بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال ترکیب نانوذرات نقره سنتزشده توسط عصاره قارچ گانودرما و کاربرد آن در جدایه‌های اشریشیاکلی جداشده از عفونت‌های ادراری مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک

حمیدرضا فرزین[1]، محدثه امیری[2]، سمیرا کدوغنی ثانی[3]، مجید جمشیدیان مجاور[4*]

1. استادیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران.
2. دانش آموخته ی کارشناسی ارشد، رشته باکتری شناسی،گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران.
3. دانش آموخته ی کارشناسی ارشد، میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی سبزوار، ایران.
4. استادیار، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: 99/1/24 تاریخ پذیرش: 99/10/10

* نویسنده مسئول: m.jamshidian@rvsri.ac.ir
صندوق پستی: 174-91735

چکیده

عفونت مجاری ادراری از رایج‌ترین عفونت‌های باکتریایی است و تعداد زیادی از مراجعه‌کنندگان به پزشک و بیماران بستری در بیمارستان‌ها را کسانی تشکیل می‌دهند که این مشکل را دارند. نانوذرات در زمینه‌های مختلف پزشکی و صنعتی کاربرد دارند و نانوذرات نقره به‌دلیل رسانایی خوب و پایداری شیمیایی از اهمیت بسیاری برخوردار هستند. نانوذرات نقره با آزادسازی یون‌های نقره علیه باکتری‌های گوناگون اثربخش است. این مطالعه روی 50 نمونه از کشت‌های مثبت مبتلا به عفونت ادراری مراجعه‌کنندگان به آزمایشگاه بیمارستان امام‌رضا(ع) بجنورد انجام شده است. مقاومت و حساسیت جدایه‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک ارزیابی و اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره آبی قارچ گانودرما لوسیدوم به روش میکرودایلوشن (ریز رقت سریالی) انجام شد. برای اندازه‌گیری ابعاد و شکل نانوذرات نقره از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. همچنین، برای بررسی ترکیبات آلی احتمالی که در سنتز نانوذرات امکان مداخله داشتند، آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز انجام شد. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (84درصد) بود و نانوذرات ابعاد 20 تا 45 نانومتر داشتند. میانگین غلظت MBC و MIC به‌دست‌آمده در این پژوهش به‌ترتیب 509/83 و 230 بود. نانوذرات تولیدشده خاصیت ضد میکروبی دارند و در مقادیر معین می‌توانند جایگزین خوبی برای درمان بیماری‌های عفونی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها باشند.

کلید واژگان: عفونت ادراری، اشریشیاکلی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، نانوذرات نقره، قارچ گانودرما لوسیدوم

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.8.0]

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری یکی از عفونت‌های شایع و مهم در تمامی سنین است و سالانه 150 میلیون نفر در سرتاسر جهان به این عفونت مبتلا می‌شوند. همچنین، این عفونت در میان مراجعان به بیمارستان و بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان، یکی از بارزترین عفونت‌ها است. باکتری اشریشیاکلی یکی از عوامل باکتریایی مهم ایجادکننده عفونت ادراری در انسان است و در تمامی سنین مشاهده می‌شود [1]. اشریشیاکلی سویه اوروپاتوژنیک عامل اصلی ایجاد این عفونت است که تقریباً 80درصد این عفونت‌ها را ایجاد می‌کند [2]. باکتری اشریشیاکلی باسیل بی‌هوازی اختیاری و جزء فلور نرمال روده انسان‌ها و حیوانات است. همچنین، اکثر عفونت‌های ناشی از باکتری اشریشیاکلی در انسان به‌صورت فرصت‌طلبانه رخ می‌دهد [3]. امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی به یکی از چالش‌های مهم در پیشگیری، درمان و کنترل بیماری‌های عفونی (مانند عفونت ادراری) و تهدیدی برای سلامتی عمومی انسان‌ها تبدیل شده است [4].

از دلایل ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، می‌توان به مصرف بی‌رویه و نادرست داروها و استفاده بیش‌ازحد آنتی‌بیوتیک‌ها در حیوانات تولیدکننده مواد غذایی اشاره کرد [5و6]. نانوذرات نقره با آزادسازی یون‌های نقره بر باکتری‌های گوناگون اثر می‌گذارند. این مسئله که باکتری‌های متفاوت دربرابر نانوذرات مقاومت پیدا نمی‌کنند، بسیار مهم است و سبب می‌شود نانوذرات بر طیف وسیعی از باکتری‌ها اثرگذار باشند [7].

اندازه و اشکال نانوذرات نقره در فعالیت آنتی‌باکتریال نانوذرات تأثیرگذار است. واکنش‌هایی که نانوذرات نقره با سایز کمتر از 10 نانومتر در باکتری‌ها موجب می‌شوند سبب می‌شود خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات افزایش یابد. با کوچک‌ترشدن اندازه نانوذرات نقره، نسبت سطح به حجم آنها افزایش می‌یابد و با سطح سلول باکتری تماس بیشتری پیدا می‌کنند. همچنین، اشکال نانوذرات در مقابله با باکتری‌ها مؤثر است. برای مثال، مشخص شده است که تأثیر نانوذرات مثلثی درمقابله با اشریشیاکلی بیشتر از نانوذرات کروی و میله‌ای است [8و9].

قارچ‌ها خاصیت‌های درمانی متفاوتی چون خاصیت ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد حساسیت، تقویت سیستم ایمنی، ضد توموری، کاهش قند و فشار خون و غیره دارند [10]. برای مثال، قارچ گانودرما به‌دلیل داشتن خواص متعدد درمانی به‌عنوان بهترین و مؤثرترین قارچ دارویی شناخته شده است [11].

هدف از این مطالعه بررسی اثر خاصیت آنتی‌باکتریال ترکیب نانوذرات نقره سنتزشده توسط عصاره قارچ گانودرما در درمان عفونت ادراری مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها است.

مواد و روش کار

در این مطالعه 50 نمونه از کشت‌های مثبت دارای عفونت ادراری از آزمایشگاه بیمارستان امام رضا شهرستان بجنورد بررسی شد. پلیت‌های حاوی باکتری که در محیط مک کانکی آگار (مرک-آلمان) دارای کلنی‌های صورتی رنگ و صاف بودند، به‌عنوان جدایه‌های مشکوک به *اشریشیاکلی* انتخاب شدند و برای تایید جدایه های مورد مطالعه از آزمایش‌های بیوشیمیایی (نظیر تست‌های اوره، سیمون سیترات، TSI و SIM) (مرک-آلمان) استفاده شد.

برای تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بررسی‌شده، ابتدا یک کلنی از هر جدایه در مولر هینتون براث (مرک-آلمان) کشت و پس از رسیدن به کدورت نیم مک‌فارلند با استفاده از سوآب استریل از محیط مایع برداشت به صورت چمنی در محیط مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سیپروفلوکساسین (5 میکروگرم)، کوتریماکسازول(25 میکروگرم)، جنتامایسین (10 میکروگرم)، نالیدیکسیک

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.8.0]

اسید (30 میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (300 میکروگرم)، آمپی‌سیلین (10 میکروگرم) و لووفلوکساسین (5 میکروگرم)، (کرج- پادتن طب) به‌وسیله پنس استریل روی پلیت مولر هینتون آگار قرار داده شدند. پلیت‌ها به‌مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از انکوباسیون قطر هاله‌های ایجادشده اندازه‌گیری و با جدول استاندارد CLSI مقایسه شد[12].

تهیه عصاره آبی قارچ گانودرما

برای تهیه عصاره آبی این قارچ، 25 گرم قارچ گانودرما را با هاون چینی خرد و سپس 100 سی‌سی آب مقطر به آن اضافه می‌کنیم. این محلول فوق را 10 دقیقه می‌جوشانیم و بعد آن را از کاغذ صافی عبور می‌دهیم. برای استریل‌کردن محلول آن را فیلتر می‌کنیم.

بارگذاری نانوذره نقره و قارچ گانودرما

برای تهیه ترکیب نانو ذره قارچ نقره 0/83 گرم از نیترات نقره با 100سی‌سی آب مقطر مخلوط می‌کنیم و مقدار 0/5 سی‌سی از نقره (محلول به‌دست آمده از محلول قبلی) را با 9/5 سی‌سی عصاره آبی قارچ به‌مدت 24 ساعت روی شیکر قرار می‌دهیم. محلول حاصل را به مدت 10 دقیقه با دور 13000 rpm سانتریفیوژ (اپندورف-آلمان) و پس از چند بار شست‌وشو، از رسوب حاصل برای انجام‌دادن تست‌های تعیین حساسیت استفاده می‌کنیم.

تست MTT

برای بررسی تأثیر آنتی‌باکتریال ترکیب نانوذرات نقره سنتزشده با عصاره قارچ گانودرما در رشد و تکثیر سلول‌ها از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. این روش تشخیص، برای اندازه‌گیری زنده‌بودن، تکثیر و فعالیت سلول‌ها حساس، کمّی و مطمئن است. اساس این تست شکستن نمک زردرنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده و تولید بلورهای بنفش‌رنگ و نامحلول فورمازان است. هرچه تعداد سلول‌های زنده بیشتر باشد، شدت رنگ تولیدشده بیشتر خواهد بود و بر عکس [13].

در این پژوهش برای سنجش سمیت سلولی از آزمون MTT استفاده شد. به این منظور ابتدا سوسپانسیون سلولی از رده سلولی فیبروبلاست929 L در 100 میکرولیتر محیط کشت DMEM (Grand Island,NY) داخل پلیت 96 خانه کشت داده شد. میکروپلیت‌ها به مدت 24 ساعت انکوبه شدند. پس از طی زمان مشخص انکوباسیون، میکروپلیت را زیر میکروسکوپ بررسی کردیم تا از اتصال سلول‌ها به کف میکروپلیت اطمینان حاصل کنیم. از ردیف اول میکروپلیت به‌عنوان شاهد و از ردیف دوم به‌عنوان کنترل استفاده شد.

در این پژوهش از غلظت‌های 10^{-1}تا 10^{-8} میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره قارچ و نانوذره تهیه و میکروپلیت به مدت 24 ساعت انکوبه شد. سپس محیط کشت درون پلیت 96 خانه‌ای تخلیه و به هر چاهک 100 میکرولیتر محیط کشت بدون FBS (سرم جنین گاو) به همراه 15 میکرولیتر محلول MTT اضافه و پلیت به مدت 4 ساعت درون انکوباتور انکوبه شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط‌های درون گودهای پلیت تخلیه و به هر گوده پلیت 96 خانه به میزان 200 میکرولیتر Dimethyl sulfoxide) DMSO) اضافه و با دستگاه قرائت‌گر الایزا (Biotek.USA) جذب سلول‌ها در طول موج 570 نانومتر خوانده شد.

روش تهیه محلول سوسپانسیون میکروبی برای تست MIC

جدایه‌های به محیط کشت مایع مولر هینتون براث (مرک-آلمان) انتقال داده و به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. از سوسپانسیون نهایی برای

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.8.0]

انجام‌دادن آزمون حساسیت دارویی و آزمون MIC استفاده می‌شود.

تست میکرودایلوشن براث برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی(MIC)

برای اندازه‌گیری و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی، روش رقت‌سازی سریالی سه‌بار تکرار شد.

ابتدا 100 میکرولیتر از محیط کشت مولر هنتون براث (مرک-آلمان) داخل یک ردیف از چاهک‌های میکروپلیت ریخته و سپس به اولین چاهک به میزان 100 میکرولیتر از بالاترین غلظت محلول ترکیب نقره و قارچ اضافه شد. پس از مخلوط‌شدن از چاهک اول به میزان 100 میکرولیتر محلول برداشته و به چاهک بعدی (که 100 میکرولیتر محیط کشت داشت) اضافه شد. این روند از چاهک دوم به سوم و به‌همین‌ترتیب تا چاهک دهم ادامه پیدا کرد تا تمامی غلظت‌های مورد نظر ساخته شوند. پس از تهیه رقت‌ها به میزان 100 میکرولیتر به چاهک‌های 1 تا 10 از سوسپانسیون میکروبی اضافه شد. همچنین از چاهک یازدهم به‌عنوان کنترل مثبت حاوی 100 میکرولیتر محیط کشت و عصاره نقره و قارچ و از چاهک دوازدهم به‌عنوان کنترل منفی حاوی 100 میکرولیتر محیط کشت استفاده شد. پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس از آن جذب نوری آنها در طول موج 630 نانومتر با دستگاه قرائت گر الایزا (Biotek.USA) قرائت شد.

برای مشخص‌کردن MBC از چاهک‌های مربوط به MIC و چاهک‌های دارای غلظت بیشتر که کدورت آنها را نمی‌توان تشخیص داد، به میزان 10 میکرولیتر برداشته و روی محیط مولرهینتون آگار (مرک-آلمان) به‌صورت خطی کشت داده و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. رشدنیافتن باکتری در هر غلظت نشان‌دهنده MBC است.

نتایج

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، از بین 50 جدایه مطالعه‌شده، 18 جدایه دربرابر یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت می‌کردند. همچنین، بیشترین میزان مقاومت جدایه‌ها دربرابر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کوتریماکسازول و لووفلوکساسین و بعد از آن نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و نیتروفورانتوئین بود.

جدول شماره 1 فراوانی مقاومت و حساسیت جدایه‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه

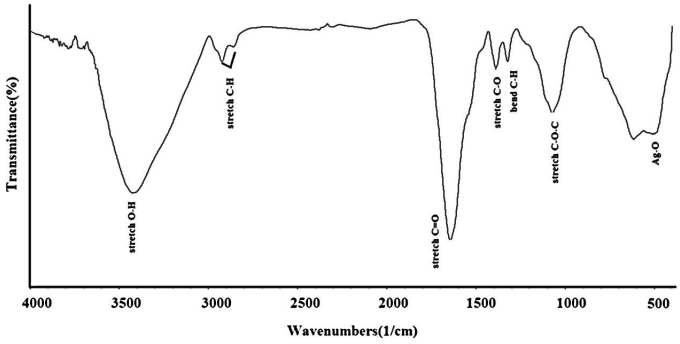
آنتی بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم
نالیدیکسیک اسید	30 درصد	18 درصد	52 درصد
سیپروفلوکساسین	40درصد	16درصد	44 درصد
لووفلوکساسین	10 درصد	30 درصد	60 درصد
جنتامایسین	78 درصد	0 درصد	22 درصد
کوتریماکسازول	38 درصد	2 درصد	60 درصد
نیتروفورانتوئین	94 درصد	0 درصد	6 درصد
آمپی سیلین	10درصد	6 درصد	84 درصد
تتراسایکلین	5 درصد	15 درصد	80 درصد

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.8.0]

نتایج آنالیز FT-IR

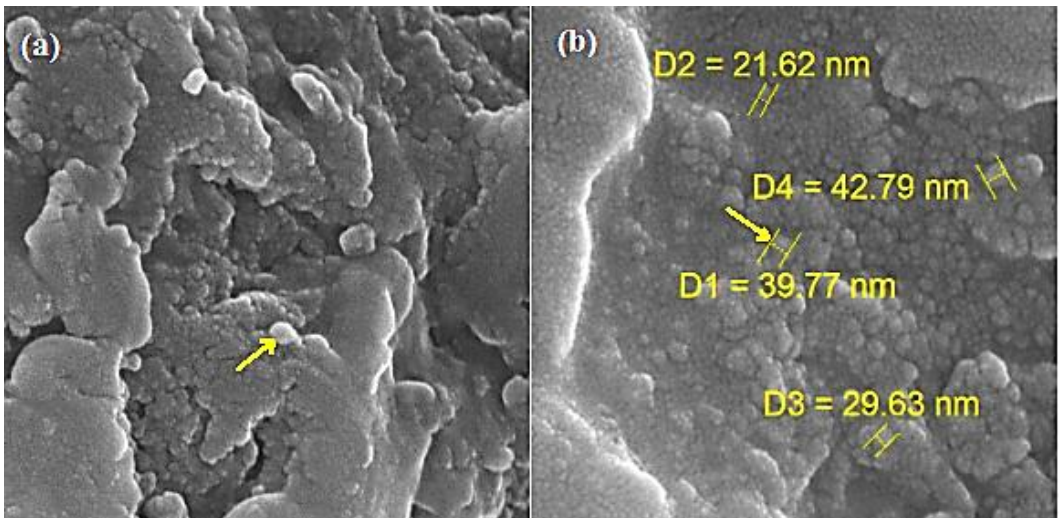
آنالیز FT-IR به‌منظور بررسی گروه‌های عاملی در ساختار و بررسی تغییرات پس از اصلاح ساختار انجام می‌گیرد. در شکل 1 طیف IR نمونه ترکیب‌شده عصاره قارچ گانودرما با ذرات نقره نشان داده شده است. پیک پهن در ناحیه cm^{-1} 3422 مربوط به ارتعاشات کششی O-H است. پیک مشاهده‌شده در ناحیه cm^{-1} 2924 ناشی از ارتعاشات کششی C-H است. پیک‌های موجود در ناحیه cm^{-1} 1700-1500 از نمونه قارچ گانودرما به ارتعاشات پیوند آمیدی اشاره می‌کند که ناشی از ساختار پروتئینی است. باند مشاهده‌شده در ناحیه cm^{-1} 1644و 1538 به ارتعاشات کششی C=O و نیز ارتعاشات خمشیN-H مربوط می‌شود. پیک‌های دوتایی مشاهده‌شده در ناحیه 900-400 به ساختار کربوهیدراتی نمونه برمی‌گردد. پیک در ناحیه cm^{-1} 1389و 1322و 1072 به‌ترتیب به ارتعاش کششی C-O و ارتعاش خمشی C-H و ارتعاش کششی C-O-C اشاره می‌کند. مشاهدات تأیید می‌کند که گروه‌های عاملی C=O و O-H مسئول تولید نانوذرات نقره هستند. پیک تیز در ناحیه cm^{-1} 450-550 به ارتعاش کششی Ag-O مربوط می‌شود.



تصویر1: طیف **FT-IR** نمونه ترکیب‌شده عصاره قارچ گانودرما با ذرات نقره

نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM

تصاویر 2a نانوذرات نقره را با مورفولوژی ذره‌ای نشان می‌دهد که در تصویر با فلش زردرنگ مشخص شده و به‌صورت کروی است. نتایج حاصل از تصاویر SEM در شکل 2b نشان می‌دهد اندازه ذرات نقره 45-20 نانومتر است.



تصویر2: تصاویر SEM

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.8.0]

نتایج MBC و MIC

برای تعیین MBC ، بعد از تعیین MIC (آخـرین چاهـک شفاف)، رقت‌های قبل و بعد از آن به محیط مولرهینتـون آگار منتقل و کشت داده شـد. بعـد از زمـان انکوباسـیون اولین رقتی که در پلیت آگار رشدی نداشته باشد، به عنوان MBC گزارش می‌شود.

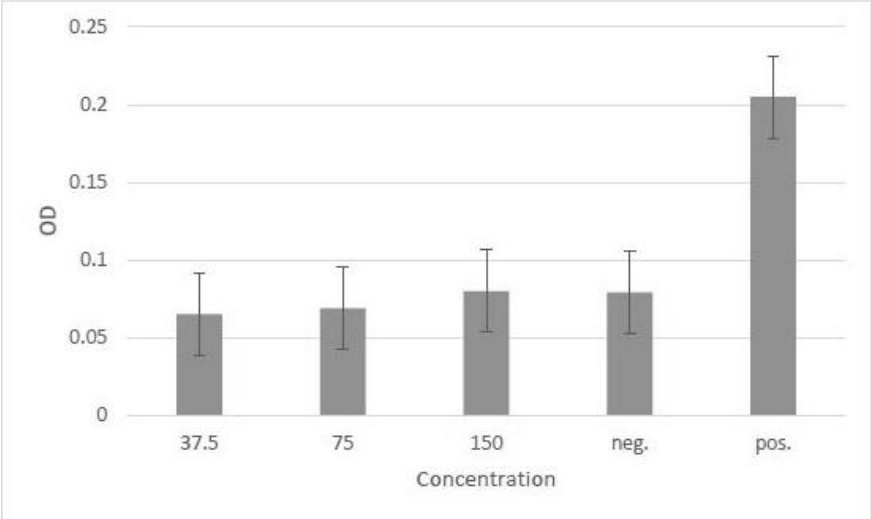
جدول شماره 2 میانگین نتایج MBC و MIC

نام باکتری مورد مطالعه	MBC	MIC
اشریشیاکلی	509/83	230

نتایج MTT

نتیجه تست MTT

برای بررسی اثر کشـندگی نـانوکمپلکس بـر رده سـلولی فیبروبلاست929 L آزمایش سه‌بار تکرار شد. نتایج تحلیل آماری نشان داد سطح معناداری برای عصاره قارچ + نقـره بوده است. آزمون توکی نشان داد بین گروه‌های آزمایشـی هم تفاوت معناداری وجود دارد.



نمودار شماره 1

بحث

امروز مقاومت آنتـی‌بیـوتیکی بـه چـالش مهـم و مشـکل اساسی در درمان و کنترل بیماری‌های عفونی نظیر عفونت ادراری تبدیل شده است و تهدیدی جدی بـرای سـلامتی عمومی انسان‌ها تلقی می‌شود [14].

در این مطالعه 50 نمونـه از کشـت‌هـای مثبـت دارای عفونت ادراری از آزمایشگاه بیمارستان امام رضا شهرستان بجنـورد بررسـی شـد. بـرای تعیـین میـزان مقاومـت و حساسیت جدایه‌ها از روش کربی بائر استفاده شد. در این پژوهش 18 جدایه به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند که بیشـترین میـزان مقاومـت جدایـه بـه آنتـی‌بیوتیـک را آمپی‌سیلین به میزان 84 درصـد داشـت و میـزان فراوانـی آنتی‌بیوتیک‌های کوتریماکسازول(60 درصد)، نالیدیکسیک اسـید(52 درصـد)، سیپروفلوکساسـین (44 درصـد)، نیتروفورانتـوئین (6 درصـد)، جنتامایسـین(22 درصـد) و لووفلوکساسین (60 درصد) بود. نتایج حاصل از تصـاویر

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.8.0]

SEM نشـان داد، انـدازه ذرات نمونـه سـنتزی 45-20 نانومتری هستند و شکلی کروی دارند. همچنین، میـانگین غلظت MBC و MIC محلول ترکیب نقره و عصاره قارچ گانودرما در این پژوهش به‌ترتیب 509/83 و 230 بود.

در این پژوهش اثـر خاصـیت آنتـی‌باکتریـال ترکیـب نانوذرات نقره سنتزشده توسط عصاره قارچ گانودرما (رده سـلولی فیبروبلاسـت929 L) بررسـی شـده اسـت. در تحقیقات مشابه به تأثیر نانوذره یا ترکیب نانوذره با گیاهان دارویی پرداختـه نشـده اسـت. همچنـین، بـه‌دلیـل اینکـه گانودرما مؤثرترین قـارچ دارویـی اسـت و خـواص ضـد میکروبی دارد در این پژوهش از آن استفاده شده است.

پورشبانان، نجف‌آبادی و همکاران در سـال 2017 در فلاورجان تأثیر نانوذرات نقره و دی‌اکسـیدتیتـانیوم را بـر باسیل‌های گرم منفی مقاوم به چند آنتی‌بیوتیـک و مسـبب عفونت‌های ادراری بررسی کردند. نجف‌آبادی و همکاران روی 140 نمونه از جدایه‌های باکتریایی چون اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، انتروباکترآئروژنز، پروتئوس، سیتروباکتر فروندی، سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتربومـانی (از هر کدام 20 نمونه) مطالعه کردند. این جدایه‌های باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌هایی مقاوم بودند که در درمان عفونت‌هـای ادراری استفاده می‌شدند. همچنین، سـویه‌هـای اسـتاندارد آنها انجام گرفت. در پژوهش نجـف‌آبـادی از تسـت‌هـای آزمایشـگاهی نظیـر انتشـار چاهـک و دیسـک در آگـار (آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، آموکسی‌سیلین، آمپـی‌سـیلین، افلوکساسـین، استرپتومایسـین، تتراسـایکلین، سیپروفلوکساسـین، نیتروفورانتـوئین و کلرامفنیکـل) و ماکرودایلوشن استفاده شد. نتـایج پـژوهش نجـف‌آبـادی نشان می‌دهد، بیشترین مقاومت بـاکتری اشریشـیاکلی بـه آنتی‌بیوتیک تتراسـایکلین و کمتـرین آن بـه آنتـی‌بیوتیـک نیتروفورانتوئین بوده است. همچنین، میانگین میزان MBC وMIC از تأثیر نانوذرات کروی نقره با سـایز 10 نـانومتر برای باکتری اشریشیاکلی به‌ترتیب mg/ml 340 و mg/ml 275 بود [15]. نتایج پژوهش نجف‌آبادی و همکـاران بـا نتیجه این پژوهش درباره میزان مقاومت و حساسـیت بـه آنتی‌بیوتیک‌های مطالعه‌شده مشابهت و درباره میزان تـأثیر نـانوذرات مغـایرت دارد. انـدازه نـانوذرات در ایـن دو پژوهش با یکدیگر مغایرت دارند، اما هر دو نانوذره در دو پـژوهش کـروی‌شـکل هسـتند و در هـر دو پـژوهش در شرایط آزمایشگاهی نـانوذرات نقـره تـأثیر بـه‌سـزایی در جدایه‌ها داشته‌اند.

غلامی و همکـاران در سـال 2017 در همـدان تـأثیر نـانوذرات نقـره را روی باسـیل‌هـای گـرم منفـی مسـبب عفونت‌های ادراری مقاوم بـه چنـد آنتـی‌بیوتیـک بررسـی کردند. در این پژوهش از کشت‌های مثبت نمونـه بـالینی بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه‌کننده به بیمارسـتان همدان استفاده شده بود. در پـژوهش غلامـی و همکـاران مقاومت ایزولـه‌هـای مطالعـه‌شـده بـه آنتـی‌بیوتیـک‌هـای آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل، نیتروفورانتوئین، آمیکاسین، افلوکساسـین، تتراسـایکلین و اریترومایسین مطالعه و بررسی شد. برای آگاهی از میـزان تأثیر نانوذرات از روش‌های ایجاد چاهک در آگار و غلظت مهارکننده رشد و غلظت کشندگی استفاده شده بـود [16]. پژوهش غلامی و همکاران نشان می‌دهد، تمامی جدایه‌های اشریشیاکلی در پژوهش آنهـا دربرابـر آنتـی‌بیوتیـک‌هـای آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل مقاوم هستند که این نتیجه مشابه نتایج این تحقیق است (جدایـه‌هـای ایـن مطالعه نیز بیشترین میزان مقاومت را دربرابر آنتـی‌بیوتیـک آمپی‌سیلین (84درصد) داشتند). همچنین، در بررسی تأثیر نانوذرات نقره بر باکتری اشریشیاکلی به روش چاهـک در آگار میانگین میزان MIC و MBC به‌ترتیـب 200 ppm و 400 ppm بود که با مقایسه روش رقت‌سازی سریالی این تحقیق تقریباً مشابه است.

دهقان نیری و همکاران در سال 2017 در قـزوین بـه بررسی اثرات ضد باکتری و ضد قـارچی نـانوذرات نقـره

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.8.0]

ترکیب شده با عصاره آبی گیاه کنجد پرداختند. در این پژوهش اثر ضد باکتری و ضد قارچی نانوذرات نقره به دو روش دیسک و چاهک علیه باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* مورد بررسی قرار گرفت. در پژوهش دهقان نیری برای تأیید تولید نانوذرات نقره از دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج 300 تا 600 نانومتر و برای اندازه‌گیری ابعاد و شکل نانوذرات از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شده بود [17]. نتایج پژوهش دهقان نیری نشان می‌دهد ذرات حاصل، کروی و 18 تا 70 نانومتر بودند. همچنین، نانوذرات تولیدشده با عصاره آبی گیاه کنجد فعالیت ضد میکروبی مؤثری بر باکتری‌های مطالعه‌شده داشتند. مقایسه بین پژوهش دهقان نیری و این پژوهش نشان داد که نانو کمپلکس نقره با عصاره کنجد و نقره با قارچ گانودرما هر دو تأثیر آنتی‌باکتریال خوبی علیه باکتری‌های ذکرشده دارند. در میزان تفاوت اندازه بین ذرات حاصل می‌توان به تفاوت ترکیبات موجود در عصاره‌های متفاوت در دو پژوهش اشاره کرد.

طاهری و همکاران در سال 2019 در چابهار اثر ضد باکتریایی نانوذره آلومینات را روی ضد باکتری‌های بیماری‌زای غذایی اشریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا بررسی کردند. با استفاده از نانوذره روی آلومینات سنتزشده فعالیت ضد باکتری به روش انتشار دیسک بر آگار ارزیابی شد. همچنین، حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد باکتری‌ها و حداقل غلظت کشندگی باکتری‌ها به روش ماکرودایلوشن انجام گرفت و میزان مقاومت و حساسیت دو باکتری مطالعه‌شده به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نیز بررسی شد. در پژوهش طاهری برای اندازه‌گیری ابعاد و شکل نانوذرات از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شده بود. نتایج این پژوهش نشان می‌داد، در بررسی قطر هاله عدم رشد سودوموناس آئروژینوزا نسبت به باکتری اشریشیاکلی بیشتر و کمترین غلظت مهارکننده رشد و غلظت‌کشندگی باکتری‌ها مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا بوده است. همچنین، شکل نانوذره کروی و اندازه آن کمتر از 100 نانومتر گزارش شده است [18]. در این پژوهش، نانوذرات روی آلومینات علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا فعالیت ضد باکتری بسیار خوبی نشان داد. به‌صورتی‌که می‌تواند به‌عنوان ترکیب ضد باکتریایی جدید در بسته‌بندی مواد غذایی استفاده شود. نانوذرات در این مطالعه و پژوهش طاهری و همکاران در شرایط آزمایشگاهی فعالیت ضد باکتری بسیار خوبی داشته‌اند. از این نانوذرات طبق استاندارد و به‌میزان مناسب و در صورتی که استفاده از آن برای سلامتی افراد یا بسته‌بندی مواد مضر نباشد می‌توان استفاده کرد.

عمرانی و همکاران در سال 2016 در نیشابور گیاه شیرین‌بیان و نعناع و اثر ضد باکتریایی آن را بر باکتری‌های عامل پوسیدگی دندان (*Streptococcus mutans*، *Actinomyces viscosus* ، *Lactobacillus rhamnosus*) توسط بیوسنتز نانو ذرات نقره بررسی کردند. نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی و آنالیز طیف‌سنجی جهت سنجش زیستی نانوذرات بررسی شد. همچنین، به‌منظور بررسی اثر ضد باکتری نانوذرات از غلظت‌های متفاوت عصاره برای آزمون رقت‌سازی سریالی استفاده شد. نتایج مطالعه عمرانی نشان می‌داد، شکل نانوذرات کروی و حدود 55 نانومتر و میزان MIC برای باکتری‌های مطالعه‌شده (*Streptococcus mutans*، *Actinomyces viscosus*، *Lactobacillus rhamnosus*) به‌ترتیب 1/56، 6/25 و 50 میکرو گرم بر میلی‌لیتر بوده است [19]. نتایج پژوهش عمرانی و همکاران با تحقیق فوق در میزان ابعاد مغایرت دارد که این عامل نیز مانند شکل نانوذرات تأثیر به‌سزایی در خاصیت ضد باکتریایی دارد. به‌طوری‌که کاهش اندازه ذرات باعث درگیری مناسب و خوب با باکتری و افزایش این خاصیت می‌شود.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.8.0]

حامد و همکاران در سال 2016 در هندوستان در شرایط آزمایشگاهی فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی علیه سویه‌های اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک از نوع بتالاکتامازها را ارزیابی کردند. آنها نانوذرات را با روش ته‌نشینی سنتز کردند که در مواد اولیه این روش نیترات روی و هیدروکسیدسدیم به کار گرفته شده بود. در پژوهش حامد و همکاران تایید نانوذرات با استفاده از روش‌های میکروسکوپ الکترونی رویشی، طیف‌سنج پراش انرژی پرتو ایکس و طیف‌سنج تبدیل فوریه مادون قرمز انجام شده بود که ابعاد به‌دست‌آمده از نانوذرات اکسید روی سنتزشده توسط آنان 10 نانومتر مشاهده شده بود [20]. نتایج حاصل از پژوهش حامد و همکاران در میزان تأثیر نانوذرات اکسیدروی در شرایطی مشابه این پژوهش است و نشان می‌دهد، این نانوذرات بر باکتری‌های مقاوم به خانواده بتالاکتامازها تأثیر چشمگیری دارند. همچنین، ابعاد نانوذره در پژوهش حامد، از ابعاد حاصل در این پژوهش کمتر است که این امر سبب شده است تأثیر نانوذرات اکسیدروی در پژوهش حامد و همکاران افزایش یابد.

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی-بیوتیک‌ها نیاز هست خاصیت ضد باکتری ترکیبات جدید بررسی شود. در این پژوهش، تأثیر آنتی‌باکتریال ترکیب نانوذرات نقره با عصاره قارچ گانودرما در شرایط آزمایشگاه در جدایه‌های مورد پژوهش مشاهده می‌شود که می‌تواند گزینه مناسبی برای جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌های متداول در سویه‌های مقاوم باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این پژوهش از کارکنان آزمایشگاه تحقیقات مؤسسه" تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی "شعبه شمال شرق کشور که از هیچ کوششی در انجام این مطالعه دریغ نکردند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

1. Dan, L.I. Minchen, D.G. Xi, G.U. (2010). A multiplex PCR method to detection *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tracr infections. J Microbiol Meth. 82:71-72.

2. Ghanbarpour, R. (2012). Detection of β-lactamase and urovirulence genes in *Escherichia coli* serogroups isolated from urinary tract infection in cats. Environ Microbiol. 10:1450-5.

3. Adib, N., Ghanbarpour, R., Solatzadeh, H., & Alizade, H. (2014). Antibiotic resistance profile and virulence genes of uropathogenic *Escherichia coli* isolates in relation to phylogeny. Trop Biomed. 31(1): 17-25.

4. Nogrady N., Gado I., Fekete P. Z., Paszti J. (2005) .Chloramphenicol resistance genes in Salmonella enterica subsp. Entericaserovar Typhimurium isolated from human and animal sources in Hungary. Vet. Med. – Czech. 50(4): 164–170.

5. World Health Organization. (2001). WHO Global Straegy for Containment of Antimicrobial Resistance. Geneva, Switzerland: WHO. 1-105.

6. Ghanbarpour R, Daneshdoost S. (2010). Identification of shiga toxin and intimin coding genes in *Escherichia coli* isolates from pigeons (Columba livia) in relation to phylotypes and antibiotic resistance patterns. Trop Anim Health Prod. 4(2):307-312.

7. N. Duran, P.D. Marcato, O.L. Alves, G.I. De Souza, E. Esposito. (2005) .Journal of nanobiotechnology. 8(5):180-191.

8. M. Rai, S. Deshmukh, A. Ingle, A. Gade. (2005) .Journal of applied microbiology. 12(1):841-850.

9. M. Rai, A. Yadav, A. Gade. (2005). Biotechnology advances. 2(7): 76-82.

10. Lindequist U, Niedermeyer TMJ and Jülich WD. (2005). The Pharmacological Potential of Mushrooms. Evidence-based compl. And Alt. Medicine. 2(2):85 - 99.

11. Mayzumi F, Okamoto H & Mizuno T. (1977) .Cultivation of Reishi (*Ganoderma lucidum*). Food Rev. Int. 13: 365 - 82.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.8.0]

12. Clinical and Laboratory Standards Institute (2016) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement. CLSI document M100–S22. Wayne, PA, USA.

13. Mosmann,T.(1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. Immunol. Methods. 6(5):55-63.

14. Amiri, M., Jajarmi, M., Ghanbarpour, R. (2017). Prevalence of resistance to quinolone and fluoroquinolone antibiotics and screening of *qnr* genes among *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection. Int J Enteric Pathog. 5(4):100-105.

15. Poorshabanan, Z., Doudi, M., & Setorki, M. (2019). Effect of Silver and Titanium Dioxide Nanoparticles on Antibiotic Resistant Gram Negative Bacilli causing Urine Tract Infection. scientific journal of ilam university of medical sciences, 26(5), 42-50.

16. Gholami, N., MOMEN, A. (2017). Effects of Silver Nanoparticles on Urinary Tract Infections Caused by Gram-negative Bacilli Resistant to Several Antibiotics. Applied Biology, 7(3), 41-48.

17. Dehghan Nayeri, F., Mirhosseini, M., Mafakheri, S., Zarrabi, M. (2018). Antibacterial and antifungal effects of silver nanoparticles synthesized by the aqueous extract of sesame (Sesamum indicum L.). Journal of Cellular and Molecular Research, 31(1), 16-26.

18. Taheri, A., Ziaadini, M., Gahramzei, M. (2020). Antibacterial activity of zinc aluminate nanoparticles against foodborne pathogenic bacteria of *E. coli* and *P. aeruginosa*. Food Hygiene, 10(2(38)), 95-108.

19. Emrani, S., Zhiani, R., & DafeJafari, M. (2018). The Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Plants of Glycyrrhiza glabra and Mentha Piperata and Its Antimicrobial Effect on Some Bacterias That Cause Tooth Decay. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 16(10), 953-968.

20. Hameed, A.S.H., Karthikeyan, C., Ahamed, A.P., Thajuddin, N., Alharbi, N.S., Alharbi, S.A. and Ravi, G. (2016).In vitro antibacterial activity of ZnO and Nd doped ZnO nanoparticles against *ESBL* producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Scientific reports. 6(3):241-251.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.8.0]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Evaluation of antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by *Ganoderma* extract and application in *Escherichia coli* isolates isolated from urinary tract infections resistant to several antibiotics

Hamidreza Farzin[1], Mohadese Amiri[2], Samira Kadoughani Sani[3] , Majid Jamshidian-Mojaver [4*]

1. Assistant Professor, Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.
2. MsC, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
3. MsC, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.
4. Assistant Professor, Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.

Received: 2020/4/12 Accepted: 2020/12/30

*Corresponding author: m.jamshidian@rvsri.ac.ir
P.O.Box: 174-91735

Abstract

Urinary tract infection, as one of the most common bacterial infections, has caused the hospitalization of significant proportion of patients. Nanoparticles are important in various fields, including medicine and industry. Among these, silver nanoparticles are of special interest due to their good conductivity, chemical stability, and many other properties. Silver nanoparticles work against various bacteria by releasing silver ions.

This study was carried out on 50 specimens of positive cultures with urinary tract infection referred to Imam Reza Hospital Laboratory in Bojnord. The resistance and susceptibility of the isolates were assessed using disc diffusion method. In this study, the antibacterial effects of silver nanoparticles were investigated using the aqueous extract of *Ganoderma lucidum* by microdilution (serial dilution). Scanning electron microscope was used to measure the dimensions and shape of silver nanoparticles. Infrared spectroscopy was also performed to investigate possible organic compounds that could be involved in the synthesis of nanoparticles.

The highest antibiotic resistance was related to the antibiotic ampicillin (84%) and the nanoparticles had dimensions of 20 to 45 nm. The mean MBC and MIC concentrations of this study were 509.83 and 230, respectively.

The produced nanoparticles have antimicrobial activity and can be a good alternative in the treatment of antibiotic resistant infectious diseases.

Keywords: Urinary Tract Infection, *Escherichia coli*, Antibiotic Resistance, Silver Nanoparticles, *Ganoderma lucidum*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.12.1.8.0]