



The effect of titanium dioxide nanoparticles on the expression of genes effective in biofilm production in resistant *Klebsiella pneumoniae* strains

Marzieh Shafiei¹, kumarss amini², Parvaneh Jafari³

¹Ph.D student, Department of Microbiology, Science faculty, Islamic Azad University, Arak, Iran. ²Associate Professor, Microbiology Department, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran. ³Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of sciences, Islamic Azad University, Arak branch, Arak, Iran.

Abstract

Background and Objectives: The ability of *Klebsiella pneumoniae* as an opportunistic bacterium in hospital infections, by producing biofilm on food utensils and hospital surfaces, has adverse effects on the treatment and survival of hospitalized patients. The present study was conducted with the aim of investigating the effect of TiO₂ nanoparticles on *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation.

Materials and methods: TiO₂ nanoparticles were produced using sol-gel method. 62 strains of *Klebsiella pneumoniae* were isolated from three hospitals in Tehran. Antimicrobial activity of TiO₂ nanoparticles against biofilm-producing and antibiotic-resistant strains was determined by disk diffusion method. Definitive identification of the isolates was done through common biochemical tests and 16S rRNA sequencing, and the expression of *treC*, *mrkD*, *sugE*, *luxS* and *16SrRNA* genes was investigated by real time PCR.

Results: The data showed that the ability to form biofilm among isolates obtained from sputum was higher than other isolates. TiO₂ nanoparticles with a concentration of 256 µg/ml inhibited biofilm production in fourteen isolated strains. Comparison of *LuxS* gene expression in *Klebsiella pneumoniae* untreated and treated with TiO₂ showed that the level of gene expression decreased by 3.85 times ($p = 0.002$).

Conclusion: This study showed that the synthesized TiO₂ nanoparticles are effective against the formation of biofilm in *Klebsiella pneumoniae* strains resistant to several drugs and can be reliable and useful as inorganic antimicrobial agents.

Keywords: Antibiotic resistance, Biofilm, Titanium dioxide nanoparticles, *Klebsiella pneumoniae*.

Received: 9 August 2022

Revised: 12 November 2022

Accepted: 11 December 2022

Correspondence to: kumarss amini

Tel: +98 9125454074

E-mail: Dr_kumarss_amini@yahoo.com

Journal of Microbial World 2023, 15(4): 294-303

DOI:10.30495/jmw.2022.1914843.1941



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



تأثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر بیان ژن‌های موثر در تولید زیست‌لایه در سوبیه‌های کلبسیلا نومونیه مقاوم

مرضیه شفیع^۱، کیومرث امینی^{۲*}، پروانه جعفری^۳

^۱ دانشجوی دکتری، گروه میکروب شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران. ^۲ دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران. ^۳ دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: توانایی کلبسیلا نومونیه به عنوان یک باکتری فرصت‌طلب در عفونت‌های بیمارستانی، با تولید بیوفیلم بر روی ادوات طبخ مواد غذایی و سطوح بیمارستان، تأثیرات نامطلوبی بر درمان و زنده‌مانی بیماران بستری در بیمارستان دارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر نانوذرات TiO₂ بر تشکیل بیوفیلم کلبسیلا نومونیه انجام شده است.

مواد و روش‌ها: نانوذرات TiO₂ با استفاده از روش سل-ژل تولید شد. ۶۲ سوبیه کلبسیلا نومونیه از سه بیمارستان تهران جدا شد. فعالیت ضد میکروبی نانوذرات TiO₂ در برابر سوبیه‌های مولد بیوفیلم و مقاوم به آنتی‌بیوتیک از طریق روش انتشار دیسک تعیین شد. شناسایی قطعی جدایه‌ها از طریق آزمایش‌های بیوشیمیایی متداول و تعیین توالی rRNA ۱۶S انجام شد و بیان ژن‌های *amrK*، *treC*، *luxS*، *luxE* و *luxS* توسط Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: داده‌ها نشان داد که توانایی تشکیل بیوفیلم در بین جدایه‌های به‌دست آمده از خلط از سایر جدایه‌ها بیشتر بود. نانوذرات TiO₂ با غلظت ۲۵۶ μg/ml تولید بیوفیلم را در چهارده سوبیه جدا شده مهار نمودند. مقایسه بیان ژن LuxS در کلبسیلا نومونیه تیمار نشده و تحت تیمار با TiO₂ نشان داد که میزان بیان ژن ۳/۸۵ برابر کاهش یافته است (p=۰/۰۰۲).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که نانوذرات TiO₂ سنتز شده در برابر تشکیل بیوفیلم در سوبیه‌های کلبسیلا نومونیه مقاوم به چند دارو موثر هستند و می‌توانند به عنوان عوامل ضد میکروبی غیر آلی قابل اعتماد و کاربردی باشند.

کلید واژه: مقاومت آنتی‌بیوتیکی، زیست‌لایه، نانوذرات TiO₂، کلبسیلا نومونیه.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۹/۲۰

ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۸/۲۱

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۵/۱۸

مقدمه

بیماری‌زایی این باکتری توانایی آن در چسبیدن و تشکیل بیوفیلم در سطوح مختلف است که گزارش شده در حدود ۷۰٪ از عفونت‌های باکتریایی دخیل است زیرا تشکیل بیوفیلم به باکتری‌ها اجازه می‌دهد بیشتر دوام بیاورند و منجر به عفونت‌های مزمن می‌شود (۱).

در اصطلاح بیوفیلم یا زیست‌لایه به سلول‌هایی گفته می‌شود که روی یک سطح تثبیت شده و عموماً به وسیله یک ماتریکس از مواد پلیمری خارج سلولی با منشأ میکروبی احاطه

کلبسیلا نومونیه یک باکتری کپسول‌دار، گرم منفی و غیر متحرک است که در مواد غذایی و محیط زیست، از جمله آب‌های سطحی و خاک و دستگاه‌های پزشکی مانند ایمپلنت‌ها و کاتترها ساکن است و در حال حاضر دومین علت شایع باکتریایی (وجود باکتری در خون) می‌باشد. یک عامل مهم در

* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ایران.
تلفن: ۰۹۱۲۵۴۵۰۷۴ پست الکترونیک: Dr_kumarss_amin@yahoo.com



شده‌اند (۲). زیست‌لایه ایجاد شده توسط سویه‌های کلبسیلا نومونیه به عنوان یک عامل مهم بیماری‌زایی در این باکتری به شمار می‌رود که باکتری را در برابر انتشار داروهای ضد میکروبی مقاوم نموده و بدین ترتیب موجب بروز مقاومت به درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۳ و ۴). مطالعات نشان داده است که برخی از ژن‌های مربوط به حدت شناسایی شده در کلبسیلا نومونیه مانند خوشه ژن mrk (پروتین فیمبریال نوع ۳) و ژن treC (کپسول ضد فاگوسیت (CPS)) در تشکیل زیست‌لایه نقش دارند. بیان انواع ژن‌های چسبندگی فیمبریال، mrkD، برای تقویت تشکیل زیست‌لایه و دخالت در آلودگی کاتتر توسط کلبسیلا نومونیه اثبات گردیده است. علاوه بر این ژن treC برای بیوسنتز ماتریس مورد نیاز برای تشکیل زیست‌لایه حیاتی است زیرا با تهیه گلوکز باعث تولید پلی ساکارید کپسولی می‌شود. علاوه بر این، ژن‌های LuxS (type 2 quorum-sensing regulatory system) و SugE (پروتین انتقال ترکیبات آمونیوم (خانواده SMR)) نیز به ترتیب با افزایش روند ارتباط سلول با سلول و حمل و نقل داروها یا متابولیت‌ها، بر ساخت زیست‌لایه در سویه‌های کلبسیلا نومونیه تأثیر می‌گذارند (۲ و ۳). با توجه به افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه پس از دهه ۱۹۷۰، با ظهور سویه‌های خاص با مقاومت بالا به عوامل ضد میکروبی، تحقیق در زمینه گزینه‌های جدید درمان بسیار حیاتی در نظر گرفته شده است. بنابراین، تحقیقات بر اساس استفاده از مواد مختلف مانند داروهای گیاهی، پروبیوتیک‌ها یا نانوذرات، به‌عنوان یک زمینه امیدوارکننده برای مبارزه با سویه‌های مقاوم در حال رشد مطرح گردیده است (۴-۶). امروزه نانوذرات تیتانیوم (TiO₂ NPs) به‌عنوان یک ماده ضدباکتریایی مهم در نظر گرفته می‌شود که برای میکروارگانیسم‌ها بسیار سمی شناخته شده است زیرا طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی/ضد زیست‌لایه را برای ارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان می‌دهد (۷-۹).

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتریایی: سویه‌های کلبسیلا نومونیه از سواب‌های زخم جراحی، خلط، خون و نمونه ادرار از ۷۴ بیمار بستری (سن بین ۱۸ تا ۶۶ سال) در بیمارستان امام خمینی جداسازی شدند. تمام روش‌های مربوط به شرکت کنندگان انسانی مطابق با استانداردهای اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی و اعلامیه هلسینکی ۱۹۶۴ و اصلاحات بعدی آن انجام شده است. علاوه بر این، ۳۱ سویه دیگر کلبسیلا نومونیه از نمونه‌های مختلف ادوات طبخ مواد غذایی بیمارستانی جدا شد. شناسایی قطعی جدایه‌ها از طریق آزمایش‌های بیوشیمیایی متداول (IMViC)، اکسیداز، کاتالاز، تخمیر قندها، تولید H₂S، استفاده از لیزین، و اوره و به دنبال آن توالی‌یابی قطعه SrRNA₁₆ با استفاده از پرایمرهای عمومی

شده‌اند (۲). زیست‌لایه ایجاد شده توسط سویه‌های کلبسیلا نومونیه به عنوان یک عامل مهم بیماری‌زایی در این باکتری به شمار می‌رود که باکتری را در برابر انتشار داروهای ضد میکروبی مقاوم نموده و بدین ترتیب موجب بروز مقاومت به درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۳ و ۴). مطالعات نشان داده است که برخی از ژن‌های مربوط به حدت شناسایی شده در کلبسیلا نومونیه مانند خوشه ژن mrk (پروتین فیمبریال نوع ۳) و ژن treC (کپسول ضد فاگوسیت (CPS)) در تشکیل زیست‌لایه نقش دارند. بیان انواع ژن‌های چسبندگی فیمبریال، mrkD، برای تقویت تشکیل زیست‌لایه و دخالت در آلودگی کاتتر توسط کلبسیلا نومونیه اثبات گردیده است. علاوه بر این ژن treC برای بیوسنتز ماتریس مورد نیاز برای تشکیل زیست‌لایه حیاتی است زیرا با تهیه گلوکز باعث تولید پلی ساکارید کپسولی می‌شود. علاوه بر این، ژن‌های LuxS (type 2 quorum-sensing regulatory system) و SugE (پروتین انتقال ترکیبات آمونیوم (خانواده SMR)) نیز به ترتیب با افزایش روند ارتباط سلول با سلول و حمل و نقل داروها یا متابولیت‌ها، بر ساخت زیست‌لایه در سویه‌های کلبسیلا نومونیه تأثیر می‌گذارند (۲ و ۳). با توجه به افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه پس از دهه ۱۹۷۰، با ظهور سویه‌های خاص با مقاومت بالا به عوامل ضد میکروبی، تحقیق در زمینه گزینه‌های جدید درمان بسیار حیاتی در نظر گرفته شده است. بنابراین، تحقیقات بر اساس استفاده از مواد مختلف مانند داروهای گیاهی، پروبیوتیک‌ها یا نانوذرات، به‌عنوان یک زمینه امیدوارکننده برای مبارزه با سویه‌های مقاوم در حال رشد مطرح گردیده است (۴-۶). امروزه نانوذرات تیتانیوم (TiO₂ NPs) به‌عنوان یک ماده ضدباکتریایی مهم در نظر گرفته می‌شود که برای میکروارگانیسم‌ها بسیار سمی شناخته شده است زیرا طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی/ضد زیست‌لایه را برای ارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان می‌دهد (۷-۹). مطالعات اثبات کرده‌اند که نانوذرات TiO₂ با داشتن اندازه بسیار کوچک، می‌تواند به راحتی به دیواره سلولی و غشای سلولی نفوذ کرده و با قرار گرفتن در معرض نور

فسفات شسته شدند ($\text{pH} = 2/7$). سپس پلیت‌ها به مدت یک شب در هوا خشک شدند و با کریستال ویوله $0/1\%$ (CV) رنگ‌آمیزی شدند. پس از ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی، چاهک‌های کشت سه بار با آب دیونیزه شسته شد تا کریستال ویوله باند نشده از بین برود. تراکم نوری چاه‌ها با استفاده از دستگاه خودکار میکروالایزا (اپندورف، آلمان) در ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تشخیص تولیدکنندگان زیست‌لایه قوی جذب نوری $< 0/240$ ، برای تولید کننده زیست‌لایه متوسط جذب نوری $0/120 - 0/240$ و برای سویه غیر تولید کننده زیست‌لایه جذب نوری $< 0/120$ انتخاب شد. اشریشیاکلاسی ATCC25922، یک سویه تشکیل دهنده زیست‌لایه شناخته شده (۱۱)، به عنوان کنترل مثبت در سنجش‌های زیست‌لایه در نظر گرفته شد (۱۲). محیط استریل BHI به عنوان شاهد منفی استفاده شد. تمام سنجش‌ها با استفاده از سه تکرار انجام شد و حداقل یک بار به طور مستقل تکرار شد.

د) تهیه نانوذره‌های TiO_2 : آماده‌سازی نانوذره TiO_2 با روش سل ژل همانطور که قبلاً توسط دسای و همکاران انجام شده بود انجام شد. به طور خلاصه، کلرید تیتانیوم (IV) (مرک، آلمان) با غلظت خلوص ۹۹ درصد به عنوان پیش ماده مورد استفاده قرار گرفت و در شرایط کنترل شده با اضافه کردن آب دیونیزه و با هم زدن مداوم و دقیق در ۲۵ درجه به مدت ۱۲ ساعت هیدرولیز شد. سل حاصل دیالیز شد و ژل به دست آمده در آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شد. محصول کریستالی سفید حاصل در دمای ۵۰۰ درجه سلسیوس اکسیده شده و پس از آن برای مطالعه استفاده شد (۱۳).

اندازه‌گیری پراش اشعه X (XRD) نانوذره‌ها TiO_2 در یک پراش سنج (Philips PANalytical X'Pert Pro) انجام شد. اندازه پودر کریستالیت با استفاده از معادله شرر، $D = k\lambda / B \cos \theta$ محاسبه شد، که D قطر کریستالیت در \AA است، k ثابت شکل (۰/۹) و λ طول موج اشعه $\text{Cu K}\alpha$ در \AA است، θ زاویه پراش است و B (در شعاع) نیمه عرض اندازه‌گیری شده برای قله XRD است. میکروسکوپ الکترونی روبشی (کارل زایس، آلمان) برای تصویربرداری از سطح نمونه به صورت سه

F27 (آغازگر فوروارد -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) و R1492 (آغازگر معکوس -5-3) و $\text{GGTTACCTTGTTACGACTT-3}$ ، با توجه به مطالعه قبلی انجام شد (۱۰). محصولات PCR قطعه 16SrRNA تحت توالی‌یابی قرار گرفتند. اندازه‌های مولکولی نسبی محصولات PCR با توالی پایگاه داده بانک ژن، مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) با استفاده از برنامه تجزیه و تحلیل Basic Local Alignment Search (BLAST) مقایسه شد. پس از شناسایی، سویه‌های کلبسیلا نومونیه در محیط تریپتون سوی‌براث (Tryptone Soya Broth, TSB) (Merck Co، آلمان) با 10% گلیسرول در -70°C درجه سلسیوس به منظور ارزیابی‌های بیشتر ذخیره شدند. همه جدایه‌ها در محیط BHI آگار (Brain heart infusion) (Merck، آلمان) کشت شدند.

ب) تست حساسیت به آنتی‌بیوتیک: الگوی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از روش اصلاح شده انتشار دیسک کربی باوئر در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین شد. کشت کلبسیلا با کدورت مطابق با استاندارد $0/5$ مک فارلند توسط یک سواب پنبه استریل در محیط مولر-هیتون آگار (MHA) همراه با 2% NaCl انجام شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک روی سطح محیط گذاشته شد و سویه‌های MDR مقاوم به داروی چندگانه، XDR (بسیار مقاوم در برابر دارو) و PDR (مقاوم در برابر دارو) بر اساس رهنمودهای مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری (CDC) تعیین شد (۱۱).

ج) بررسی زیست‌لایه: برای ارزیابی تشکیل زیست‌لایه، از کلنی‌های تازه جدا شده کلبسیلا نومونیه در 5 میلی‌لیتر محیط براث LB استفاده شد. این محیط‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس با شرایط 200 rpm انکوبه شدند (۱۱). به دنبال انکوباسیون، تعداد سلول‌ها در هر کشت تعیین و به میزان $10^4 \times 1/5$ CFU/ml تنظیم شد و 200 میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی به هشت چاهک از یک صفحه میکروتیتر کف تخت 96 تایی حاوی محیط مایع BHI منتقل و در دمای 35 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس محیط‌ها آسپیره شده و چاهک‌ها 3 بار با محلول بافر

تشکیل زیست‌لایه در OD=570 بررسی شد. (و بیان ژن: پس از قرار گرفتن باکتری در غلظت‌های ۵۱۲، ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲ و صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات TiO₂ در طی ۲۴ ساعت، میزان بیان ژن‌های دخیل در تولید زیست‌لایه با استفاده از RT-PCR تعیین شد. سطح بیان ژن‌های *luxS*، *sugE*، *mrkD*، *treC* و *16SrRNA* (ژن خانه‌دار (Housekeeping)) در این آزمون مورد بررسی قرار گرفت. به طور خلاصه، RNA باکتریایی کل ۱۴ جدایه از با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (Cinnagen, Iran) استخراج شد. سپس cDNA با استفاده از کیت RT Prime Script (Cinnagen, Iran) سنتز و بیان آن با استفاده از SYBR Green تعیین شد. در نهایت، qRT-PCR با کیت SYBR Premix Ex Taq II (Cinnagen, Iran) بر روی سیستم ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) انجام شد. بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از ژن خانه‌دار *16SrRNA* از کلبسیلا نومونیه بدست آمد. تعداد سیکل آستانه (cycle threshold) توسط نرم‌افزار سیستم تشخیص تأیید شد و داده‌ها بر اساس روش $\Delta\Delta Ct$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۱۴). سطح بیان ژن‌های هدف مشخص و با یکدیگر مقایسه شد. هر واکنش سه بار انجام شد و تجزیه و تحلیل آماری و آزمون T-Test از طریق SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت.

یافته‌ها

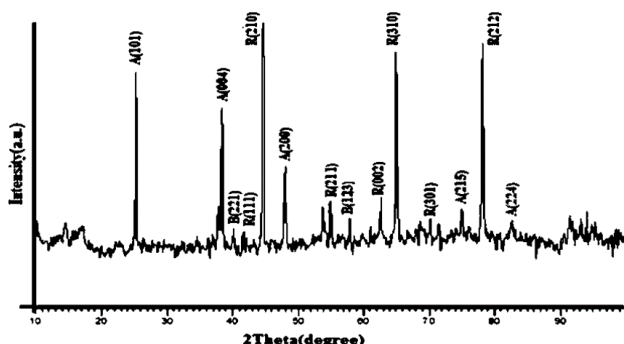
الف) فعالیت ضد میکروبی و ضد زیست‌لایه: در حالت کلی ۶۲ سویه از نمونه‌های بیماران و نمونه‌های ادوات طبخ جداسازی شد و مورد مطالعات بیشتر قرار گرفت. شکل شماره یک نشان دهنده حضور ژن‌های هدف در برخی از سویه‌ها است. تشکیل زیست‌لایه با استفاده از رنگ آمیزی CV بعد از ۱۸ ساعت رشد سویه‌های کلبسیلا نومونیه بررسی شد. یافته‌ها نشان داد که تشکیل زیست‌لایه در سویه‌ها ارتباط معناداری با مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خاص یا حساسیت به آن‌ها ندارد ($p > 0.05$). الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها در شکل ۲ آورده شده است. از بین ۶۲ جدایه، ۵۷ عدد (۹۱/۹۳٪) از جدایه‌های

بعدی مورد استفاده قرار گرفت و موارد زیر را تعیین کرد: توپوگرافی نمونه و خصوصیات سطح آن، مورفولوژی، اندازه و موقعیت ذرات در سطح از جسم (۱۳).

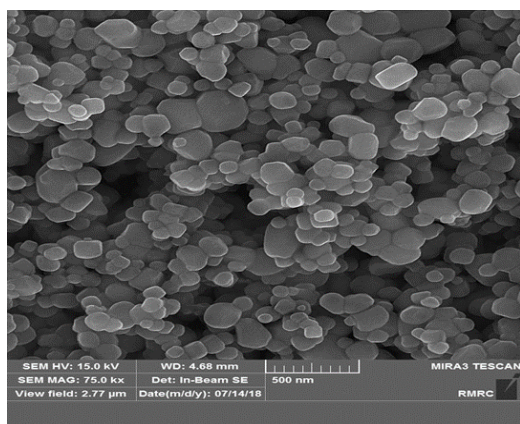
ه) تعیین فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی *TiO₂*: بدین منظور رقت‌های مختلف ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذره در آب مقطر اتوکلاو شده ساخته شد. ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم *TiO₂* NPs به ۱۰ میلی‌لیتر آب استریل اضافه شد و سپس فعالیت ضد میکروبی *TiO₂* با روش انتشار چاهک در برابر سویه‌های تولید کننده زیست‌لایه مورد آزمایش قرار گرفت. کشت خالص میکروارگانیسم‌ها در محیط مولر هینتون براث MHB استریل صورت گرفت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۶-۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از ۲۴ ساعت، جذب نوری کشت فوق در حدود ۰.۱ در ۶۰۰ نانومتر تنظیم شد تا غلظت 1×10^8 CFU/ml به دست آید. چاهک‌هایی با قطر ۶ میلی‌متر با استفاده از پانچ ژل روی پلیت MHA ساخته شد. سپس از طریق سواب‌های پنبه‌ای استریل هر سویه به طور یکنواخت بر روی پلیت کشت شد. غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات *TiO₂* با استفاده از میکروپیپت در هر یک از چاهک‌های ایجاد شده در همه پلیت‌ها ریخته شد. رقت سریالی *TiO₂* NPs به چاهک‌های آزمایش اضافه شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد.

فعالیت ضد بیوفیلمی نانوذرات بر علیه سویه‌های با قدرت بالای تشکیل زیست‌لایه بررسی گردید (۱۱). بدین ترتیب که غلظت‌های ۵۱۲، ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲ و صفر میکروگرم بر میلی‌لیتر این نانوذره به چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه دارای محیط کشت LB حاوی غلظت نیم مک فارلند باکتری‌ها اضافه می‌گردید و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری می‌شد. سپس کشت باکتریایی در OD=600 خوانده شد. برای حذف باکتری‌های پلانکتونیک پلیت‌ها شسته شدند و بیوفیل‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله به مدت ۳۰ دقیقه رنگ می‌گردیدند. پس از خالی کردن مایع و خشک کردن پلیت‌ها،

ب) خصوصیات ذرات نانوذرات: تجزیه و تحلیل XRD تشکیل بلورهای TiO_2 در نمونه را تأیید کرد (شکل ۲). تصویر SEM نانوذره‌های کروی را با قطر $35/76$ تا $78/17$ نانومتر نشان می‌دهد (شکل ۳). هیچ قله ناخالصی در بین پیکها مشاهده نشد که نشان دهنده خلوص بالای نانوذرات ساخته شده است. اندازه متوسط ذرات 56 نانومتر بود که نشان می‌دهد NPهای TiO_2 سنتز شده در مقیاس نانو بودند.



شکل ۳: الگوی XRD نانوذرات TiO_2 ، با فرآیند سل-ژل.

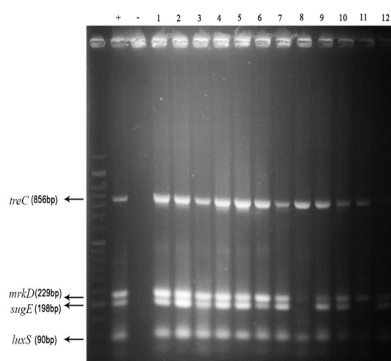


شکل ۴: تصویر SEM ذرات نانوذرات TiO_2 سنتز شده.

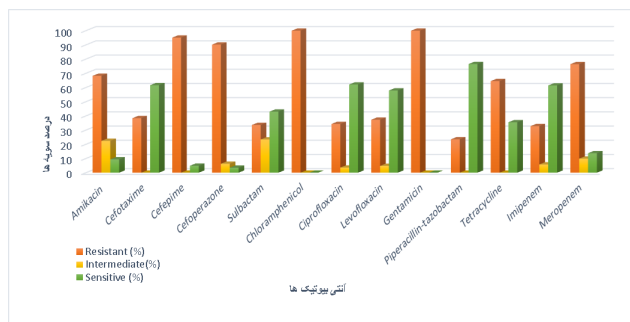
ج) فعالیت ضد زیست لایه نانوذرات: با استفاده از پلیتهای ۹۶ چاهکی، فعالیت ضد بیوفیلم رقت سریالی نانوذرات TiO_2 در برابر جدایه‌هایی که بیوفیلم‌های کاملاً قوی را تشکیل می‌دهند، مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها نشان داد که نانوذرات ایجاد زیست لایه در 14 سویه را در غلظت 256 میکروگرم بر میلی لیتر مهار نمودند.

د) بیان ژن: اثرات TiO_2 بر بیان ژنهای هدف که ممکن است دلیل مهار تشکیل زیست لایه را نشان دهد، مورد بررسی قرار

کلبسیلا نومونیه بیوفیلم تشکیل دادند. طبقه بندی ظرفیت تشکیل زیست لایه در مقایسه با گروه کنترل مثبت، گروه بدون زیست لایه، قدرت تشکیل زیست لایه ضعیف، متوسط و زیاد، نشان داد که $52/63\%$ از سویه‌ها (30 عدد) به عنوان سویه‌های تولید کننده متوسط زیست لایه طبقه بندی شده‌اند، $29/82\%$ (17 عدد) زیست لایه‌های کاملاً قوی تشکیل داده‌اند، $28/12$ درصد (7 عدد) زیست لایه ناچیز تولید کردند و $26/5$ درصد (3 عدد) هیچ زیست لایه‌ای تولید نکردند. سویه‌های کلبسیلا نومونیه که از سواب های زخم جراحی، خلط، خون و نمونه ادرار بیماران جدا شده‌اند، در مقایسه با جدایه‌های به دست آمده از نمونه‌های ادوات غذایی، توانایی بیشتری برای تشکیل بیوفیلم‌های کامل و یا متوسط تثبیت شده را داشتند ($p < 0.002$). علاوه بر این، یافته‌ها نشان داد که توانایی تشکیل زیست لایه در میان جدایه‌های به دست آمده از خلط از سایر سویه‌ها بیشتر بوده است ($p < 0.001$).



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR برای ژنهای هدف در جدایه‌ها. ستون اول از سمت چپ: لدر 100 جفت بازی، ستون $+$: کنترل مثبت، ستون $-$: بلانک و ستون‌های ذیل اعداد نشان دهنده سویه‌ها است.



شکل ۲: الگوی حساسیت 62 سویه کلبسیلا نومونیه جدا شده در این مطالعه در برابر آنتی‌بیوتیک‌های رایج.

۲۱ نانومتر با غلظت ۱٪ دارای اثر ضد میکروبی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1431 و *لیستریا مونوسیتوژنز* می باشند. نتیجه گیری نهایی آن‌ها نشان داد که با توجه به اثر ضد میکروبی که نانوذرات نقره و TiO_2 بر علیه باکتری‌ها با منشا غذا از خود نشان می دهند می توان از آن‌ها در جهت کنترل آلودگی های میکروبی مواد غذایی در بسته بندی های ضد میکروبی مواد غذایی استفاده نمود (۱۶). این مطالعه از نظر اثربخشی نانوذرات فلزی بر روی باکتری‌ها به عنوان عواملی ضد میکروبی در راستای نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر بوده است. اثرات ضد میکروبی نانوذرات TiO_2 که به روش سل ژل تولید گردیده اند در مطالعه ای توسط دسای و همکارانش در سال ۲۰۰۹ مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نهایی آن‌ها نشان داد که TiO_2 در اثر تابش ماوراء بنفش فعالیت های فتوکاتالیتیک را از خود نشان می دهد. همچنین TiO_2 ساخته شده دارای فعالیت های ضد میکروبی بر علیه بیماری زاهای *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا نومونیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است (۱۳). داده های به دست آمده در این مطالعه در راستای نتایج به دست آمده توسط دسای و همکاران بوده است. در مطالعه حاضر مقاومت کلی نشان داده شده توسط جدایه های بالینی *کلبسیلا نومونیه* بیشتر از مطالعه دسای بود که می تواند ناشی از استفاده نامناسب و بیش از اندازه از آنتی بیوتیک ها باشد که در بسیاری از مطالعات مشاهده شده است. در مطالعه حاضر، ۹۱/۹۳٪ از جدایه ها سویه های تولید کننده بیوفيلم بودند که مشابه با داده های مطالعه سیفی و همکاران (بیش از ۹۳٪) در ایران (۱۶) است. اما این فراوانی بیشتر از نتایج به دست آمده در مطالعه یانگ و همکاران (۶۲/۵ درصد) است (۱۷). این تفاوت می تواند ناشی از تفاوت در مناطق جغرافیایی نمونه برداری نیز باشد. در سال ۲۰۱۵ در مطالعه سانتوش و همکاران فعالیت ضد بیوفيلمی پلیمر $Epoxy/Ag-TiO_2$ بر علیه سویه های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس* اثبات شد اما مکانیسم دقیقی برای آن تعریف نگردید (۱۸). همچنین ابراهیم و همکاران با تولید نانوذرات TiO_2 به بررسی اثر آن‌ها بر باکتری های گرم

گرفت. پس از قرار گرفتن ۲۴ ساعته باکتری‌ها در معرض غلظت های مختلف TiO_2 بیان ژن های کد کننده تولید زیست‌لايه با استفاده از واکنش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. داده ها در مورد ژن های $mrkD$ ، $treC$ ، $16SrRNA$ و $sugE$ نشان داد که نانوذرات در مقایسه با شاهد تغییر قابل توجهی را در بیان ژن های هدف ایجاد نکردند. اما TiO_2 در مقایسه با گروه شاهد، بیان ژن $LuxS$ را به طرز معنی داری کاهش داد. داده ها نشان داد که Fold change (میزان تغییرات بیان یک ژن نسبت به ژن خانه دار) بیان ژن $LuxS$ در باکتری های تحت تاثیر با نانوذرات در گروه آزمون در مقایسه با گروه کنترل به میزان $-3/85$ تغییر یافته است (CI=95%, p=0.002).

بحث

آمار، تحقیقات و گزارشات سازمان بهداشت جهانی اثبات کرده است که گسترش سویه های مقاوم یکی از بزرگ ترین چالش های سلامت در سراسر جهان است و پیشرفت مداوم استراتژی های درمانی علیه عفونت های باکتریایی را بر می انگیزد. در چند دهه اخیر، نانو مواد به دلیل ویژگی های جدید شامل بزرگ بودن نسبت سطح به حجم و فعالیت واکنشی بالا مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۱۵). نتایج این مطالعه نشان داده است که تیمار باکتری های *کلبسیلا نومونیه* مواجه شده با نانوذرات TiO_2 در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار باعث کاهش میزان بیان ژن $LuxS$ شده است. در مطالعه حاضر، از نظر دو عامل مقاومت آنتی بیوتیکی و نیز تاثیر نانوذرات بر جدایه ها، تفاوتی بین سویه های جدا شده از ادوات طبخ غذای بیمارستانی و جدایه های بیماران یافت نشد. پژوهش مشابه با مطالعه حاضر توسط کرمانشاهی و همکاران به بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره و TiO_2 بر علیه باکتری های بیماری زا با منشا غذا شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC ۱۴۳۱، *لیستریا مونوسیتوژنز* از طریق تعیین MIC و MBC پرداخته است. نتایج آن‌ها نشان داد که نانوذرات نقره با اندازه ۱۰۳ نانومتر با غلظت یک میلی مولار، نانوذرات TiO_2 با اندازه

مطالعات بررسی شده بر از بین رفتن آلودگی‌ها و باکتری‌ها در استفاده از این ماده تاکید داشتند (۲۵). مطالعه حاضر نمونه دیگری از مطالعات در زمینه استفاده از نانوذرات فلزی در زمینه فعالیت‌های ضد میکروبی و با نتایجی هم راستا با مطالعات مذکور در مورد کاهش قدرت بروز بیوفیلم در باکتری کلسیلا نومونیه است.

نتیجه‌گیری

با توجه به مصرف بی‌رویه داروهای ضد میکروبی در ایران مقاومت آنتی‌بیوتیکی رو به افزایش است و به نظر می‌رسد مشکل اول جامعه بهداشتی در این کشور خواهد بود. در مجموع داده‌ها نشان داد که استفاده از نانوذرات با عوارض کم می‌تواند به عنوان یک جایگزین برای این داروها مطرح شود. با توجه به افزایش کاربرد نانوذرات فلزی برای اهداف ضد میکروبی در صنایع غذایی، پزشکی و غیره، به نظر می‌رسد داده‌های به دست آمده در این مطالعه بتواند به عنوان نقطه روشنی در زمینه استفاده از نانوذرات تیتانیوم اکساید به عنوان یک ماده ضد میکروبی بر ضد باکتری کلسیلا نومونیه مطرح گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از گروه میکروبی شناسی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی اراک به خاطر همکاری صمیمانه در اجرای پژوهش کمال امتنان را دارند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه و داده سازی را در این مقاله رعایت نموده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد

منفی پرداختند و نشان دادند که این نانوذرات با افزایش میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب از بین رفتن باکتری‌های تشکیل دهنده زیست‌لایه می‌شوند (۱۹). روزنبرگ و همکارانش در مطالعه دیگری نشان دادند که به طور کلی نانوذرات با تأثیر بر دیواره سلولی، آسیب به DNA و افزایش رادیکال‌های آزاد، اثرات منفی را بر باکتری‌های دخیل در تشکیل زیست‌لایه سطوح می‌گذارند (۲۰). همانطور که در گزارش‌های دیگر نشان داده شده است، توانایی ضد بیوفیلم نانوذره‌ها می‌تواند ناشی از اختلال در ساختار زیست‌لایه و نفوذ یون‌های فلزی به لایه‌های باکتریایی باشد که برای آنتی‌بیوتیک‌های رایج در دسترس نیست (۲۱). داده‌های مطالعه ما نشان داد که تغییر در بیان ژن‌های دخیل در تولید زیست‌لایه می‌تواند مکانیسم دیگری برای مبارزه این نانوذرات با زیست‌لایه باشد.

عواد و همکارانش در تحقیقی در سال ۲۰۱۴ به بررسی فعالیت ضد باکتریایی TiO_2 بهبود یافته با یون‌های آهن در ایمپلنت‌های پزشکی پرداختند. در این مطالعه نانوذرات آهن به همراه TiO_2 مورد استفاده قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که این ماده دارای توانایی ضد میکروبی بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس در شرایط تاریک است اما بر روی اشریشیا کلی تأثیر مشهود ضد میکروبی ندارد (۲۲). در تحقیق دیگری، پرت و همکاران در سال ۱۹۸۹ نتایجی مشابه با مطالعات مذکور در زمینه استفاده از ساختارهای ضد میکروبی ضد نانوذرات نقره در ترکیب با TiO_2 و تانتالوم اکساید کشف کرده بودند (۲۳). مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ تحت عنوان ارزیابی مقایسه‌ای اثر نانوذرات TiO_2 و نوع فتوکاتالیستی آن بر تشکیل زیست‌لایه قارچی توسط حقیقی و همکاران انجام شد و نتایج آن مشخص نمود که نانوذره TiO_2 اثر فتوکاتالیستی مطلوبی را در حذف زیست‌لایه کاندیدا/آلبیکس در مقایسه با داروی فلوکونازول نشان دادند. از این رو می‌تواند راهکاری جدید برای پیشگیری از تشکیل زیست‌لایه قارچی به ویژه بیوفیلم‌های مرتبط با ابزارهای پزشکی باشد (۲۴). واکاناردی و همکارانش در یک مطالعه مروری در سال ۲۰۱۷ به بررسی یک ماده ضد عفونی کننده محیط آبی فتوکاتالیستیک بر پایه TiO_2 پرداختند. غالباً

References

1. Wyres KL, Lam MM, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*. 2020;1-16.
2. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*—clinical and molecular perspectives. *J Intern Med*. 2020;287(3):283-300.
3. Ernst CM, Braxton JR, Rodriguez-Osorio CA, Zagieboylo AP, Li L, Pironti A, et al. Adaptive evolution of virulence and persistence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Med*. 2020;26(5):705-11.
4. Maruthapandi M, Saravanan A, Luong JH, Gedanken A. Antimicrobial Properties of the Polyaniline Composites against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of functional biomaterials*. 2020;11(3):59.
5. Khan S, Khan SN, Akhtar F, Misba L, Meena R, Khan AU. Inhibition of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*: nanoparticles induced photoinactivation in presence of efflux pump inhibitor. *Eur J Pharm Biopharm*. 2020.
6. Wu G, Ji H, Guo X, Li Y, Ren T, Dong H, et al. Nanoparticle reinforced bacterial outer-membrane vesicles effectively prevent fatal infection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2020;24:102148.
7. Ikram M, Umar E, Raza A, Haider A, Naz S, Ul-Hamid A, et al. Dye degradation performance, bactericidal behavior and molecular docking analysis of Cu-doped TiO₂ nanoparticles. *RSC Advances*. 2020;10(41):24215-33.
8. Kose O, Tomatis M, Leclerc L, Belblidia N-B, Hochepeid J-F, Turci F, et al. Impact of the physicochemical features of TiO₂ nanoparticles on their in vitro toxicity. *Chem Res Toxicol*. 2020;33(9):2324-37.
9. Gao Y, Nie W, Zhu Q, Wang X, Wang S, Fan F, et al. The Polarization Effect in Surface-Plasmon-Induced Photocatalysis on Au/TiO₂ Nanoparticles. *Angewandte Chemie*. 2020;132(41):18375-80.
10. Cano EJ, Cafilisch KM, Bollyky PL, Van Belleghem JD, Patel R, Fackler J, et al. Phage therapy for limb-threatening prosthetic knee *Klebsiella pneumoniae* infection: case report and in vitro characterization of anti-biofilm activity. *Clin Infect Dis*. 2020.
11. Alavi M, Karimi N. Antiplanktonic, antibiofilm, antiswarming motility and anti-quorum sensing activities of green synthesized Ag–TiO₂, TiO₂–Ag, Ag–Cu and Cu–Ag nanocomposites against multi-drug-resistant bacteria. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2018;46(sup3):S399-S413.
12. Moori Bakhtiari N, Javadmakoei S. Survey on biofilm production and presence of attachment factors in human uropathogenic strains of *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2017;10(6).

13. Desai V, Meenal K. Antimicrobial activity of titanium dioxide nanoparticles synthesized by sol-gel technique. *Res J Microbiol*. 2009;4(3):97-103.
14. Nailis H, Kucharíková S, Řičicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. *BMC microbiology*. 2010;10(1):1-11.
15. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet infectious diseases*. 2013;13(9):785-96.
16. Seifi K, Kazemian H, Heidari H, Rezagholizadeh F, Saeed Y, Shirvani F, et al. Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur journal of microbiology*. 2016;9(1).
17. Yang D, Zhang Z. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum β -lactamases. *Journal of Hospital Infection*. 2008;68(4):369-71.
18. Natarajan K. Antibiofilm activity of epoxy/Ag-TiO₂ polymer nanocomposite coatings against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Coatings*. 2015;5(2):95-114.
19. Ibrahim KH. Synthesis and antibiofilm activity of metal oxide nanoparticles against some Gram-negative bacteria. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*. 2020;23:231-402.
20. Rosenberg M, Visnapuu M, Vija H, Kisand V, Kasemets K, Kahru A, et al. Selective antibiofilm properties and biocompatibility of nano-ZnO and nano-ZnO/Ag coated surfaces. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-15.
21. Singh P, Kim YJ, Wang C, Mathiyalagan R, El-Agamy Farh M, Yang DC. Biogenic silver and gold nanoparticles synthesized using red ginseng root extract, and their applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2016;44(3):811-6.
22. Awad NK, Edwards SL, Morsi YS. A review of TiO₂ NTs on Ti metal: Electrochemical synthesis, functionalization and potential use as bone implants. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;76:1401-12.
23. Pratt AS, Smith PR. Antimicrobial compositions consisting of metallic silver combined with titanium oxide or tantalum oxide. *Google Patents*; 1989.
24. Haghghi F, Roudbar Mohammadi S, Mohammadi P, Eskandari M. Comparative evaluation of the effects of TiO₂ nanoparticles and its photocatalytic form on the formation of fungal biofilms. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2012;15(1):27-34.
25. Reddy PVL, Kavitha B, Reddy PAK, Kim K-H. TiO₂-based photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media: a review. *Environ Res*. 2017;154:296-303.