhang X, Dong G, Li J, Tian X, Wu Z, Zhou J, Cao J, Zhou T. Difference in biofilm formation between carbapenem-resistant and carbapenem-sensitive *Klebsiella pneumoniae* based on analysis of mrkH distribution. Microb Pathog. 2021;152:104743.

8. Shumail H, Khalid S, Ahmad I, Khan H, Amin S, Ullah B. A Review on green synthesis of silver nanoparticles through plants. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2020;29:2-13.

9. AlNadhari S, Al-Enazi NM, Alshehrei F, Ameen F. A review on biogenic synthesis of metal nanoparticles using marine algae and its applications. Environ Res. 2021;194:110672.

10. Liubov Shkodenko, Iliia Kassirov, Elena Koshel. Metal Oxide Nanoparticles Against Bacterial Biofilms: Perspectives and Limitations. Microorganisms. 2020;8(10):1545.

11. Rabajczyk A, Zielecka M, Cygańczuk K, Pastuszka Ł, Jurecki L. Nanometals-Containing Polymeric Membranes for Purification Processes. Materials (Basel). 2021;14(3):513.

12. Mohammad Azam Ansari, Haris M. Khan, Aijaz A. Khan, Ruchita Pal & Swaranjit Singh Cameotra. Antibacterial potential of Al₂O₃ nanoparticles against multidrug resistance strains of *Staphylococcus aureus* isolated from skin exudates. J Nano Res. 2013;15:1970.

13. Li G, Shi J, Zhao Y, Xie Y, Tang Y, Jiang X, Lu Y. Identification of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates using the string test in combination with *Galleria mellonella* infectivity. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020;39(9):1673-1679.

14. Hsueh PR, Ko WC, Wu JJ, Lu JJ, Wang FD, Wu HY, et al. Consensus statement on the adherence to clinical and laboratory standards institute (CLSI) antimicrobial susceptibility testing guidelines (CLSI-2010 and CLSI-2010-update) for Enterobacteriaceae

ژن بیوفیلم *mrkA* برهم کنش نانوذرات آلومینیوم با فاکتورهای رونویسی میزبان می باشد که باعث کاهش رونویسی ژن *mrkA* می شود. مطالعات مختلفی در زمینه بررسی اثرات نانوذرات فلزی بر بیان ژن بیوفیلم انجام شده است. نوید کلهر و همکارانش اثرات ضد بیوفیلیمی نانوذرات اکسید روی را بر روی ایزوله های کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات اکسید روی میزان بیان ژن بیوفیلم *wzm* را به طور معناداری (۵ برابر) در سویه های کلبسیلا پنومونیه کاهش داده است که مشابه با نتایج ما بوده است (۲۸). Khosravi و همکارانش اثرات ضد بیوفیلیمی نانوذرات طلا و هم چنین تاثیر آن بر بیان ژن بیوفیلم را در سویه های کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات طلا دارای اثرات معنادار ضد بیوفیلیمی بوده و میزان بیان ژن های بیوفیلم *mrkA* و *wzm* را کاهش می دهد که منطبق با نتایج مطالعه ما بوده است (۲۹).

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات آلومینیوم دارای اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی علیه سویه های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو می باشد و میتواند بیان ژن بیوفیلم را کاهش دهد. بنابراین میتوان از این نانوذره به عنوان کاندید ماده ضد میکروب و ضد بیوفیلم جهت مطالعات آینده استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد با کد اخلاق 25.196 IR.IAU. TMB.REC. می باشد. محققان این مقاله از همکاران آزمایشگاه های بیمارستان کمک کننده که در جمع آوری و کشت اولیه نمونه ها ما را یاری نمودند و هم چنین از زحمات بی دریغ پرسنل آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(17):6278.
2. Ernst CM, Braxton JR, Rodriguez-Osorio CA,

- in clinical microbiology laboratories in Taiwan. *J Micro Immun Infect*. 2010;43(5):452-5.
15. Jin-xin Zheng, Zhi-wei Lin. Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of wcaG. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:21.
 16. Dube P, Meyer S, Madiehe A, Meyer M. Antibacterial activity of biogenic silver and gold nanoparticles synthesized from *Salvia africana-lutea* and *Sutherlandia frutescens*. *Nanotechnology*. 2020;31(50):505607.
 17. Porter GC, Tompkins GR, Schwass DR, Li KC, Waddell JN, Meledandri CJ. Anti-biofilm activity of silver nanoparticle-containing glass ionomer cements. *Dent Mater*. 2020;36(8):1096-1107.
 18. Yang X, Dong N, Chan EW, Zhang R, Chen S. Carbapenem resistance-encoding and virulence-encoding conjugative plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Trends Microbiol*. 2021;29(1):65-83.
 19. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(17):6278.
 20. Siddique MH, Aslam B, Imran M, Ashraf A, Nadeem H, Hayat S, Khurshid M, Afzal M, Malik IR, Shahzad M, Qureshi U, Khan ZUH, Muzammil S. Effect of silver nanoparticles on biofilm formation and EPS production of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Biomed Res Int*. 2020;2020:6398165.
 21. Denes E, Barrière G, Poli E, Lévêque G. Alumina Biocompatibility. *J Long Term Eff Med Implants*. 2018;28(1):9-13.
 22. Sawai J, Kojima H, Igarashi H, Hashimoto A, Shoji S, Sawaki T, Hakoda A, Kawada E, Kokugan T, Shimizu M. Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2000;16:187-194.
 23. Chrzanowska N, Załeska-Radziwiłł M. The impacts of aluminum and zirconium nano-oxides on planktonic and biofilm bacteria. *Desalin. Water Treat*. 2014;52:3680-3689.
 24. Ansari M.A, Khan HM, Alzohairy MA, Jalal M, Ali SG, Pal R, Musarrat J. Green synthesis of Al₂O₃ nanoparticles and their bactericidal potential against clinical isolates of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2015;31:153-164.
 25. Malka E, Perelshtein I, Lipovsky A, Shalom Y, Naparstek L, Perkas N, Patick T, Lubart R, Nitzan Y, Banin E. Eradication of multi-drug resistant bacteria by a novel zn-doped CuO nanocomposite. *Small*. 2013;9:4069-4076.
 26. Anaya-Esparza LM, González-Silva N, Yahia EM, González-Vargas OA, Montalvo-González E, Pérez-Larios A. Effect of TiO₂-ZnO-MgO mixed oxide on microbial growth and toxicity against *Artemia salina*. *Nanomaterials*. 2019;9:992.
 27. Sadiq IM, Chowdhury B, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* to alumina nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med*. 2009;5:282-286.
 28. Kalhor N, Mirzaie A, Hamdi SMM. Anti-biofilm effects of zinc oxide nanoparticles synthesized by leaf extract of *Typha latifolia* on biofilm gene expression in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *J Rafsanjan Uni Med Sci*. 2021;20:3-22.
 29. Khosravi M, Mirzaie A, Kashtali AB, Noorbazargan H. Antibacterial, anti-efflux, anti-biofilm, anti-slime (exopolysaccharide) production and urease inhibitory efficacies of novel synthesized gold nanoparticles coated Anthemis atropatana extract against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Arch Microbiol*. 2020;202(8):2105-2115.