

بررسی خاصیت آنتی باکتریال ترکیب نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره قارچ گانودرما و کاربرد آن در جدایه‌های اشریشیا کلی جداشده از عفونت‌های ادراری مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک

حمیدرضا فرزین¹، محدثه امیری²، سمیرا کدوغنی ثانی³، 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 پذیرش: 99/10/10

تاریخ دریافت: 99/1/24

* نویسنده مسئول: m.jamshidian@rvsri.ac.ir

صندوق پستی: 91735-174

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 به دلیل 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 (84 درصد) بود و نانوذرات ابعاد 20 تا 45 نانومتر داشتند. میانگین غلظت MBC و MIC به دست آمده در این پژوهش به ترتیب 509/83 و 230 بود. نانوذرات تولید شده 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

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 80 درصد 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 به صورت 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 [5 و 6]. نانوذرات نقره با آزادسازی یون‌های نقره بر باکتری‌های گوناگون اثر می‌گذارند. این مسئله که باکتری‌های متفاوت در برابر 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 سائز کمتر از 10 نانومتر در باکتری‌ها موجب می‌شوند سبب می‌شود خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات افزایش یابد. با کوچک‌تر شدن 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 در مقابله با اشریشیاکلی بیشتر از نانوذرات کروی و میله‌ای است [8 و 9].

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 به دلیل 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 سنتز شده 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 جدایه‌های مورد مطالعه از آزمایش‌های بیوشیمیایی (نظیر تست‌های اوره، سیمون سترات، TSI و SIM) (مرک-آلمان) استفاده شد.

برای تعیین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بررسی شده، ابتدا یک کلنی از هر جدایه در مولر هیتتون برات (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 هیتتون آگار (مرک-آلمان) کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سیپروفلوکساسین (5 میکروگرم)، کوتریماکسازول (25 میکروگرم)، جنتامایسین (10 میکروگرم)، نالیدیکسیک

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 فیروبیلاست L 929 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 گوده‌های پلیت تخلیه و به هر گوده پلیت 96 خانه به میزان 200 میکرولیتر (Dimethyl sulfoxide) DMSO اضافه و با دستگاه قرائت‌گر الیزا (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 هیتتون برات (مرک-آلمان) انتقال داده و به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. از سوسپانسیون نهایی برای

اسید (30 میکروگرم)، نیتروفورانتوئین (300 میکروگرم)، آمپی‌سیلین (10 میکروگرم) و لووفلوکساسین (5 میکروگرم)، (کرج - پادتن طب) به‌وسیله پنس استریل روی پلیت مولر هیتتون آگار قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت 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 استریل کردن 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 100 سی‌سی 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 به مدت 24 ساعت روی شیکر قرار می‌دهیم. محلول حاصل را به مدت 10 دقیقه با دور 13000 rpm سانتریفیوژ (پندورف-آلمان) و پس از چند بار شست‌وشو، از رسوب حاصل برای انجام دادن تست‌های تعیین حساسیت استفاده می‌کنیم.

تست MTT

برای بررسی تأثیر آنتی‌باکتریال ترکیب نانوذرات نقره سنتز شده 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، کمی و مطمئن است. اساس این تست شکستن نمک زردرنگ تترازولیوم توسط آنزیم

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 الیزا (Biotek, USA) قرائت شد.

برای مشخص کردن 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 مولر هیتون آگار (مرک-آلمان) به صورت خطی کشت داده و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. رشد نیافتن باکتری در هر غلظت نشان‌دهنده MBC است.

نتایج

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، از بین 50 جدایه مطالعه شده، 18 جدایه در برابر یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت می‌کردند. همچنین، بیشترین میزان مقاومت جدایه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کوتریماکسازول و لووفلوکسازین و بعد از آن نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکسازین، جنتامایسین و نیتروفوران‌توئین بود.

انجام‌دادن آزمون حساسیت دارویی و آزمون MIC استفاده می‌شود.

تست میکرودیالوژن برات 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 برات (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 به همین ترتیب 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 به عنوان کنترل مثبت حاوی 100 میکرولیتر محیط کشت و عصاره نقره و قارچ و از چاهک دوازدهم به عنوان کنترل منفی حاوی 100 میکرولیتر محیط کشت استفاده

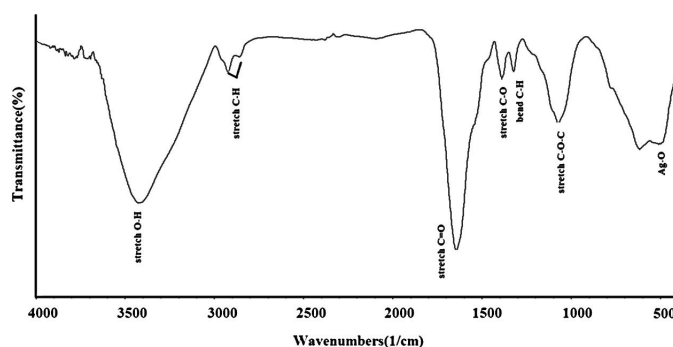
جدول شماره 1 فراوانی مقاومت و حساسیت جدایه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه

آنتی‌بیوتیک	حساس	نیمه حساس	مقاوم
نالیدیکسیک اسید	30 درصد	18 درصد	52 درصد
سیپروفلوکسازین	40 درصد	16 درصد	44 درصد
لووفلوکسازین	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
آمپی‌سیلین	10 درصد	6 درصد	84 درصد
تتراسایکلین	5 درصد	15 درصد	80 درصد

نتایج آنالیز FT-IR

1644 و 1538 cm^{-1} به ارتعاشات کششی $\text{C}=\text{O}$ و نیز ارتعاشات خمشی N-H مربوط می‌شود. پیک‌های دوتایی مشاهده‌شده در ناحیه $900-400$ به ساختار کربوهیدراتی نمونه برمی‌گردد. پیک در ناحیه 1389 و 1322 و 1072 به ترتیب به ارتعاش کششی C-O و ارتعاش خمشی C-H و ارتعاش کششی C-O-C اشاره می‌کند. مشاهدات تأیید می‌کند که گروه‌های عاملی $\text{C}=\text{O}$ و O-H مسئول تولید نانوذرات نقره هستند. پیک تیز در ناحیه $450-550$ cm^{-1} به ارتعاش کششی Ag-O مربوط می‌شود.

آنالیز FT-IR به منظور 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 2924 cm^{-1} ناشی از ارتعاشات کششی C-H است. پیک‌های موجود در ناحیه $1700-1500$ cm^{-1} از نمونه قارچ گانودرما به ارتعاشات پیوند آمیدی اشاره می‌کند که ناشی از ساختار پروتئینی است. باند مشاهده‌شده در ناحیه

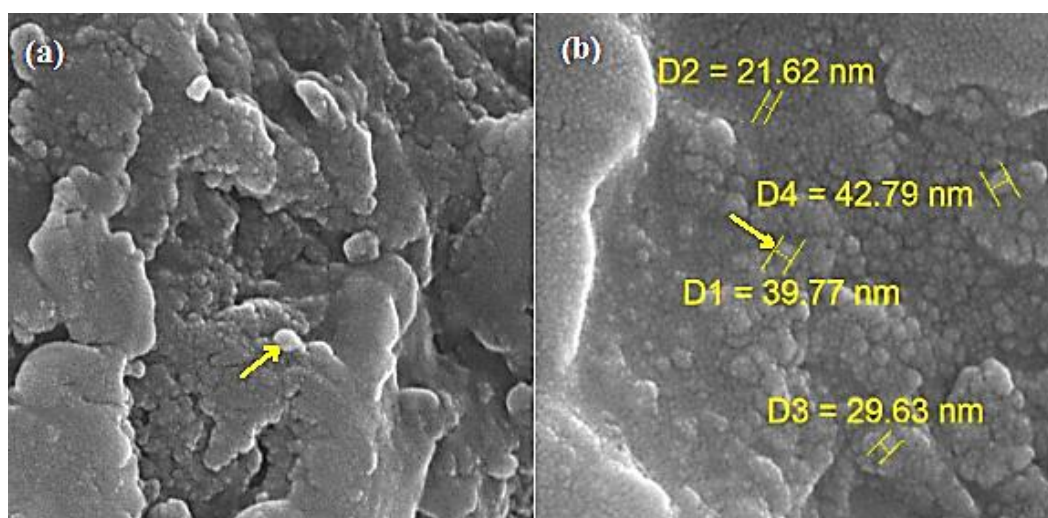


تصویر 1: طیف FT-IR نمونه ترکیب‌شده عصاره قارچ گانودرما با ذرات نقره

به صورت کروی است. نتایج حاصل از تصاویر SEM در شکل 2b نشان می‌دهد اندازه ذرات نقره $20-45$ نانومتر است.

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



تصویر 2: تصاویر SEM

نتایج MIC و MBC

آگار منتقل و کشت داده شد. بعد از زمان انکوباسیون اولین رقتی که در پلیت آگار رشدی نداشته باشد، به عنوان MBC گزارش می‌شود.

برای تعیین MBC، بعد از تعیین MIC (آخرین چاهک شفاف)، رقت‌های قبل و بعد از آن به محیط مولر هینتون

جدول شماره 2 میانگین نتایج MIC و MBC

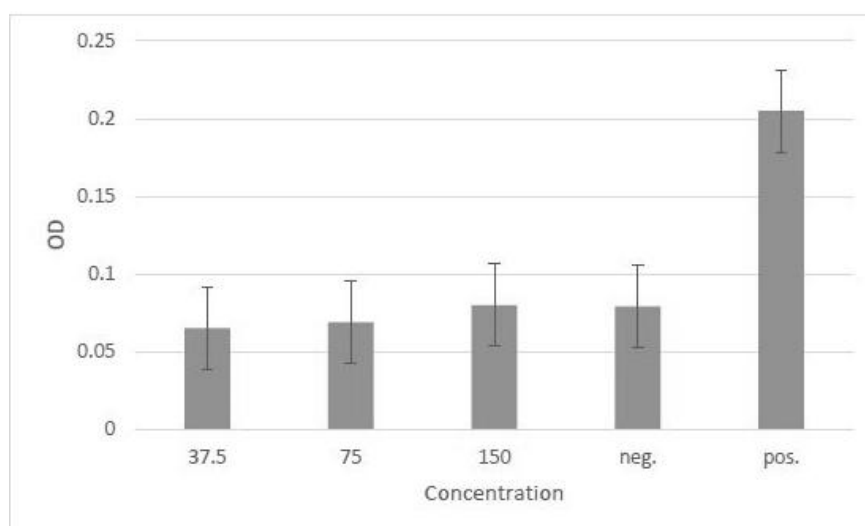
MIC	MBC	نام باکتری مورد مطالعه
230	509/83	اشریشیاکلی

نتایج MTT

آماری نشان داد سطح معناداری برای عصاره قارچ + نقره بوده است. آزمون توکی نشان داد بین گروه‌های آزمایشی هم تفاوت معناداری وجود دارد.

نتیجه تست MTT

برای بررسی اثر کشندگی نانوکمپلکس بر رده سلولی فیروبلاست 929 L آزمایش سه بار تکرار شد. نتایج تحلیل



نمودار شماره 1

بحث

حساسیت جدایه‌ها از روش کربی بائر استفاده شد. در این پژوهش 18 جدایه به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند که بیشترین میزان مقاومت جدایه به آنتی‌بیوتیک را آمپی‌سیلین به میزان 84 درصد داشت و میزان فراوانی آنتی‌بیوتیک‌های کوتریماکسازول (60 درصد)، نالیدیکسیک اسید (52 درصد)، سیپروفلوکساسین (44 درصد)، نیتروفورانئوئین (6 درصد)، جتتامایسین (22 درصد) و لووفلوکساسین (60 درصد) بود. نتایج حاصل از تصاویر

امروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی به چالش مهم و مشکل اساسی در درمان و کنترل بیماری‌های عفونی نظیر عفونت ادراری تبدیل شده است و تهدیدی جدی برای سلامتی عمومی انسان‌ها تلقی می‌شود [14].

در این مطالعه 50 نمونه از کشت‌های مثبت دارای عفونت ادراری از آزمایشگاه بیمارستان امام رضا شهرستان بجنورد بررسی شد. برای تعیین میزان مقاومت و

SEM نشان داد، اندازه ذرات نمونه سنتزی 20-45 نانومتری هستند و شکلی کروی دارند. همچنین، میانگین غلظت MBC و MIC محلول ترکیب نقره و عصاره قارچ گانودرما در این پژوهش به ترتیب 509/83 و 230 بود. در این پژوهش اثر خاصیت آنتی‌باکتریال ترکیب نانوذرات نقره سنتز شده توسط عصاره قارچ گانودرما (رده سلولی فیروبلاست 929 L) بررسی شده است. در تحقیقات مشابه به تأثیر نانوذره یا ترکیب نانوذره با گیاهان دارویی پرداخته نشده است. همچنین، به دلیل اینکه گانودرما مؤثرترین قارچ دارویی است و خواص ضد میکروبی دارد در این پژوهش از آن استفاده شده است. پورشبانان، نجف‌آبادی و همکاران در سال 2017 در فلاورجان تأثیر نانوذرات نقره و دی‌اکسیدتیتانیوم را بر باسیل‌های گرم منفی مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک و مسبب عفونت‌های ادراری بررسی کردند. نجف‌آبادی و همکاران روی 140 نمونه از جدایه‌های باکتریایی چون اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، انتروباکتر آئروژنز، پروتئوس، سیتروباکتر فروندی، سودوموناس آئروژینوزا و آسیتوباکتریومانی (از هر کدام 20 نمونه) مطالعه کردند. این جدایه‌های باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌هایی مقاوم بودند که در درمان عفونت‌های ادراری استفاده می‌شدند. همچنین، سویه‌های استاندارد آنها انجام گرفت. در پژوهش نجف‌آبادی از تست‌های آزمایشگاهی نظیر انتشار چاهک و دیسک در آگار (آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، افلوکساسین، استرپتومایسین، تتراسایکلین، سیپروفلوکساسین، نیتروفورانتوئین و کلرامفنیکل) و ماکرودایلوشن استفاده شد. نتایج پژوهش نجف‌آبادی نشان می‌دهد، بیشترین مقاومت باکتری اشریشیاکلی به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و کمترین آن به آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوئین بوده است. همچنین، میانگین میزان MBC و MIC از تأثیر نانوذرات کروی نقره با سایز 10 نانومتر برای باکتری اشریشیاکلی به ترتیب 340 mg/ml و 340 mg/ml

275 بود [15]. نتایج پژوهش نجف‌آبادی و همکاران با نتیجه این پژوهش درباره میزان مقاومت و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مطالعه شده مشابهت و درباره میزان تأثیر نانوذرات مغایرت دارد. اندازه نانوذرات در این دو پژوهش با یکدیگر مغایرت دارند، اما هر دو نانوذره در دو پژوهش کروی شکل هستند و در هر دو پژوهش در شرایط آزمایشگاهی نانوذرات نقره تأثیر به‌سزایی در جدایه‌ها داشته‌اند. غلامی و همکاران در سال 2017 در همدان تأثیر نانوذرات نقره را روی باسیل‌های گرم منفی مسبب عفونت‌های ادراری مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک بررسی کردند. در این پژوهش از کشت‌های مثبت نمونه بالینی بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه‌کننده به بیمارستان همدان استفاده شده بود. در پژوهش غلامی و همکاران مقاومت ایزوله‌های مطالعه شده به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل، نیتروفورانتوئین، آمیکاسین، افلوکساسین، تتراسایکلین و اریترومايسين مطالعه و بررسی شد. برای آگاهی از میزان تأثیر نانوذرات از روش‌های ایجاد چاهک در آگار و غلظت مهارکننده رشد و غلظت کشندگی استفاده شده بود [16]. پژوهش غلامی و همکاران نشان می‌دهد، تمامی جدایه‌های اشریشیاکلی در پژوهش آنها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل مقاوم هستند که این نتیجه مشابه نتایج این تحقیق است (جدایه‌های این مطالعه نیز بیشترین میزان مقاومت را در برابر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (84 درصد) داشتند). همچنین، در بررسی تأثیر نانوذرات نقره بر باکتری اشریشیاکلی به روش چاهک در آگار میانگین میزان MIC و MBC به ترتیب 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 قزوین به بررسی اثرات ضد باکتری و ضد قارچی نانوذرات نقره

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*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* 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 ذکر شده 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 سنتز شده 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 غلظت کشندگی 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. به صورتی که می‌تواند به عنوان 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 به میزان 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 Lactobacillus*، *Actinomyces viscosus*، *mutans rhamnosus*) توسط بیوسنتز نانو ذرات نقره بررسی کردند. نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی و آنالیز طیف‌سنجی جهت سنجش زیستی نانوذرات بررسی شد. همچنین، به منظور 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*) به ترتیب 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. به طوری که کاهش اندازه ذرات باعث درگیری مناسب و خوب با باکتری و افزایش این خاصیت می‌شود.

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 tract 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 Strategy 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.

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 هیدروکسید سدیم 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 به‌دست آمده از نانوذرات اکسید روی سنتز شده 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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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

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.
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.

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 Farzin¹, Mohadese Amiri², Samira Kadoughani Sani³, 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*