



سنتر سبز نانوذرات نقره توسط عصاره گیاه تلخه و تاثیر مهارکنندگی آن بر روی پمپ افلاکسی در جدایه‌های بالینی *اسیتوباکتر بامانی*

ریحانه بهداد^۱، امیر میرزایی^۲، شهره زارع کاریزی^{۳*}

^۱ کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران، ^۲ استادیار، گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران، ^۳ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: پمپ‌های افلاکس یکی از دلایل مهم مقاومت سویه‌های باکتریایی *اسیتوباکتر بامانی* به آنتی‌بیوتیک به شمار می‌آیند. هدف از این مطالعه، سنتر سبز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه تلخه و بررسی اثرات ضدپمپ افلاکسی آن در جدایه‌های بالینی مقاوم به دارو *اسیتوباکتر بامانی* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا نانوذرات نقره با استفاده از عصاره الکلی گیاه تلخه سنتر گردیدند. در ادامه ساختمان نانوذرات تولید شده توسط روش‌های اسپکتروفتومتری (UV-Vis)، تفرق اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و گذاره (TEM) تایید شدند. وجود پمپ افلاکس adeAC در ۲۱ جدایه بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک *اسیتوباکتر بامانی* توسط روش کارت ویل و واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (PCR) ارزیابی شد. در نهایت اثرات ضدپمپ افلاکسی نانوذرات نقره با روش حداقل غلظت بازدارنده (MIC) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نانوذرات نقره سنتر شده توسط جذب بیشینه در طول موج ۴۲۰ نانومتر در روش UV-Vis مورد تایید قرار گرفتند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM نشان داد که نانوذرات نقره کروی شکل و دارای میانگین اندازه ۳۸/۸۹ نانومتر می‌باشند. هم‌چنین نتایج XRD ساختار مکعبی نانوذره سنتر شده را تایید می‌کند. نتایج روش کارت ویل و PCR نشان داد که از میان ۲۱ جدایه *اسیتوباکتر بامانی*، ۱۲ سویه دارای پمپ افلاکس فعال هستند. هم‌چنین، میزان MIC اتیدیوم بروماید در سویه‌های مقاوم به همراه نانوذرات نقره با کاهش همراه بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات ضدپمپ افلاکسی نانوذرات نقره سنتر شده در سویه‌های *اسیتوباکتر بامانی* به نظر می‌رسد که این نانوذره پتانسیل استفاده در صنایع دارویی را دارد اما مطالعات بیشتر در این زمینه مورد نیاز می‌باشد.

واژگان کلیدی: *اسیتوباکتر بامانی*، پمپ افلاکس، گیاه تلخه، نانوذرات نقره.

دریافت مقاله: دی ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: اسفند ماه ۹۵

مقدمه

بخش‌های جراحی، سوختگی و مراقبت‌های ویژه می‌شود (۱). *اسیتوباکتر بامانی* توانایی زیادی در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی داشته و در نهایت منجر به پیدایش مقاومت چند دارویی می‌شود (۲). در ابتدا تصور می‌شد که مقاومت به چند دارو در این سویه‌ها عمدتاً به دلیل کسب افقی ژن‌های مقاومت باشد. در حالی که اخیراً مشخص شده که پمپ‌های افلاکس نقش

اسیتوباکتر بامانی (*Acinetobacter baumannii*) یکی از عوامل بیماری‌زای فرصت طلب است که در سال‌های اخیر نقش فزاینده‌ای در عفونت‌های بیمارستانی داشته و به صورت گسترده‌ای موجب عفونت در بیماران بستری به خصوص در

* آدرس برای مکاتبه: ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، پیشوا، گروه زیست شناسی
تلفن: ۰۲۱۳۶۷۲۵۰۱۱ پست الکترونیک: s.zarekarizi@iauaramin.ac.ir

زیست و ارزان قیمت تولید نمایند. از جمله گیاهانی که می‌توان از آن برای سنتز نانوذرات نقره استفاده کرد، گیاه تلخه (*Acroptilon repens*) می‌باشد. گیاه تلخه، گیاهی چند ساله از خانواده کاسنی، تلخ مزه و جزء گیاهان زمین‌های بایر می‌باشد. گیاه تلخه را می‌توان در مناطق نیمه خشک تا نیمه مرطوب ایران مشاهده نمود (۱۴ و ۱۵). تاکنون مطالعه‌ای در زمینه سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از گیاه تلخه انجام نشده است. هدف از این مطالعه سنتز سبز نانوذرات نقره توسط عصاره گیاه تلخه، بررسی حضور ژن‌های *adeA* و *adeC* در سویه‌های بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک *اسیتوباکتر بامانی* و بررسی اثرات ضد پمپ افلاکسی نانوذره نقره سنتز شده در سویه‌های *اسیتوباکتر بامانی* بود.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری: این مطالعه تجربی از فروردین ماه تا مرداد ماه ۱۳۹۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین انجام گرفت. گیاه تلخه از مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه گردید و سپس در شرایط بهینه نگه‌داری شد. برای تهیه عصاره اتانولی، میزان ۴۰ گرم از گیاه به ۱۰۰ میلی‌لیتر از اتانول اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. عصاره به دست آمده توسط کاغذ صافی فیلتر و وارد دستگاه روتاری گردید (۱۶).

ب) ساخت نانوذرات نقره: به منظور سنتز سبز نانو ذرات نقره با خلوص بالا از روش رسوب‌گذاری با احیای یون‌های نقره توسط عصاره الکلی گیاه تلخه استفاده شد. نانوذرات نقره با افزودن ۲ میلی‌لیتر عصاره با غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌مولار از نیترات نقره (مرک، آلمان) تحت شرایط دمایی ۶۰ درجه سلیسیوس و همزدن سنتز شدند. عصاره گیاهی به دلیل فراوانی ترکیباتی مانند آلدهید، کتون، تریپن و آلفاتریپینول موجب احیای نمک نیترات نقره به نانوذرات نقره می‌شوند. احیای کامل یون‌های نقره به نانوذرات نقره با تغییر رنگ محیط و طیف‌سنجی انجام گرفت.

پس از سپری شدن یک ساعت از زمان واکنش و تغییر رنگ محلول، سه مرتبه شستشوی رسوب با آب مقطر انجام شد. تمامی مراحل شستشو با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه

بسیار مهمی در ایجاد مقاومت دارند (۳). پمپ‌های افلاکس آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها از نظر فیلوژنی به پنج خانواده بزرگ تعلق دارند. از بین آن‌ها گروه‌های Resistance-Nodulation-Division (RND) و Multidrug and Toxic compound Extrusion (MATE) در جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* به گروه پمپ‌های افلاکس چند دارویی تعلق دارند و در ایجاد سویه‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک (MDR) نقش بسزایی دارند. به طور کلی این پمپ‌های افلاکس با کاهش غلظت آنتی‌بیوتیک در داخل سلول باعث ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌شوند (۷-۸). سیستم AdeABC یکی از مهم‌ترین پمپ‌های افلاکس در جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* می‌باشد که متعلق به خانواده RND می‌باشد. ژن کدکننده آن بر روی کروموزوم قرار دارد. به طوری که سه ژن *adeA*، *adeB* و *adeC* در مجاورت هم یک اپرون را تشکیل می‌دهند. *adeA* یک پروتئین فیوژن غشایی، *adeB* یک پروتئین ترانسپورتر و *adeC* یک پروتئین غشای خارجی می‌باشد (۹ و ۸).

مطالعات نشان داده است که با مختل کردن پمپ‌های افلاکس می‌توان خاصیت ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدها را افزایش داد. برای مقابله با پمپ‌های افلاکس دارویی می‌توان از مهارکننده‌های پمپ افلاکس استفاده نمود. تاکنون مهارکننده‌های مختلفی از جمله آلانین-آرژنین بتانفتیل آمید و نفتیل متیل پیرازین معرفی شده است که با تاثیر بر پمپ افلاکس AdeABC می‌توانند با دفع مواد سمی، حداقل غلظت بازدارنده‌ها را تغییر دهند (۱۰ و ۱۱). امروزه از دیگر مواد موثر بر پمپ‌های افلاکس مانند نانوذرات فلزی به ویژه نقره استفاده می‌شود (۱۱). روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی به منظور سنتز نانوذرات نقره وجود دارند. اما یکی از معایب این روش‌ها، استفاده از عوامل احیا کننده و مصرف انرژی است که از یک سو برای سلامتی انسان و محیط زیست خطرات بالقوه دارند و از سوی دیگر در تولید آن‌ها در مقیاس صنعتی هزینه بر بوده و توجیه اقتصادی ندارند (۱۲ و ۱۳).

امروزه روش‌های زیستی سنتز نانوذرات نقره مانند استفاده از عصاره‌های گیاهی توسعه یافته‌اند تا نانوذراتی سازگار با محیط

محیط کشت مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) بررسی گردید. (و) بررسی فنوتیپی وجود پمپ افلاکس *adeAC* با روش کارت ویل: به منظور بررسی فنوتیپی وجود پمپ افلاکس تمامی جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* با روش آگار حاوی اتیدیوم بروماید (روش کارت ویل) مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۸). در ابتدا سویه‌های *اسیتوباکتر بامانی* مقاوم به دارو بر روی پلیت‌های نوترینت آگار حاوی غلظت‌های متفاوت اتیدیوم بروماید (از ۰/۲۵ تا ۲/۵ میلی گرم بر لیتر) به صورت یک خط از مرکز محیط کشت به سمت کنار کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس انکوبه شدند. میزان فلورسنت هر جدایه با استفاده از دستگاه ژل داگ اندازه گیری شد. سویه‌هایی که خاصیت فلورسنت ندارند، دارای پمپ افلاکس بودند.

ز) استخراج *DNA*: استخراج ژنوم به روش دستی (فنل-کلروفرم) انجام شد. به طور خلاصه، به رسوب تهیه شده از کشت باکتری‌های مقاوم جداسازی شده، به ترتیب ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (Tris-HCl, pH7.4; EDTA 50mM)، ۱۳ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS 10%) (مرک، آلمان)، ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (20mg/ml) (پرومگا، آمریکا) اضافه گردید و در دمای ۶۰ درجه سلیسیوس به مدت یک ساعت قرار داده شد. ۶۰۰ میکرولیتر محلول فنل-کلروفرم-ایزوامیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) افزوده شد تا یک فاز شیری رنگ یکنواخت تشکیل گردد. سپس با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز بالایی (فاز آبی) به لوله‌های جدید منتقل گردید. این مرحله دوبار تکرار شد. به منظور رسوب DNA، هم حجم فاز آبی اتانول سرد و خالص به همراه ۰/۱ میکرولیتر استات سدیم (3M) اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس قرار گرفتند. نمونه‌ها سانتریفیوژ (۵ دقیقه ۱۳۰۰۰ دور) شدند و رسوب حاصله پس از خشک کردن در بافر TE حل گردید. در نهایت برای تائید صحت استخراج ژنوم از الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد استفاده شد. (۱۸).

ح) شناسایی ژن های *adeAC* توسط روش *PCR*: به منظور

سانتریفیوژ گردید. در نهایت شستشوی انتهایی با اتانول انجام گرفت و محصول در دمای ۶۰ درجه سلیسیوس طی دو ساعت قرار داده شد (۱۷).

ج) بررسی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی نانوذره نقره سنتز شده: وجود نانوذرات نقره با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر بررسی شد. همچنین، ریخت شناسی و اندازه نانوذرات نقره با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM, KYKY, Japan) و گذاره الکترونی (TEM, Philips, Germany) بررسی گردیدند. در این مطالعه آزمون اشعه ایکس توسط دستگاه XRD با تشعشع لامپ CuKα، در دامنه ۰ تا ۱۱۰ درجه انجام شد (۱۷).

د) نمونه گیری، کشت و تشخیص جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی*: در این مطالعه توصیفی، در مجموع تعداد ۵۰ نمونه بالینی (تراشه و زخم) از بیمارستان شهید چمران تهران جمع آوری گردید. جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* با استفاده از آزمون های میکروب شناسی مانند رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، حرکت، رشد در دمای ۴۲ درجه سلیسیوس بر روی محیط مک کانکی آگار (HiMedia, India) و واکنش بر روی محیط کشت TSI (HiMedia, India) تشخیص قطعی داده شدند. لازم به ذکر است که در تمامی آزمایش‌ها، از سویه استاندارد *اسیتوباکتر بامانی* ATCC 19606 به عنوان کنترل مثبت و از سویه استاندارد ATCC 17978 به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۸).

ه) حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها: پس از حصول اطمینان از شناسایی و تایید سویه‌های *اسیتوباکتر بامانی*، حساسیت سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر اساس استاندارد (CLSI, 2016) مورد بررسی قرار گرفت (۱۶).

حساسیت جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* نسبت به آنتی‌بیوتیک های سفنازیدیم (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، ایمپینم (۱۰ میکروگرم)، تری متوپریم-سولفومتوکسازول (۲۵ میکروگرم)، پیپراسیلین-تازوباکتام (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۱۵ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، آموکسی سیلین (۱۰ میکروگرم) و کولیستین (۲ میکروگرم) (MAST, UK) در

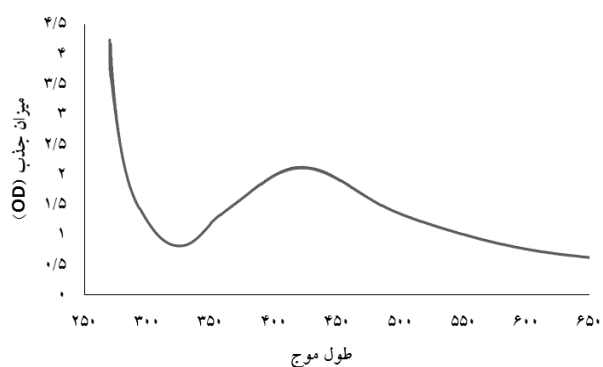
شد. مقدار ۹۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون برات (MHB) و ۵ میکرولیتر از کشت میکروبی سویه‌های مقاوم به دارو با غلظت نیم مک فارلند به چاهک‌ها اضافه شد. در نهایت، مقدار MIC به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد باکتری در نظر گرفته شد (۱۷).

ی) بررسی اثر ضدپمپ افلاکسی نانوذرات نقره: این آزمون همانند روش تعیین غلظت MIC اتیدیوم بروماید انجام گرفت. به طور خلاصه، ابتدا غلظت MIC نانوذره نقره در غلظت‌های ۱۰۰-۸۰۰ $\mu\text{g/ml}$ تعیین گردید و غلظت ۰/۵ مک فارلند از کشت باکتری به داخل چاهک‌ها اضافه شد. به دنبال آن، ترکیب اتیدیوم بروماید در غلظت‌های ۲۰-۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ اضافه گردید. فعالیت ضد پمپ افلاکس زمانی تشخیص داده می‌شود که MIC اتیدیوم بروماید به همراه نانوذرات نقره از MIC اتیدیوم بروماید به تنهایی کمتر باشد (۱۷).

ک) آنالیز آماری: به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، از نسخه بیستم نرم افزار SPSS و آزمون آماری مربع کای استفاده شد. همچنین مرز معنی داری روی $P < 0.05$ قرار داده شد.

یافته‌ها

الف) تایید سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده عصاره گیاه تلخه: نتایج سنجش چگالی نوری نشان داد که حداکثر میزان جذب محلول‌های حاوی نانوذرات نقره در طول موج ۴۲۰ نانومتر است. نمودار ۱ میزان جذب محلول‌های حاوی نانوذرات نقره تولید شده توسط عصاره گیاه تلخه را در طول موج ۲۵۰ تا



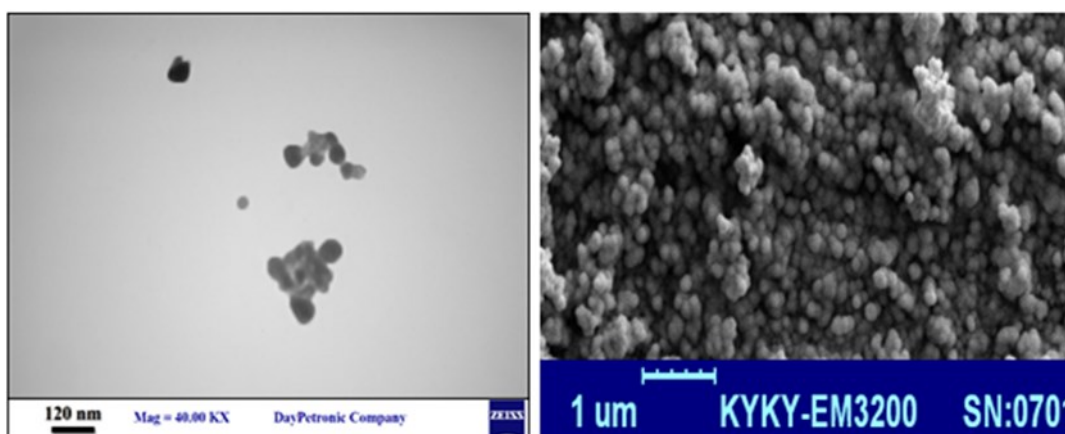
نمودار ۱: الگوی چگالی نوری نانوذرات تولید شده به وسیله عصاره گیاه تلخه.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن های *adeA* و *adeC*.

| نام پرایمر | توالی پرایمر (5'-3') | اندازه محصول (bp) |
|-----------------|-------------------------|-------------------|
| <i>adeA</i> (F) | CAGCACCAGCGAAAGTAAGTG | ۱۰۷ |
| <i>adeA</i> (R) | CGGTCGAATTCAGCAGTACG | |
| <i>adeC</i> (F) | ATCGAGATTTACGGACTGCTACG | ۱۱۷ |
| <i>adeC</i> (R) | TAACCTACCGCACTGCATTTC | |

تکثیر ژن های *adeAC* از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد (جدول ۱). این پرایمرها با استفاده از برنامه Gene Runner طراحی شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) از DNA استخراج شده به عنوان الگو، یک میکرولیتر (۵ پیکومول) از پرایمر رفت و برگشت، ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس (CinnaGen, Iran)، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر انجام گرفت. واکنش PCR برای ژن *adeA* با چرخه دمایی واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه و واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو در دمای ۶۰ درجه سلیسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، طویل شدن رشته الگو در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵۰ ثانیه و طویل شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس تنظیم شد. جهت تکثیر ژن *adeC* برنامه دمایی چرخه‌های PCR برای ژن *adeC* شامل واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۴ دقیقه و واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو در دمای ۶۰ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن رشته الگو در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و طویل شدن نهایی به مدت ۴ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس بود. لازم به ذکر است تمامی واکنش‌های PCR در ۳۰ سیکل انجام شد.

ط) تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اتیدیوم بروماید: پس از تعیین سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، این سویه‌ها به منظور ارزیابی MIC (Minimum Inhibitory Concentration) اتیدیوم بروماید مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمون MIC به صورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودايلوشن در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد. مقدار ۵ میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید با غلظت‌های متفاوت (۳/۹-۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$) به داخل چاهک‌ها ریخته



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM (راست) و TEM (چپ).

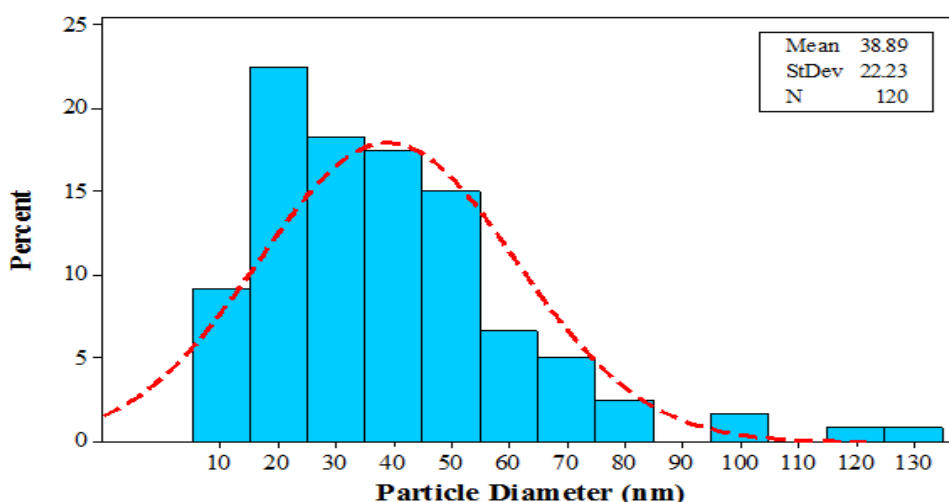
مکعبی مراکز سطحی (fcc) (Face-centered cubic) (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) و (۲۲۲) در طیف نمونه نقره دیده شد (شکل ۲). زوایای q_2 مربوط به الگوی نقره در $38/04$ ، $44/5$ ، 64 ، $77/7$ ، $81/7$ مشاهده گردید. نتایج به دست آمده مطابق با سایر گزارشات مختلف می باشد که ساختار cubic نانوذره سنتز شده را تایید می کند.

د) جداسازی سویه‌های اسپیتوباکتر بامانی و آزمون حساسیت میکروبی: در این مطالعه در مجموع ۵۰ نمونه بالینی از آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های شهر تهران جمع آوری شد. نمونه‌ها از ادرار، خون، پوست و زخم جداسازی شدند. با استفاده از آزمون‌های میکروبی تعداد ۲۱ نمونه (۴۲ درصد)

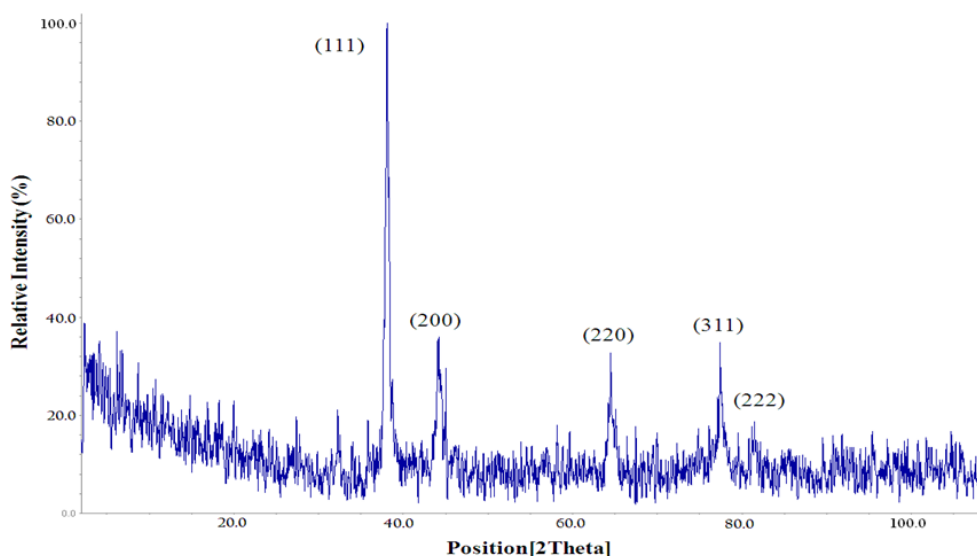
۶۵۰ نانومتر نشان می دهد.

ب) بررسی ریخت شناسی نانوذره نقره سنتز شده: اندازه و ریخت شناسی نانوذرات نقره سنتز شده از طریق میکروگراف میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و گذاره (TEM) با بزرگ نمایی‌های مختلف، تحت فشار خلاء (۵-۱۰ Torr) مورد ارزیابی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۱ و نمودار ۲ نشان داده شده است، توزیع میانگین اندازه نانوذرات سنتز شده به روش سبز $38/89$ نانومتر و شکل آن کروی است.

ج) نتایج تفرق اشعه ایکس نانوذرات نقره: الگوی تفرق اشعه ایکس نانوذرات نقره در شرایط بهینه سنتز سبز در شکل ۲ نشان داده شده است. الگوی پیک های XRD مربوط به ساختار



نمودار ۲: توزیع اندازه ذرات نقره سنتز شده.



شکل ۲: الگوی تفرق اشعه ایکس نانوذرات نقره در شرایط بهینه سنتز.

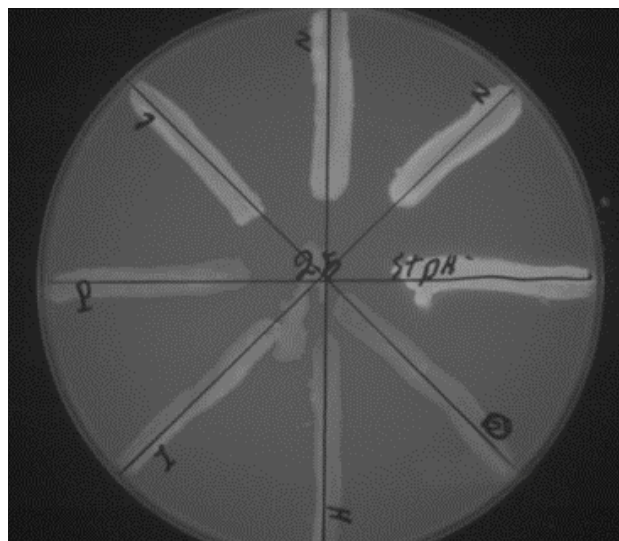
آنتی‌بیوتیک نشان دهنده وجود پمپ افلاکس در ۱۲ سویه (۵۷/۱۴ درصد) بود ($P < 0.05$). سویه‌های دارای پمپ افلاکس *adeAC* توانایی پمپ کردن اتیدیوم بروماید به خارج از سلول دارا می‌باشند. بنابراین در این آزمون به رنگ تیره دیده می‌شوند. در سویه‌هایی که فاقد پمپ افلاکس هستند، اتیدیوم بروماید به داخل سلول نفوذ کرده و فلوروسنت (روشن) مشاهده می‌شوند (شکل ۳).

و) تعیین فراوانی ژن‌های *adeA* و *adeC*: به منظور بررسی مولکولی وجود ژن پمپ افلاکس *adeAC* از تکثیر ژن *adeAC* استفاده شد و با توجه به طراحی پرایمرها قطعه ۱۱۷ جفت باز برای ژن *adeC* و ۱۰۷ جفت باز برای ژن *adeA* مشاهده شد (شکل ۴). نتایج نشان داد که ۱۲/۵ درصد از سویه‌ها تنها دارای ژن *AdeA*، ۳۱/۲ درصد از سویه‌ها دارای ژن *AdeC*، و ۳۷/۵ درصد از سویه‌ها دارای هر دو ژن ($P < 0.05$) و ۳۱/۲ درصد از سویه‌ها فاقد هر دو ژن بودند (جدول ۲).

ز) *MIC* نانوذرات نقره، اتیدیوم بروماید و مطالعه فنوتیپی پمپ افلاکس: سویه‌های *اسیتوباکتر بامانی* مقاوم به آنتی‌بیوتیک تحت تاثیر غلظت‌های ۱/۵۶ تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوذره نقره در مدت زمان ۲۴ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه‌های مختلف دارای محدوده‌ای از MIC ۱۰۰ تا

اسیتوباکتر بامانی جداسازی شدند. همچنین نتایج آنتی‌بیوگرام نشان داد که تمامی سویه‌ها به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها به جز کلیستین مقاوم بودند.

ه) آزمون فنوتیپی پمپ افلاکس (روش کارت ویل): مطالعه فنوتیپی وجود پمپ افلاکس *AdeAC* با استفاده از روش اتیدیوم بروماید (روش کارت ویل) در ۲۱ سویه‌های مقاوم به



شکل ۳: آزمون فنوتیپی کارت ویل. شماره‌های ۱، ۲ و ۳ منفی از نظر پمپ افلاکس، P و I مثبت از نظر پمپ افلاکس، O کنترل مثبت، S کنترل منفی.

جدول ۳: تعیین MIC اتیدیوم بروماید، نانوذره نقره و ترکیب آنها در سویه‌های بالینی حاوی پمپ افلاکس *اسیتوباکتر بامانی*.

| شماره جدایه | MIC (µg/ml) | | | Fold |
|-------------|---------------|-----------------|---------------------------------|------|
| | نانو ذره نقره | اتیدیوم بروماید | نانو ذره نقره + اتیدیوم بروماید | |
| A | ۲۰۰ | ۶۲/۵ | ۳۱/۲۵ | ۲ |
| B | ۱۰۰ | ۱۵/۶۲ | ۳/۹ | ۴ |
| C | ۴۰۰ | ۷/۸۱ | ۳/۹ | ۲ |
| E | ۵۰ | ۶۲/۵ | ۱۵/۶۲ | ۴ |
| F | ۱۰۰ | ۱۵/۶۲ | ۷/۸۱ | ۲ |
| H | ۴۰۰ | ۶۲/۵ | ۱۵/۶۲ | ۴ |
| I | ۲۰۰ | ۷/۸۱ | ۳/۹ | ۲ |
| J | ۴۰۰ | ۶۲/۵ | ۱۵/۶۲ | ۴ |
| K | ۲۰۰ | ۶۲/۵ | ۳۱/۲۵ | ۲ |
| O | ۴۰۰ | ۳۱/۲۵ | ۷/۸۱ | ۴ |
| P | ۴۰۰ | ۷/۸۱ | ۳/۹ | ۲ |
| S | ۱۰۰ | ۱۵/۶۲ | ۳/۹ | ۴ |
| ATCC 19606 | ۲۰۰ | ۳۱/۲۵ | ۷/۸۱ | ۴ |

جدول ۲: میزان شیوع ژن های *adeA* و *adeC* در سویه های مختلف مقاوم به چند آنتی بیوتیک *اسیتوباکتر بامانی*.

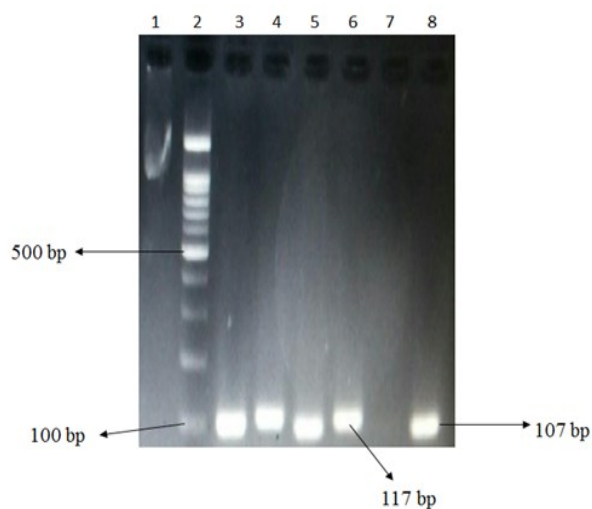
| نام سویه | ژن <i>adeA</i> | ژن <i>adeC</i> | نانوذره نقره MIC (µg/ml) | کارت ویل |
|----------|----------------|----------------|--------------------------|----------|
| A | - | - | ۲۰۰ | - |
| B | - | - | ۱۰۰ | - |
| C | - | - | ۴۰۰ | - |
| D | - | - | ۲۰۰ | - |
| E | - | - | ۵۰ | - |
| F | - | - | ۴۰۰ | - |
| G | - | - | ۴۰۰ | - |
| H | - | - | ۱۰۰ | - |
| I | - | - | ۲۰۰ | - |
| J | - | - | ۴۰۰ | - |
| K | - | - | ۴۰۰ | - |
| O | - | - | ۲۰۰ | - |
| P | - | - | ۴۰۰ | - |
| Q | - | - | ۲۰۰ | - |
| R | - | - | ۴۰۰ | - |
| S | - | - | ۴۰۰ | - |
| T | - | - | ۱۰۰ | - |
| U | - | - | ۴۰۰ | - |

بحث

در سال‌های اخیر یکی از اولویت‌های تحقیقات دارویی، ساخت داروهای جدید جهت درمان عفونت‌های باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک می‌باشد. همچنین یکی از نگرانی‌ها در این زمینه، هزینه اقتصادی تولید داروهای جدید و طولانی بودن زمان درمان عفونت‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک نسبت به باکتری‌های حساس است. این امر اهمیت یافتن راهی جدید برای درمان را دو چندان می‌کند.

مطالعات اخیر، استفاده از نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی در درمان عفونت‌های باکتریایی را در اولویت کار قرار داده‌اند. در این مطالعه با استفاده از عصاره الکلی گیاه تلخه نانوذرات نقره با میانگین اندازه ۳۸/۸۹ نانومتر سنتز گردید. این نانو ذره با استفاده از روش‌های SEM، TEM، UV-Vis و هم چنین XRD مورد تایید قرار گرفت. روش‌های مختلف سنتز نانوذرات، بررسی خاصیت ضد میکروبی و دیگر خواص نانوذرات نقره از چندین سال پیش مورد مطالعه قرار گرفته است. اما تاکنون سنتز سبز نانوذره نقره با استفاده از گیاه تلخه و تاثیر آن بر روی پمپ افلاکس سویه‌های *اسیتوباکتر بامانی* بررسی نشده است.

سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره‌های گیاهی (روش‌های سبز) بسیار حائز اهمیت است. زیرا می‌توانند جایگزین مناسب



شکل ۴: الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *adeAC* با روش PCR. ستون (۱) کنترل منفی، ستون (۲) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون‌های (۳ و ۵) نمونه دارای ژن *adeC* (ستون ۴) نمونه دارای ژن *adeA* ستون‌های (۶ و ۸) نمونه استاندارد ATCC 19606 (کنترل مثبت).

۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذره نقره بودند. همانطور که نتایج حاصل از MIC اتیدیوم بروماید و نانوذره نقره در جدول ۳ نشان داده شده است، میزان MIC اتیدیوم بروماید در مجاورت با نانوذره نقره به میزان ۱ تا ۴ برابر کاهش یافته است. این امر نشان دهنده فعال بودن پمپ افلاکس در سویه‌های مقاوم به دارو می‌باشد ($p < 0.05$).

بسیاری از روش‌های فیزیکی و شیمیایی باشند (۱۸).

در سال‌های اخیر مطالعات مختلفی در زمینه سنتز نانوذرات نقره با استفاده از عصاره گیاهان انجام شده است. در سال ۲۰۱۳ جیا (Jia) و همکاران از تری اتانول آمین استخراج شده از عصاره گیاهان به عنوان عامل احیا کننده در تولید نانوذرات نقره با ابعاد ۴۰ نانومتر استفاده نمودند و ویژگی ضد میکروبی نانوذرات تولید شده را بررسی کردند (۱۹).

در سال ۲۰۱۲ کاویا (Kaviya) و همکاران نانو ورقه‌های نقره را با استفاده از عصاره گیاه *infundibuliformis Crossandra* تهیه نمودند (۲۰). در سال ۲۰۱۲ ویجایا (Vijaya) و همکاران با استفاده از عصاره گیاه *quadrangularis Cissus* نانوذرات نقره را سنتز و خاصیت ضد میکروبی آن‌ها را مورد مطالعه قرار دادند (۲۱). در مطالعه دیگر در سال ۲۰۱۲، دوی (Devi) و همکاران پس از سنتز نانوذرات نقره از طریق احیای گیاهی *Ulva lactuca* با اندازه بین ۲۰ تا ۵۶ نانومتر، اثرات ضدباکتریایی آن را نشان دادند (۲۲).

به طور کلی بین نوع گیاه و اندازه نانوذرات نقره تولید شده ارتباط وجود دارد. به طوری که برخی از گیاهان به دلیل وجود برخی از ترکیبات خاص، خاصیت احیاکنندگی بیشتری داشته و بر روی اندازه نانوذره سنتز شده تاثیر می‌گذارند. همچنین میزان اثربخشی نانوذرات نقره وابسته به اندازه آن‌ها است. به طوری که نانوذرات نقره کوچک تر از ۵۰ نانومتر قدرت نفوذ بیشتری دارند و بنابراین تاثیرگذاری آن‌ها بیشتر است (۲۳). مطالعات مختلفی به منظور بررسی اثر اندازه نانوذرات و اثرات بیولوژیک آن انجام شده است. یون جیونگ (Yoon Jeong) و همکاران در سال ۲۰۱۴ ارتباط اندازه نانوذرات نقره و فعالیت ضد میکروبی را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، محققان فعالیت ضد میکروبی دو نانوذره با اندازه ۱۰ و ۱۰۰ نانومتر را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذره دارای اندازه ۱۰ نانومتر دارای اثرات ضد میکروبی بیشتری است. به عبارت دیگر میزان MIC آن نسبت به نانوذره ۱۰۰ نانومتر کمتر است و در غلظت کمتری موجب مرگ باکتری ها می شود. همچنین یافته های این مطالعه نشان داد که

فعالیت ضد میکروبی نانوذره نقره وابسته به دوز است (۲۴). نتایج این مطالعه با یافته های مطالعه حاضر مطابقت دارد. به طوری که اثر نانوذرات نقره وابسته به دوز است. یکی از اهداف اصلی مطالعه حاضر بررسی وجود پمپ‌های افلاکس AdeAC در سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *اسیتوباکتر بامانی* بود. در مطالعه حاضر تمامی سویه‌های *اسیتوباکتر بامانی* به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها به جز کلیستین مقاوم بودند. سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از نظر وجود پمپ افلاکس AdeAC با استفاده از روش کارت ویل بررسی شدند و سپس به کمک روش PCR فراوانی ژن‌های *adeA* و *adeC* تایید گردید. بر اساس این مطالعه افلاکس مواد احتمالاً به حضور همه ژن‌ها و برهمکنش بین آن‌ها بستگی دارد و نمی‌توان این ارتباط را حداقل به حضور یک ژن ارتباط داد. نتایج مطالعه ما نشان داد که ۵۷ درصد از سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک (۱۲ سویه) از نظر وجود پمپ افلاکس AdeAC مثبت بودند.

به طور کلی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزید، بتالاکتام‌ها، کلرامفنیکل، اریترومايسين، تراسایکلین و اتیدیوم بروماید به دلیل بیان بیش از حد پمپ افلاکس AdeAC می‌باشد (۲۵ و ۲۶). در این مطالعه، به منظور بررسی اثرات مهارکنندگی پمپ افلاکس نانو ذرات نقره در سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و دارای پمپ افلاکس AdeAC، سویه‌ها تحت تاثیر غلظت‌های مختلف از نانوذره نقره و اتیدیوم بروماید قرار گرفتند و میزان MIC آن‌ها مشخص گردید. نتایج نشان داد که میزان MIC اتیدیوم بروماید سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در مجاورت با نانوذرات نقره به میزان ۱ تا ۴ برابر کاهش می‌یابد. این امر نشان‌دهنده فعالیت ضدپمپ افلاکسی نانوذرات نقره است. بدین صورت که نانوذرات نقره فعالیت پمپ افلاکس AdeAC را متوقف کرده و اتیدیوم بروماید در غلظت‌های کمتری توانایی از بین بردن باکتری‌ها را دارد. کاهش میزان MIC اتیدیوم بروماید در سویه‌های مختلف ممکن است تنها از طریق اثرات مهارکنندگی پمپ افلاکس توسط نانوذرات نباشد. بلکه ممکن است نانوذرات از سایر مسیرها مانند منفذهای غشایی مانند پورین‌ها میزان MIC را تغییر دهند.

می‌کنند. همچنین در سطح مولکولی ممکن است این نانوذرات بتوانند با تنظیم کننده‌های بیان ژن AdeAC بر همکنش داشته باشند. به طوری که باعث کاهش بیان این ژن‌ها شده و در نهایت میزان فعالیت این پمپ‌ها کاهش می‌یابد. برخی از مطالعات نشان داده اند که با تیمار سلول‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک با نانوذرات، میزان بیان ژن‌های پمپ افلاکس کاهش می‌یابد. این یافته استدلال ما را تایید می‌نماید (۳۰).

به نظر می‌رسد که یکی دیگر از دلایل مهار پمپ افلاکس توسط مهارکننده‌ها، مهار نیرو محرکه پروتونی در سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *اسیتوباکتر بامانی* است. به صورتی که شیب غلظت دو طرف غشای سلول باکتری بهم می‌ریزد. بنابراین می‌توان از این خاصیت به منظور طراحی داروهای مهارکننده پمپ افلاکس استفاده نمود.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات نقره سنتزی می‌توانند به عنوان یک ماده مهارکننده پمپ افلاکس در جدایه‌های *اسیتوباکتر بامانی* عمل کنند. بنابراین پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتر در مورد خواص زیستی این نانوذرات انجام گیرد تا اهمیت پزشکی این نانوذره بیشتر مشخص شود و به عنوان یک ترکیب مهارکننده پمپ افلاکس (به همراه آنتی‌بیوتیک) امیدبخش به مراکز دارویی پیشنهاد شود. شایان یلدآوری است که مهار کننده‌های پمپ‌ها از این رو مهم هستند که به عنوان یک همکار هم زمان با تجویز دارو استفاده شوند تا تاثیر دارو را افزایش دهند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد با کد پژوهشی ۱۴۳۳۰۵۱۳۹۴۲۰۰۱ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا به انجام رسیده است. نویسندگان این مقاله از تمامی کسانی که در اجرای این مطالعه همکاری نمودند، کمال امتنان را دارند.

در تایید نتایج تحقیق حاضر، رزین (Ruzin) و همکاران در سال ۲۰۱۰ به ارتباط معنادار بین میزان بیان پمپ افلاکس AdeAC و میزان MIC اتیدیوم بروماید رسیدند. همچنین این محققان نشان دادند که افزایش بیان پمپ افلاکس AdeAC یک مکانیسم رایج کاهش حساسیت به تایگی سایکلین در این باکتری می‌باشد (۲۷).

یکی از مکانیسم‌های کاهش میزان MIC در اثر استفاده هم زمان نانوذرات به همراه اتیدیوم بروماید، این است که یکی از سوبستراهای مهم پمپ افلاکس در *اسیتوباکتر بامانی* اتیدیوم بروماید است. در واقع پمپ افلاکس می‌تواند اتیدیوم بروماید را به سمت بیرون پمپ کند. اما از یک غلظت به غلظت بالاتر می‌تواند برای سلول سمی باشد. این تحقیق با هدف بررسی اثر مهار کنندگی پمپ افلاکس نانوذرات نقره انجام شد. اگر نانوذرات نقره بتوانند باعث مهار پمپ افلاکس در *اسیتوباکتر بامانی* شوند، پمپ افلاکس قادر به پمپ کردن اتیدیوم بروماید به خارج از سلول نمی‌باشد. در واقع اتیدیوم بروماید در غلظت‌های پایین تر می‌تواند باعث مرگ باکتری شود. به این ترتیب میزان MIC اتیدیوم بروماید در اثر استفاده همزمان با نانوذرات نقره کاهش می‌یابد. نیک آسا (Nikasa) و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که میزان MIC در حضور ماده مهارکننده پمپ‌های افلاکس در سویه‌های *اسیتوباکتر بامانی* جداسازی شده از نمونه‌های بالینی شهر تهران کاهش می‌یابد (۲۸).

مطالعات نشان می‌دهد که مهارکننده‌های پمپ افلاکس از طریق مکانیسم‌های مختلف از قبیل تداخل با مراحل تنظیمی بیان ژن پمپ افلاکس، تداخل با مراحل ساخته شدن و تجمع یافتن در غشای سلول، مهار اتصال ترکیبات مختلف از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها با اتصال رقابتی به پمپ‌های افلاکس و تداخل با مکانیسم‌های کسب انرژی لازم برای پمپ‌های افلاکس عمل می‌کنند (۲۹). یکی از دلایل مهار پمپ افلاکس AdeAC توسط نانوذرات نقره و کاهش MIC اتیدیوم بروماید می‌تواند برهم کنش نانوذرات نقره با ساختمان پمپ افلاکس در غشای سلول باشد. به طوری که نانوذرات نقره احتمالاً جایگاه اتصال آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر ترکیبات را در پمپ‌های افلاکس اشغال

References

1. Pourhajibagher M, Hashemi FB, Pourakbari B. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* to imipenem in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Open Microbiol J.* 2016; 29(10): 32-42.
2. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30(1): 409-447.
3. Aliramezani A, Douraghi M, Hajihassani A, Mohammadzadeh M, Rahbar M. Clonal relatedness and biofilm formation of *oxa-23*-producing carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from hospital environment. *Microb Pathog.* 2016; 26(99): 204-208.
4. Richmond GE, Evans LP, Anderson MJ, Wand ME, Bonney LC, Ivens A. The *Acinetobacter baumannii* two-component system *aders* regulates genes required for multidrug efflux, biofilm formation, and virulence in a strain-specific manner. *M Bio.* 2016; 19; 7(2): e00430-16.
5. Xiao SZ, Chu HQ, Han LZ, Zhang ZM, Li B, Zhao L. Resistant mechanisms and molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Mol Med Rep.* 2016; 14(3): 2483-2488.
6. Yoon EJ, Balloy V, Fiette L, Chignard M, Courvalin P, Grillot-Courvalin C. Contribution of the *ade* resistance-nodulation-cell division-type efflux pumps to fitness and pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *MBio.* 2016; 31; 7(3): 15-26.
7. Yuhan Y, Ziyun Y, Yongbo Z, Fuqiang L, Qinghua Z. Over expression of *adeabc* and *acrab-tolc* efflux systems confers tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016; 49(2): 165-171.
8. Lytvynenko I, Brill S, Oswald C, Pos KM. Molecular basis of polyspecificity of the small multidrug resistance efflux pump *AbeS* from *Acinetobacter baumannii*. *J Mol Biol.* 2016; 13; 428 (3): 644-657.
9. Yang H, Huang L, Barnie PA, Su Z, Mi Z, Chen J. Characterization and distribution of drug resistance associated β -lactamase, membrane porin and efflux pump genes in MDR *Acinetobacter baumannii* isolated from Zhenjiang, china. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 15; 8(9): 15393-15402.
10. Ni W, Li Y, Guan J, Zhao J, Cui J, Wang R. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 22; 60(5): 3215-3218.
11. Cortez-Cordova J, Kumar A. Activity of the efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide against the *adeAC* pump of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 37(5): 420-424.
12. Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venketesan R. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram positive and gram-negative bacteria. *Nanomed Nanotechnol Biol Med.* 2010; 6(1): 103-109.
13. Hamedi S, Shojaosadati SA, Mohammadi A. Evaluation of the catalytic, antibacterial and anti-biofilm activities of the *Convolvulus arvensis* extract functionalized silver nanoparticles. *J Photochem Photobiol B.* 2016; 167: 36-44.
14. Norouzi A, Yavari I, Chalabian F. chemical constituents and antimicrobial activities of the

- essential oil of *Acroptilon repens* (L.) dc. Flavour and Fragrance J. 2006; 21: 247-249 .
15. Kanthal LK, Dey A, Satyavathi K, Bhojaraju P. GC-MS analysis of bio-active compounds in methanolic extract of *Acroptilon repens* dc. Pharmacognosy Res, 2014; 6(1): 58-61
 16. Clinical and laboratory standards institute (CLSI), 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. CLSI, Wayne, Pa. M100-S16, 26, no. 3.
 17. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. AA Chemother, 2001; 45(6): 1761-1770.
 18. Salehi S, Shandiz SA, Ghanbar F, Darvish MR, Ardestani MS, Mirzaie A. Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia marschalliana* sprengel aerial part extract and assessment of their antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. Int J Nanomedicine. 2016; 29: 1835-1846.
 19. Yang J, Wang H, Wang Z, Tan X, Song C, Zhang R. Interaction between antitumor drug and silver nanoparticles: combined fluorescence and surface enhanced raman scattering study. Chin Opt Lett. 2009; 7(10): 894-897.
 20. Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B. Biosynthesis of silver nano-flakes by *Crossandra infundibuliformis* leaf extract. Mater Lett. 2012; 67(1): 64-66.
 21. Vijayaraghavan K, Kamala Nalini SP, Udaya Prakash N. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Syzygium aromaticum*. Mater Lett. 2012; 75: 33-35.
 22. Devi LS, Joshi SR. Ultra-structures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi. J Micros Ultra. 2015; 3: 29-37.
 23. Jiang J, Oberdorster, Elder A, Gelein R. does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? Nanotoxicol. 2008; 2(1): 33-42 .
 24. Jeong Y, Woo Lim D, Choi J. Assessment of size-dependent antimicrobial and cytotoxic properties of silver nanoparticles. Adv Mat Sci Eng. 2014; doi: 10.1155/2014/763807.
 25. Xian-Zhi Li, Patrick Plésiat, Hiroshi Nikaido. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(2): 337-418.
 26. Lin L, Ling BD, Li XZ. Distribution of the multidrug efflux pump genes, adeabc, adede and adeijk, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* -*Acinetobacter calcoaceticus* complex. Int J Antimicrob Agents. 2009; 33: 27-32.
 27. Ruzin A, Immermann FW, Bradford PA. RT-PCR and statistical analyses of *adeABC* expression in clinical isolates of *Acinetobacter Calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. Microb Drug Resist. 2010; 16: 87-89.
 28. Nikasa P. Antibiotic resistance of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in the presence of efflux pump inhibitor. Infect Dis Trop Med. 2013; 42: 19-23.
 29. Pagès J-M, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of gram-negative bacteria. Biochimica et Biophysica Acta. 2009; 1794: 826-833.
 30. Coban AY, Guney AK, Tanriverdi Cayci Y. Durupinar B. Effect of 1-(1-naphtylmethyl)-piperazine, an efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibilities of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. Curr Microbiol. 2011; 62(2): 508-511.



Green synthesis of silver nanoparticle using *Acroptilon repens* extract and evaluation of its anti-efflux activity against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates

Reyhane Behdad¹, Amir Mirzaie², Shohreh Zare Karizi³

¹ M.Sc., Department of Biology, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

² Associated Professor, Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.

³ Associated Professor, Department of Biology, Varamin- Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Efflux pumps are one of the mechanisms for antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates. The aim of the present study was to investigate the green synthesis of silver nanoparticles using *Acroptilon repens* extract and evaluation of its anti-efflux activity in antibiotic-resistant *A. baumannii* isolates.

Materials & Methods: In this experimental study, the silver nanoparticles were synthesized using *A. repens* alcoholic extract and the structure of the synthesized silver nanoparticles was confirmed by spectrophotometry (UV-Vis), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM). Subsequently, the adeAC efflux pump was detected in 21 *A. baumannii* clinical isolates using Cartwheel and Polymerase Chain Reaction (PCR) methods. Finally, the anti-efflux pump activity of silver nanoparticles was evaluated by Minimum Inhibition Concentration (MIC) technique.

Results: The synthesized silver nanoparticle was confirmed by maximum absorbance at 420 nm wavelength, using UV-Vis method. The SEM and TEM micrographs showed that nanoparticles are spherical and have an average size of 38.89 nm. Moreover, the XRD results confirmed the cubic structure of silver nanoparticles. The results of Cartwheel and PCR methods revealed that the 12 out of 21 isolates have active efflux pumps. Furthermore, the MIC of ethidium bromide in resistant strains with silver nanoparticles was decreased.

Conclusion: Based on anti-efflux pump activity of silver nanoparticles against *A. baumannii* strains, it seems that silver nanoparticles have potential uses for pharmaceutical industries, though further studies are required to confirm the results of this study.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Efflux pump, *Acroptilon repens*, Silver nanoparticle.

Correspondence to: Shohreh Zare Karizi

Tel: +98 2136725011

E-mail: s.zarekarizi@iauvaramin.ac.ir

Journal of Microbial World 2017, 10(3): 210-221.