Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2023; Vol. 47; No. 2

Effects of Malachite/ ZnO / Chitosan Nanocomposites on Biofilm Formation and the Expression of *rhlI* and *lasI* Genes in *Pseudomonas Aeruginosa* and of *fnbA* and *fnbB* Genes in *Staphylococcus Aureus*

Zahra Rajabloo[1], Mohammad Reza Farahpour[2*], Parvaneh Saffarian[1], Saeed Jafarirad[3, 4]

1. Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
3. Department of Organic and Biochemistry, Faculty of chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
4. Research institute of Bioscience and Biotechnology, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Received: February 04, 2023; Accepted: April 04, 2023

Abstract

Background and Aim: Bacteria create biofilms as a mechanism to increase survival. The use of antibiotics to fight against them causes antibiotic resistance. Therefore, there is a need to produce strong anti- biofilm substances to fight biofilms. This experimental study was conducted with the aim of investigating the effects of malachite / zinc oxide / chitosan nanocomposites on the expression of pathogenic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

Methods: Experimental, malachite, malachite / zinc oxide and malachite / zinc oxide / chitosan nanocomposites were prepared. The amount of biofilm formation of bacteria was checked with the help of crystal violet dye and TTC. The Minimum Biofilm Inhibitory Concentration and the Minimum Biofilm Eradication Concentration were investigated to measure the anti- biofilm activity of nanocomposites. The extent of cell survival in the vicinity of nanocomposites was evaluated by calcein-AM staining. The expression of *rhlI* and *lasI* genes in *Pseudomonas aeruginosa* and *fnbA* and *fnbB* genes in *Staphylococcus aureus* were investigated using Real- Time PCR technique. Data were analyzed using ANOVA test.

Results: Based on the results of this study, the highest amount of anti- biofilm activity was observed in malachite / zinc oxide / chitosan, malachite / zinc oxide, and malachite nanocomposites, respectively. The results showed that the final malachite / zinc oxide / chitosan nanocomposite with a concentration of 7.81 µg/ml could inhibit the biofilm formation of two bacteria by about 50 ± 10% (MBIC50) and with a concentration of 15.62 µg/ml, the biofilm formed by both bacteria were remove about 50 ± 10% (MBEC50). Malachite / zinc oxide and malachite / zinc oxide / chitosan nanocomposites reduced the expression of *rhlI* and *lasI* genes of *Pseudomonas aeruginosa* and *fnbA* and *fnbB* genes of *Staphylococcus aureus* bacteria ($P < 0.001$). The use of malachite / zinc oxide / chitosan final nanocomposite reduced *rhlI* gene expression by 166.66 times, *lasI* gene expression by 30.30 times, *fnbA* expression by 20.70 times, and *fnbB* expression by 100 times compared to the control group ($P < 0.001$).

Conclusion: Malachite / zinc oxide and malachite / zinc oxide / chitosan nanocomposites probably have anti- biofilm activity on Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus bacteria.

Keywords: Biofilm; Nanocomposite; Zinc Oxide; Chitosan; Malachite; Pseudomonas aeruginosa; Staphylococcus aureu

Please cite this article as: Rajabloo Z, Farahpour MR, Saffarian P, Jafarirad S. Effects of Malachite/ ZnO / Chitosan Nanocomposites on Biofilm Formation and the Expression of *rhlI* and *lasI* Genes in *Pseudomonas Aeruginosa* and of *fnbA* and *fnbB* Genes in *Staphylococcus Aureus.* Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(2):49-61.

[*]**Corresponding Author:** Mohammad Reza Farahpour; **Email:** mrf78s@gmail.com
Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۷، شماره ۲، سال ۱۴۰۲ شمسی، صفحات ۴۹ تا ۶۱

اثر نانوکامپوزیت‌های مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان بر تشکیل بیوفیلم و بیان ژن‌های *rhlI* و *lasI* در *سودوموناس آئروژینوزا* و ژن‌های *fnbA* و *fnbB* در *استافیلوکوکوس اورئوس*

زهرا رجبلو[۱]، محمد رضا فرهپور[۲*]، پروانه صفاریان[۱]، سعید جعفری راد[۳،۴]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.
۳- گروه شیمی آلی و بیوشیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۴- پژوهشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌ها، بیوفیلم‌ها را به عنوان مکانیسمی برای افزایش بقا ایجاد می‌کنند و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای مبارزه با آنها سبب ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شود. بنابراین نیاز به تولید مواد ضد بیوفیلمی قوی برای مبارزه با بیوفیلم‌ها است. این مطالعه تجربی با هدف بررسی اثر نانوکامپوزیت‌های مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان بر بیان ژن‌های بیماریزایی در *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی نانوکامپوزیت‌های مالاکیت، مالاکیت/ اکسید روی و مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان تهیه شدند. میزان تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها با کمک رنگ کریستاله ویوله و TTC بررسی شد. حداقل غلظت مهارکننده تشکیل بیوفیلم و حداقل غلظت حذف‌کننده بیوفیلم تشکیل‌شده، برای سنجش فعالیت ضد بیوفیلمی نانوکامپوزیت‌ها بررسی شد. میزان بقای سلولی در مجاورت نانوکامپوزیت‌ها با رنگ‌آمیزی calcein-AM بررسی شد. بیان ژن‌های *rhlI* و *lasI* در *سودوموناس آئروژینوزا* و ژن‌های *fnbA* و *fnbB* در *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از تکنیک Real- Time PCR بررسی شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون آنووا تحلیل شدند.

یافته‌ها: بیشترین میزان فعالیت ضد بیوفیلمی به ترتیب در نانوکامپوزیت‌های مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان، مالاکیت/ اکسید روی و مالاکیت مشاهده شد. نتایج نشان داد که نانوکامپوزیت نهایی مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان با غلظت ۷/۸۱ µg/ml توانست تشکیل بیوفیلم دو باکتری را حدود ۱۰ ± ۵۰٪ مهار (MBIC50) و با غلظت ۱۵/۶۲ µg/ml بیوفیلم تشکیل‌شده هر دو باکتری را حدود ۱۰ ± ۵۰٪ حذف کند (MBEC50). نانوکامپوزیت‌های مالاکیت / اکسید روی و مالاکیت /اکسید روی / کیتوزان بیان ژن‌های *rhlI* و *lasI* *سودوموناس آئروژینوزا* و ژن‌های *fnbA* و *fnbB* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را کاهش دادند ($P < ۰/۰۰۱$). استفاده ازنانوکامپوزیت نهایی مالاکیت / اکسید روی / کیتوزان ۱۶۶/۶۶ برابر بیان ژن *rhlI*، ۳۰/۳۰ برابر بیان ژن‌های *lasI* ، ۲۰/۷۰ برابر بیان *fnbA* و ۱۰۰ برابر بیان *fnbB* را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دادند ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: نانوکامپوزیت‌های مالاکیت /اکسید روی و مالاکیت /اکسید روی / کیتوزان احتمالاً دارای فعالیت ضد بیوفیلمی روی باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* هستند.

واژگان کلیدی: بیوفیلم؛ نانوکامپوزیت؛ اکسید روی؛ کیتوزان؛ مالاکیت؛ *سودوموناس آئروژینوزا*؛ *استافیلوکوکوس اورئوس*

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Rajabloo Z, Farahpour MR, Saffarian P, Jafarirad S. Effects of Malachite/ ZnO / Chitosan Nanocomposites on Biofilm Formation and the Expression of *rhlI* and *lasI* Genes in *Pseudomonas Aeruginosa* and of *fnbA* and *fnbB* Genes in *Staphylococcus Aureus*. Pejouhesh dar Pezeshki. 2023;47(2):49-61.

*نویسنده مسئول مکاتبات: محمد رضا فرهپور؛ آدرس پست الکترونیکی: mrf78s@gmail.com
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]
CC BY NC

مقدمه

بیماری‌های عفونی باکتریایی مشکلات بسیاری را برای سلامت انسان تولید می‌کنند (۱). به تازگی پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به صورت قابل توجهی افزایش یافته‌اندکه با درمان‌های سنتی و برخی مواد ضد میکروبی قابل کنترل نیستند (۲). تشکیل بیوفیلم یک سازوکار برای بقا در باکتری‌ها است که با ایجاد عفونت‌های مزمن و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها رابطه مستقیم دارد (۳). بیوفیلم‌های باکتریایی به عنوان گروهی از باکتری‌های متصل به سطح سلول‌های زنده و یا سطح یک جسم تعریف شده‌اند (۴). باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی همانند استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا، توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند (۵). مطالعه‌ها رابطه معناداری را بین ظرفیت تشکیل بیوفیلم و بیان فاکتورهای بیماریزا در باکتری‌ها گزارش کرده‌اند (۶).

چندین فاکتور حدت همانند ژن‌های *rhlI* و *lasI* در سودوموناس آئروژینوزا و ژن‌های *fnbA* و *fnbB* در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در تشکیل بیوفیلم نقش دارند. سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا از دو سیستم غالب کوئروم سنسینگ (*Quorum sensing*) استفاده می‌کند که شامل ژن‌های *las* (*LasR- LasI*) و *rhl* (*rhlr-rhlI*) است. سیستم *lasI* سنتز و تولید هوموسرین لاکتون را کاتالیز می‌کند، درحالی‌که سیستم *rhlI* سنتز ان- بوتریل- هوموسرین لاکتون را کاتالیز می‌کند و در رونویسی نقش دارد (۷). ژن‌های *rhlI* و *lasI* مسئول فعال کردن شمار زیادی از ژن‌ها در سیستم کوئروم سنسینگ هستند (۸). ژن‌های *fnbA* و *fnbB* در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که به عنوان پروتئین‌های متصل شونده به فیبرونکتین (*Fibronectin- binding protein*) شناخته شده‌اند، در هجوم به بافت و ایجاد بیماری‌های مختلفی همانند کراتیتیس، استئومیلیت وغیره نقش قابل توجهی دارند (۹). ژن‌های *fnbA* و *fnbB* واسطه‌های سیگنال‌دهی سلولی و بازآرایی اسکلت سلولی اکتین هستند (۱۰).

چون باکتری‌ها بیوفیلم تشکیل می‌دهند و ژن‌های حدت به تشکیل بیوفیلم و افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمک می‌کنند، ترکیب‌هایی با خاصیت آنتی‌باکتریایی قوی برای مبارزه علیه باکتری‌ها مورد نیاز است و ساختارهای نانوکامپوزیتی در این زمینه می‌توانند امیدوار کننده باشند (۱۱). مالاکیت، شکلی از مشتقات اکسید مس است و اثر خود را از طریق تغییر دادن یکپارچگی غشای سلولی نشان می‌دهد (۱۲). نانوذره اکسید روی ماده مورد استفاده دیگری برای ساخت نانوکامپوزیت است و اثرخود را از طریق فعالیت الکترواستاتیکی و تداخل با دیواره، پروتئین‌ها و ژن‌های باکتریایی نشان می‌دهد (۱۳). کیتوزان نیز ساختار دیگر مورد استفاده برای تولید نانوکامپوزیت است و فعالیت ضد باکتریایی را از طریق نفوذ به غشای سلولی نشان می‌دهد (۱۴). در مطالعه‌های قبلی فعالیت آنتی‌باکتریایی و التیام بخشی زخم نانوکامپوزیت مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان گزارش شده است (۱۵). با این‌حال سازوکار ضد باکتریایی و فعالیت ضد بیو فیلمی این نانوکامپوزیت هنوز ناشناخته است. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی اثر نانوکامپوزیت‌های مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان بر بیان ژن‌های *rhlI* و *lasI* سودوموناس آئروژینوزا و ژن‌های *fnbA* و *fnbB* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد. این مطالعه در سال‌های ۱۴۰۱-۱۴۰۰ در شهر تهران انجام شد.

روش کار

این مطالعه از نوع مطالعه‌های تجربی- آزمایشگاهی بود و روی دو سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853) تهیه شده از کلکسیون باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انجام شد. نانوکامپوزیت‌ها با استفاده از روش سنتز سبز و مطابق با مطالعه‌های قبلی تهیه شدند (۱۵). روش تلفیقی (خیساندن- هضم و اولتراسونیک/ ریزموج) برای تهیه عصاره گیاه پونه استفاده شد. برای سنتز نانو ذرات مالاکیت/ اکسید روی، ۰/۲ گرم کلرید روی شرکت مرک ($ZnCl_2$) (CAS Number: 7646-85-7) با ۰/۶ گرم پودر مالاکیت (شرکت ایرانشید مشهد) مخلوط شد.محصول پودر به دست آمده در ۷۵ میلی‌لیتر عصاره مخلوط شد. مخلوط به شدت در دمای

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت روی هیتر استایرر هم زده شد و سپس شسته، جداسازی و خشک شد. برای عامل‌دار کردن نانوکامپوزیت مالاکیت/ اکسید روی با کیتوزان از روش اصلاح فیزیکی استفاده شد، به این ترتیب که ابتدا یک گرم از پودر نانوکامپوزیت مالاکیت/ اکسید روی تهیه شده به تدریج به ۵۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان پروتونه شده شرکت سیگما (اسید استیک ۱درصد وزنی) (CAS Number: 9012-76-4) در دمای اتاق اضافه شد، به مدت ۲۴ ساعت هم زده شد و نانوکامپوزیت مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان ساخته شد و سپس رسوب به دست آمده نانوکامپوزیت مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان پس از سانتریفیوژ، با آب مقطر شسته شد (۱۵).

بررسی بقای سلولی با رنگ‌آمیزی Calcein-AM:

برای بررسی سمیت نانوکامپوزیت‌ها، تعداد 10^{5}-10^{6} سلول فیبروبلاست L929 (تهیه شده از انستیتو پاستور) در هر یک از چاهک‌های یک میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت سلول در محیط DMEM غنی شده با ۱۰ درصد FBS کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن گرماگذاری شد تا تک لایه سلولی تشکیل شود (۷). به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت مورد نظر (۲ درصد) از تیمار نانومواد (مالاکیت،مالاکیت/ اکسید روی و مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان) اضافه شد. چاهک‌های تیمار نشده (کنترل مثبت) تیمار شده با تریتون X100 ۱٪ (کنترل منفی) نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. اثر تیمار بعد از ۲۴ ساعت مجاور سازی با سلول‌ها بررسی شد. پس از ۲۴ ساعت مجاورت نانومواد مذکور با سلول‌های مایع رویی کشت خارج شد و پنج میکرولیتر از محلول چهار میلی‌مولار کلسین-AM (شرکت سیگما ID: 56496/CAS Number: 148504-34-1) در ۱۰ میلی‌لیتر محلول سالین استریل و بافر فسفات از قبل گرم شده رقیق و سپس به خوبی مخلوط و در صفحات ۹۶ چاهکی به سلول‌ها توزیع و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شد. پس از رنگ‌آمیزی، سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ فلورسنت تصویربرداری شدند.

بررسی تشکیل بیوفیلم در پلیت میکروتیتر (رنگ‌آمیزی به دو روش کریستال ویوله ۰/۲ درصد و TTC ۲ درصد):

سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853) تهیه شدند. برای تشکیل بیوفیلم از میکروتیتر پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای جاذب (Adherent) استفاده شد. برای بررسی تشکیل بیوفیلم یک لوپ از باکتری در پنج میلی‌لیتر محیط TSBG حاوی ۰/۲ درصد گلوکز یک شب گرماگذاری شد .سپس کدورت سوسپانسیون باکتری مطابق ۰/۵ مک فارلند (1×10^{8} CFU/ml) تنظیم شد. ابتدا به چاهک‌های موردآزمایش ۱۰۰µl از TSBG استریل افزوده شد. سپس از سوسپانسیون باکتری ۱۰۰µl در چاهک‌ها ریخته شد و چاهک‌های کنترل منفی با ۲۰۰µl محیط کشت TSBG استریل تشکیل شد. سپس پلیت میکروتیتر ۲۴ ساعت در ۳۷°C گرماگذاری و پس از آن با دو روش رنگ‌آمیزی شد. رنگ‌آمیزی TTC (شرکت مرکCAS Number: 108380) و کریستال ویوله (شرکت مرک CAS Number:548-62-9) طبق مطالعه Haney E.F انجام شد و در نهایت نتایج با استفاده از دستگاه خواننده الایزا به ترتیب در طول موج ۴۹۰ و ۵۵۰ نانومتر بررسی و با چاهک‌های کنترل مقایسه شد (۱۶).

بررسی حداقل غلظت مهارکننده تشکیل (۱۰ ± ۵۰ درصد) بیوفیلم (MBIC50) و غلظت حذف کننده (۱۰ ± ۵۰ درصد) بیوفیلم تشکیل شده (MBEC50) سویه‌های استاندارد با استفاده از نانوکامپوزیت‌ها:

رقت اولیه استوک مالاکیت برابر ۱۲۰۰۰ µg/ml، رقت اولیه نانو کامپوزیت مالاکیت/ اکسید روی برابر ۲۰۰۰ µg/ml و رقت اولیه نانو کامپوزیت مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان ۲۰۰۰ µg/ml تهیه شد. برای مقایسه اثر نانومواد با آنتی‌بیوتیک‌ها از دو آنتی‌بیوتیک باسیتراسین (برای *استافیلوکوکوس اورئوس*) و پلی میکسین B (برای *سودوموناس آئروژینوزا*) استفاده شد.

برای سنجش MBIC50 و MBEC50 کشت شبانه باکتری‌ها در محیط TSBG حاوی ۰/۲ درصد گلوکز انجام شد. سپس به کدورت مطابق ۰/۵ مک فارلند رسانده شد. روش کار MBIC (Minimum biofilm inhibitory concentration) و MBEC

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

(Minimum biofilm eradication concentration) مطابق مطالعه Cruz C.D و همکاران (۱۷) انجام و در نهایت با استفاده از TTC رنگ‌آمیزی شد و با استفاده از دستگاه خواننده الایزا در ۴۹۰ نانومتر بررسی شد. درصد مهار بیوفیلم در هر یک از چاهک‌های مورد آزمون از فرمول زیر محاسبه شد (۱۸) و غلظتی از نانوکامپوزیت که ۱۰ ± ۵۰ درصد از بیوفیلم را مهار کرده بود گزارش شد:

$$\text{درصد تشکیل بیوفیلم} = \frac{\text{جذب نوری چاهک مورد آزمون} - \text{جذب نوری چاهک شاهد منفی}}{\text{جذب نوری چاهک شاهد مثبت} - \text{جذب نوری چاهک شاهد منفی}} \times 100$$

درصد تشکیل بیوفیلم − ۱۰۰ = درصد مهار بیوفیلم

و همین‌طور رقتی که ۱۰ ± ۵۰ ٪ از بیوفیلم را حذف کرده بود (۲۱) گزارش شد:

$$\text{درصد بقای بیوفیلم} = \frac{\text{جذب نوری چاهک مورد آزمون} - \text{جذب نوری چاهک شاهد منفی}}{\text{جذب نوری چاهک شاهد مثبت} - \text{جذب نوری چاهک شاهد منفی}} \times 100$$

درصد بقای بیوفیلم − ۱۰۰ = درصد حذف بیوفیلم

بررسی بیان ژن‌های *rhlI* و *lasI* *سودوموناس آئروژینوزا* و ژن‌های *fnbA* و *fnbB* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*:

پرایمرهای مورد مطالعه به شرح جدول ۱ بودند. پرایمرها توسط شرکت ژن تکنیک (با نرم‌افزار *AlleleID* و بررسی توالی با کمک *BLAST* کردن در پایگاه *ncbi*) طراحی و توسط شرکت سیناکلون ساخته شد.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در تست *PCR* در این مطالعه

نام باکتری	نام ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر	دمای TM	طول ژن
استافیلوکوکوس اورئوس	*fnbA*	F	GACCACCACCTGGGTTTGTA	۵۹	۱۴۷ bp
		R	TGGATAGCGAAGCAGGTCAC	۵۸/۲	۱۴۷ bp
	fnbB	F	GACCACCACCTGGGTTTGTA	۵۹	۱۴۳ bp
		R	AGGTGCAGAAGGTCATGCAG	۵۸/۵	۱۴۳ bp
سودوموناس آئروژینوزا	*lasI*	F	CGCACATCTGGGAACTCA	۵۶	۱۷۶ bp
		R	CGGCACGGATCATCATCT	۵۶/۵	۱۷۶ bp
	rhlI	F	GTAGCGGGTTTGCGGATG	۵۷/۸	۱۰۱ bp
		R	CGGCATCAGGTCTTCATCG	۵۷	۱۰۱ bp
ژن کنترل داخلی (هر دو باکتری) E =٪۱۰۰/۶۷ R^2 = ۰/۹۹۵	*16S ribosomal RNA*	F	TTGGGAGGAAGGGCATTAAC	۵۶	۱۰۸ bp
	16S ribosomal RNA	R	CGCTTGCACCCTCTGTATTA	۵۶	۱۰۸ bp

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

برای تهیه گروه باکتری‌های تیمار نشده با نانومواد، یک لوپ از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* در پنج میلی‌لیتر محیط LB براث کشت و به مدت ۱۹ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس OD باکتری‌ها در ۶۰۰ نانومتر خوانش و برابر نیم مک فارلند تنظیم شد. برای تهیه گروه باکتری‌های تیمار شده با مالاکیت،مالاکیت/ اکسید روی و مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان ابتدا یک لوپ از *سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* در پنج میلی‌لیتر محیط LB براث کشت و به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (با غلظت SUB MIC) انکوبه شد. سپس وسط فاز رشد نمایی در ساعت ۱۵، OD باکتری‌ها زمانی‌که در ۶۰۰ نانومتر خوانش و برابر نیم مک فارلند بود از انکوباتور بیرون آورده شدند دوباره با غلظت‌های یک برابر MIC از نانومواد به مدت چهار ساعت دیگر تیمار شدند. سپس مطابق زمان داده شده برای سویه تیمار نشده، در ساعت ۱۹ بیرون آورده شده و برای استخراج RNA آماده شدند (۱۹).

RNA کل با استفاده ازکیت استخراج RNA شرکت Anacell-PC1010 طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. برای بررسی کیفیت و غلظت RNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری با دستگاه Nano Drop ساخت شرکت Termo استفاده شد.

برای خواندن OD یا غلظت نمونه ابتدا عمل Blank انجام شد. دو میکرولیتر از نمونه داخل دستگاه گذاشته شد و غلظت آن خوانده شد. OD آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر و نیز ۳۲۰ نانومتر توسط دستگاه خوانده شد و طبق فرمول A260/280 غلظت RNA محاسبه شد و نسبت OD، ۲۶۰ نانومتر به OD ۲۸۰ نانومتر نیز برای تعیین خلوص RNA به دست آمد (۱۹).

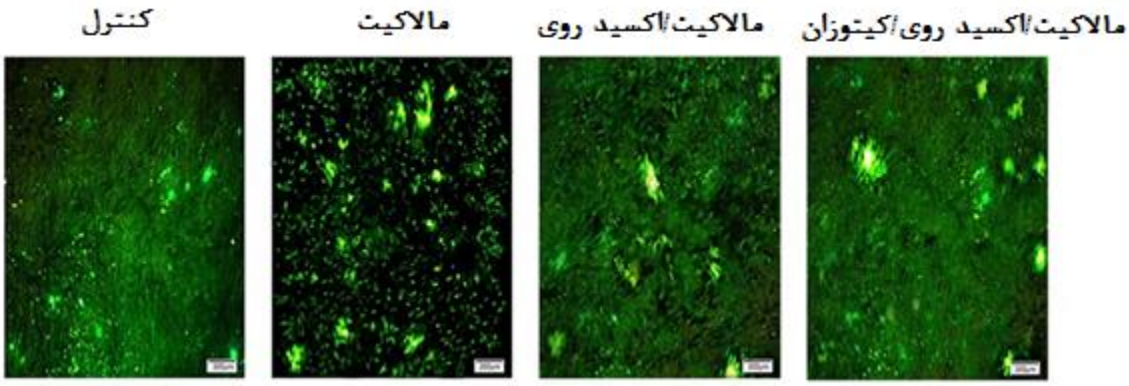
برای آزمایش Real time RT PCR (Reverce transcriptase PCR) از کیت ریل تایم یک مرحله‌ای شرکت Invitrogen (SuperScript III One- Step RT- PCR, Invitrogen System with Platinum Taq DNA 12574018 Polymerase) و طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. این مستر میکس دارای آنزیم‌های Hot Start Taq DNA Polymerase و Reverse Transcriptase به صورت همزمان بوده و در هنگام انجام تست در یک مرحله در دمای ۵۰ درجه نمونه RNA توسط آنزیم Reverse Transcriptase به cDNA تبدیل شده و سپس در سیکل‌های PCR فرایند تکثیر و سنجش میزان ژن مورد نظر انجام می‌شود. چرخه حرارتی به صورت زیر برنامه‌ریزی شد. سنتز cDNA در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در یک سیکل، ترمو استارت (شروع فرایند دمایی) در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در یک سیکل، ۴۰ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، annealing در دمای۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، extension در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه. حجم واکنش روی ۲۵ میکرولیتر تنظیم شد، سپس در چرخه حرارتی بارگذاری و مراحل اجرای رونویسی معکوس و ادامه واکنش آغاز شد. منحنی ذوب (Melt curve) برای تأیید صحت واکنش و تک محصوله بودن واکنش بررسی شد. سطح بیان ژن باکتری‌های تیمار شده با نانومواد نسبت به باکتری‌های تیمار نشده با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد (۱۹). برای بررسی داده‌های بیان ژن، ابتدا داده‌ها برای نرمالیته بررسی شدند و چون داده‌ها نرمال بودند، از آزمون آنووا در نرم‌افزار SPSS استفاده شد و ارزش معناداری کمتر از ۵ درصد به عنوان معنادار در نظر گرفته شد. برای مقایسه میانگین بین گروه‌ها از آزمون دانکن استفاده شد.

یافته‌ها

سمیت سلولی:

شکل ۱ اثر نانوکامپوزیت‌ها بر بقای سلول‌های فیبروبلاست را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، نانوکامپوزیت‌های تهیه شده از ایمنی قابل توجهی برخوردار بودند و اثر سمیت سلولی روی سلول‌ها نداشتند و ۱۰۰ درصد از سلول‌های فیبروبلاست در مجاورت نانوکامپوزیت نهایی مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان زنده ماندند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]



شکل ۱- اثر نانوکامپوزیت‌ها بر زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی Calcein-AM.

رنگ سبز نشانه سلول‌های زنده است. همان‌طور که مشهود است میزان زنده‌مانی سلول‌ها در مجاورت نانو کامپوزیت مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان مشابه سلول‌های تیمار نشده است. نتایج نشان‌دهنده ایمنی این نانوکامپوزیت است (scale bar برابر ۲۰۰ میکرومتر).

تشکیل بیوفیلم:

جدول ۲ میزان تشکیل بیوفیلم سویه‌ها در میکروتیتر پلیت با استفاده از رنگ‌آمیزی TTC و کریستال ویوله مطالعه جذب توسط دستگاه خواننده الایزا را نشان می‌دهد و همان‌گونه که نشان می‌دهد که قدرت تشکیل بیوفیلم برای هردو باکتری مقدار متوسطی بود. شکل ۲ نیز تأییدکننده این موضوع است.

جدول ۲- میزان تشکیل بیوفیلم سویه‌ها در میکروتیتر پلیت با استفاده از رنگ‌آمیزی TTC و کریستال ویوله.

نام سویه	میانگین OD	قدرت تشکیل بیوفیلم
	TTC	
استافیلوکوکوس اورئوس	۲× ۰/۱۲۱ ≤ ۰/۳۰۲ ≤ ۴ × ۰/۱۲۱	متوسط
سودوموناس آئروژینوزا	۲× ۰/۱۲۱ ≤ ۰/۳۴۰ ≤ ۴ × ۰/۱۲۱	متوسط
	کریستال ویوله	
استافیلوکوکوس اورئوس	۲×۰/۶۳۷≤ ۱/۶۶۲ ≤۴×۰/۶۳۷	متوسط
سودوموناس آئروژینوزا	۲×۰/۶۳۷ ≤ ۲/۰۰۵ ≤۴×۰/۶۳۷	متوسط

شکل ۲- نتایج بررسی میزان تشکیل بیوفیلم توسط دو رنگ‌آمیزی TTC ۲ درصد و کریستال ویوله ۰/۲ درصد.

۱) *استافیلوکوکوس اورئوس* با رنگ‌آمیزی TTC با قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط، ۲) *استافیلوکوکوس اورئوس* با رنگ‌آمیزی کریستال ویوله با قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط، ۳) *سودوموناس آئروژینوزا* با رنگ‌آمیزی TTC با قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط، ۴) *سودوموناس آئروژینوزا* با رنگ‌آمیزی کریستال ویوله با قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

نتایج برای فعالیت ضد بیوفیلمی در جدول ۳ نشان داد که که بیشترین میزان مهار بیوفیلم و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم در کامپوزیت‌ها به ترتیب مربوط به مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان، مالاکیت/ اکسیدروی و مالاکیت است و تیمار آنتی‌بیوتیک اثر مشابهی با مالاکیت/ اکسید روی را نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان اثر بهتری نسبت به آنتی‌بیوتیک در مهار وجلوگیری از تشکیل بیوفیلم داشته است. نانوکامپوزیت نهایی مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان در غلظت ۷/۸۱ µg/ml توانست بیوفیلم هر دو باکتری را به میزان ۱۰ ± ۵۰ درصد مهار کند(MBIC50) و در غلظت µg/ml ۱۵/۶۲ توانست بیوفیلم تشکیل شده هر دو باکتری را به میزان ۱۰ ± ۵۰ درصد حذف کند (MBEC50). در حالی که آنتی‌بیوتیک‌های مذکور در غلظت µg/ml ۱۶ توانستند بیوفیلم هر دو باکتری را به میزان ۱۰ ± ۵۰ درصد مهار کند (MBIC50) و در غلظت µg/ml ۳۲ توانستند بیوفیلم تشکیل شده هر دو باکتری را به میزان ۱۰ ± ۵۰ درصد حذف کند (MBEC50). بین غلظت MBIC50 و MBEC50 نانوکامپوزیت مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان و آنتی بیوتیک اختلاف معناداری وجود دارد ($P < ۰/۰۵$).

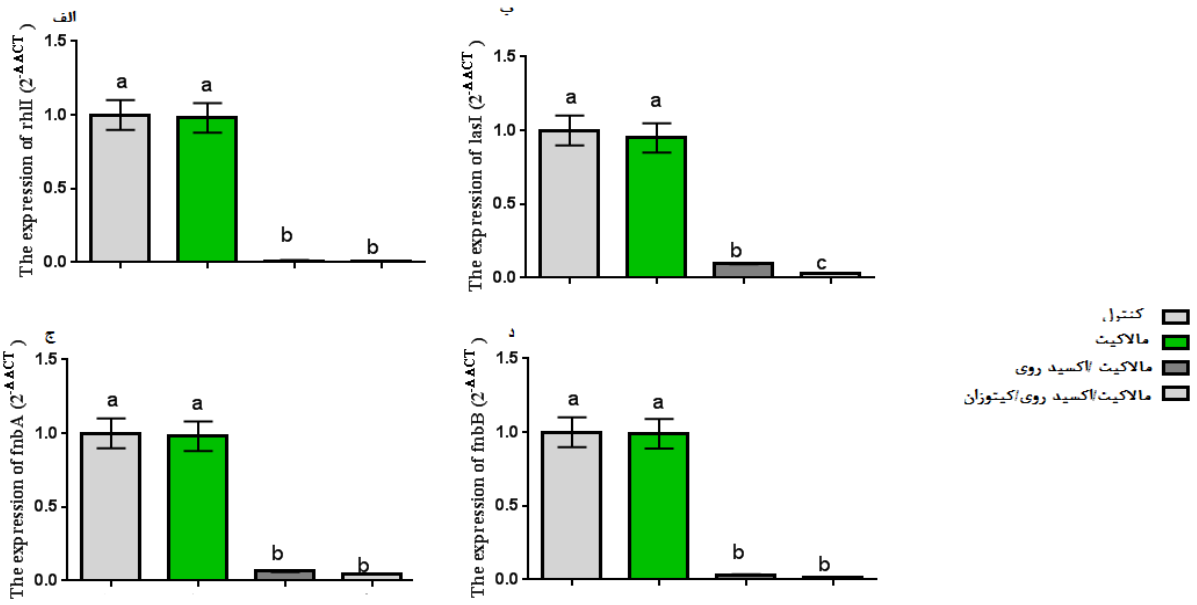
جدول ۳- فعالیت ضد بیوفیلمی نانوکامپوزیت‌ها علیه سویه‌های باکتریایی

	مالاکیت		مالاکیت/ اکسید روی		مالاکیت/ اکسید روی /کیتوزان		آنتی بیوتیک	
	MBIC50*	MBEC50*	MBIC50*	MBEC50*	MBIC50*	MBEC50*	MBIC50*	MBEC50*
سودوموناس آئروژینوزا	۳۷۵	۳۷۵	۱۵/۶۲	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۱۶	۳۲
استافیلوکوکوس اورئوس	۳۷۵	۳۷۵	۱۵/۶۲	۱۵/۶۲	۷/۸۱	۱۵/۶۲	۱۶	۳۲

***مقادیر ٪۱۰ ± ۵۰ MBIC و ٪۱۰ ± ۵۰ MBEC را نشان می‌دهد.**

بیان ژن‌ها:

نتایج اثر نانوکامپوزیت‌ها بر بیان ژن‌های موثر در بیوفیلم در شکل ۳ گزارش شده است.



شکل ۳- اثر نانوکامپوزیت‌ها بر بیان برخی از فاکتورهای مؤثر بر تشکیل بیوفیلم

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

حروف بالانویس مختلف نشان می‌دهد که بین گروه‌ها اختلاف‌های معناداری وجود دارد. نمودار مقایسه میزان بیان ژن‌ها با بیان کنترل ۱ در نظر گرفته می‌شود و میزان کاهش بیان ژن در سویه‌های تیمار شده با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بدست آمد و با کنترل (گروه تیمار نشده) مقایسه شد.

نتایج برای بیان ژن *rhlI* *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که گروه تیمار شده با مالاکیت بیانش ۰/۳ ± ۱/۰۲۰ برابر کاهش پیدا کرد. *سودوموناس آئروژینوزا* تیمار شده با مالاکیت/ اکسیدروی بیانش۰/۰ ± ۹۰ برابر کاهش یافته *سودوموناس آئروژینوزا* تیمار شده با مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان بیانش۰/۰ ± ۱۶۶/۶۶ برابر کاهش یافته است. کاهش بیان ژن *rhlI* در گروه مالاکیت/ اکسید روی و گروه مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان اختلاف معناداری با گروه مالاکیت و گروه کنترل تیمار نشده نشان داد (P< ۰/۰۵). نتایج همچنین نشان داد که بیان ژن *lasI* *سودوموناس آئروژینوزا* تیمار شده با مالاکیت بیانش۰/۲۵ ± ۱/۰۲۱ برابر کاهش پیدا کرد. *سودوموناس آئروژینوزا* تیمار شده با مالاکیت/ اکسید روی بیانش ۰/۰ ± ۱۴/۰۸ برابر کاهش یافته. *سودوموناس آئروژینوزا* تیمار شده با مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان بیانش ۰/۰ ± ۳۰/۳۰ برابر کاهش نشان داد. کاهش بیان ژن *lasI* در گروه مالاکیت/ اکسید روی و گروه مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان اختلاف معناداری با گروه مالاکیت و گروه کنترل تیمار نشده دارد (P< ۰/۰۵). نتایج برای بیان بیان ژن *fnbA* *نشان داد که استافیلوکوکوس اورئوس* تیمار شده با مالاکیت بیانش ۰/۲۲ ± ۱ برابر کاهش یافت. *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمار شده با مالاکیت/ اکسید روی بیانش۰/۰۱ ± ۱۵/۳۸برابر کاهش یافت. *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمار شده با مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان بیانش ۰/۰ ± ۲۰/۷۰ برابر کاهش یافته.کاهش بیان ژن *fnbA* در گروه مالاکیت/ اکسید روی و گروه مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان اختلاف معناداری با گروه مالاکیت و گروه کنترل تیمار نشده دارد (P< ۰/۰۵). نتایج برای بیان بیان ژن *fnbB* *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمار شده با مالاکیت بیانش ۰/۳ ± ۱ برابر کاهش یافت. *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمار شده با مالاکیت/ اکسید روی بیانش ۰/۰۱ ± ۳۱/۱۵ برابر کاهش یافته است. *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمار شده با مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان بیانش ۰/۰ ± ۱۰۰ برابر کاهش یافته است. کاهش بیان ژن *fnbB* در گروه مالاکیت/ اکسید روی و گروه مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان اختلاف معناداری با گروه مالاکیت و گروه کنترل تیمار نشده دارد (P< ۰/۰۵).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوکامپوزیت‌های تهیه شده اثر سمی روی سلول‌ها نداشتند. نتایج این مطالعه با مطالعه‌های قبلی که با استفاده از آزمون‌های دیگر نشان دادند که این نانوکامپوزیت‌ها فاقد اثر سمیت سلولی هستند، تطابق دارد (۲۰). در مجموع مطالعه‌های مختلف نشان داده‌اند که نانوکامپوزیت‌ها دارای اثر سمی بسیار پایینی هستند و این به دلیل ساختار فیزیکی آنها است (۲۱). در مطالعه‌های مروری نیز نشان داده شده است که ساختارهای نانوکامپوزیت دارای ایمنی قابل توجهی هستند که به دلیل ساختار و نحوه تهیه شدن نانوکامپوزیت‌ها است (۲۳، ۲۲). قرار گرفتن اجزایی همانند مالاکیت، اکسید روی و کیتوزان اثر منفی روی سلول‌ها نداشتند. بر اساس نتایج بدست آمده، مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان دارای فعالیت ضد بیوفیلمی بیشتری در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها بود و فعالیت آنتی‌بیوتیک تقریباً مشابه با فعالیت مالاکیت/ اکسید روی است. مالاکیت در مجموع فعالیت ضد بیوفیلمی ضعیفی را نشان داد. دیگر نانوکامپوزیت‌ها داری اثر مشابهی روی هر دو باکتری بودند که نشان می‌دهد نانوکامپوزیت‌ها دارای اثر قابل توجهی روی هردو باکتری هستند و سازوکار آنها مربوط به ساختار باکتری نیست و یا کمتر تحت تأثیر ساختار باکتری قرار می‌گیرد. همراستا با نتایج این مطالعه برای فعالیت ضد بیوفیلمی مالاکیت، مطالعه‌های قبلی نشان دادند که مالاکیت دارای فعالیت ضد باکتریایی ضعیفی است (۱۵). نتایج این مطالعه برای فعالیت ضد بیوفیلمی اکسید روی همراستا با مطالعه‌های قبلی است (۲۴). مطالعه‌های فعالیت ضد بیوفیلیمی اکسید روی را

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

قبلاً گزارش کرده‌اند که در تطابق با یافته‌های این مطالعه است (۲۶، ۲۵). فعالیت ضد بیوفیلمی نانوذرات اکسید روی مربوط به اثر اکسید روی بر اتصالات سلول به سطح است. اکسید روی همچنین مانع از تشکیل بیوفیلم می‌شود (۱۲). نتایج این مطالعه نشان داد که با افزودن کیتوزان فعالیت ضد بیوفیلمی افزایش می‌یابد (۲۷). کیتوزان، تعاملات الکترواستاتیکی بین گروه آمینی کیتوزان و بار منفی اجزای ماتریکس بیوفیلم ایجاد می‌کند و از این طریق فعالیت ضد بیوفیلمی خود را نشان می‌دهد (۲۷). سازوکار دیگر کیتوزان از طریق کاهش در بیان فاکتورهای حدت است. این نتایج نشان می‌دهد که مالاکیت، کیتوزان و اکسید روی در کنار هم اثر هم افزایندگی دارند و هنگامی که کنار هم قرار می‌گیرند بیشترین اثر خود را بر تشکیل بیوفیلم می‌گذارند. محققان اثر ضد میکروبی نانوذرات با سایزهای مختلف را با هم مقایسه کردند و نشان دادند که هر چه ابعاد نانوذرات تولید شده کوچک‌تر باشد اثر ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی قویتر می‌شود (۲۸).

نتایج حاکی از آن بود که نانوکامپوزیت‌های حاوی اکسید روی و کیتوزان اثر قابل توجهی در کاهش بر بیان ژن‌های *rhlI* و *lasI* *سودوموناس آئروژینوزا* و ژن‌های *fnbA* و *fnbB* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند. نتایج به دست آمده همسو با نتایج گزارش شده توسط دیگر مطالعه‌های برای اثر دیگر ساختارها بر بیان ژن‌های *rhl*I و *las*I *سودوموناس آئروژینوزا* است (۷). فعالیت کیتوزان و روی در کاهش بیان ژن‌های *rhl*I و *las*I *سودوموناس آئروژینوزا* مربوط به اثرشان بر تولید پیوسیانین، تشکیل بیوفیلم و مولکول‌های مؤثر در کوئروم سنسینگ است (۲۹). سیستم *las*I سنتز و تولید هوموسرین لاکتون را کاتالیز می‌کند و سیستم *rhl*I سنتز ان- بوتریل- هوموسرین لاکتون را کاتالیز می‌کند و در رونویسی نقش دارد (۷) و ژن‌های *fnbA* و *fnbB* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* که به عنوان پروتئین‌های متصل شونده به فیبرونکتین شناخته شده‌اند که در هجوم به بافت و تشکیل بیوفیلم و همچنین در شرایط مختلفی همانند کراتیتیس، استئومیلیت و... کارایی قابل توجهی دارند (۹). محققان تأثیر نانوذرات اکسید روی و کورکومین و نقره را بر بیان ژن‌های *fnbA* و *fnbB* بررسی کردند و میزان کاهش بیان در نانوذره اکسید روی به ترتیب ۲/۱۷ و ۱۶/۶۶ برابر گزارش شدند که نشان‌دهنده اثر قدرتمند نانوذره اکسید روی بر این ژن‌ها است.در این پژوهش تاثیر نانوکامپوزیت نهایی مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان برکاهش بیان ژن‌های *fnbA* و *fnbB* برابر با ۲۰/۷۰ و ۱۰۰ سنجش شد که احتمالاً به دلیل حضور کیتوزان در این نانوکامپوزیت و همچنین اثر هم‌افزایی نانوذرات در کامپوزیت‌ها نسبت به نانوذرات تنها، نتایج بهتری نسبت به تحقیق Gheidar H مشاهده شد (۳۰). Fattah و همکاران میزان کاهش بیان ژن‌ها را در سویه‌های بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک به ترتیب ۹۰ و ۱۰۰ برابر و در سویه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک ها تا ۱۰۰۰ و ۴۰۰۰ برابر گزارش کردند. در این پژوهش میزان کاهش بیان ژنهای *lasI* و *rhlI* در مجاورت نانوکامپوزیت نهایی مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان به ترتیب ۳۰/۳۰ و ۱۶۶/۶۶ به دست آمد و نسبت به نانوکامپوزیت مالاکیت/ اکسید روی کاهش بیان بیشتری مشاهده شد که در تطابق با مطالعه Fattah و همکاران احتمالاً نشان دهنده اثر قدرتمند کیتوزان بر کاهش بیان ژن‌های مورد بررسی است (۳۱).

با توجه به نتایجی که در بخش‌های مختلف این تحقیق به دست آمد باید اشاره کرد که نانوکامپوزیت‌های مالاکیت/ اکسید روی/ کیتوزان ممکن است دارای فعالیت ضدبیوفیلیمی روی باکتری‌های *سودموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* باشند که این کار احتمالاً از طریق اثرگذاشتن روی ژن‌های این باکتری‌ها است. در کنار این نتایج نانوکامپوزیت‌های مذکور دارای ایمنی قابل توجهی بودند. این نتایج از این جهت ارزشمند است که ممکن است نانوکامپوزیت‌های مذکور را بتوان برای درمان عفونت‌های بیوفیلمی، بدون داشتن اثر جانبی احتمالی آتی، با انجام بررسی‌ها و آزمایش‌های بالینی بیشتر استفاده کرد.

اگرچه این مطالعه برای نخستین بار به بررسی اثر این نانوکامپوزیت‌ها بر تشکیل بیوفیلم و بیان این ژن‌ها می‌پردازد و

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

نقطه قوتی برای مطالعه حاضر است، ولی این مطالعه یک مطالعه آزمایشگاهی است و نیاز است که ژن‌های بیشتری بررسی شوند.

نتیجه‌گیری

در مجموع نانوکامپوزیت‌های حاوی کیتوزان و اکسید روی دارای فعالیت ضد بیوفیلمی بودند و توانستند به مقدار زیادی بیان ژن‌های *rhlI* و *lasI* *سودوموناس آئروژینوزا* و ژن‌های *fnbA* و *fnbB* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را کاهش دهند و دارای ایمنی قابل توجهی بودند. این نتایج نشان داد که کیتوزان، مالاکیت و اکسید روی دارای اثر هم‌افزایی برای کنترل و مهار تشکیل بیوفیلم هستند.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از پایان نامه شماره ۱۶۲۶۲۲۵۵۷ خانم زهرا رجبلو برای دریافت درجه دکتری در رشته میکروبیولوژی از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران بود.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش نیاز به ملاحظه اخلاقی ندارد.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

References

1. Elbasuney S, El-Sayyad GS, Tantawy H, Hashem AH. Promising antimicrobial and antibiofilm activities of reduced graphene oxide-metal oxide (RGO-NiO, RGO-AgO, and RGO-ZnO) nanocomposites. RSC Advances 2021; 11: 25961-25975.

2. Logpriya S, Bhuvaneshwari V, Vaidehi D, SenthilKumar R, Nithya Malar R, Pavithra Sheetal B, Kalaiselvi M. Preparation and characterization of ascorbic acid-mediated chitosan–copper oxide nanocomposite for anti-microbial, sporicidal and biofilm-inhibitory activity. Journal of Nanostructure in Chemistry 2018; 8: 301-309.

3. Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. Antibiotics 2020; 9: 59-69.

4. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Kamil MA. Bacterial biofilm and associated infections. Journal of the Chinese Medical Association 2018; 81: 7-11.

5. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. Heliyon, 2018, 4: e01067.

6. Tahaei SAS, Stájer A, Barrak I, Ostorházi E, Szabó D, Gajdács M. Correlation between biofilm-formation and the antibiotic resistant phenotype in *Staphylococcus aureus* isolates: a laboratory-based study in Hungary and a review of the literature. Infection and Drug Resistance 2021; 14: 1155.

7. Badawy MSE, Riad OKM, Taher FA, Zaki SA. Chitosan and chitosan-zinc oxide nanocomposite inhibit expression of *Las*I and *Rhl*I genes and quorum sensing dependent virulence factors of Pseudomonas aeruginosa. International Journal of Biological Macromolecules 2020; 149: 1109-1117.

8. Kariminik A, Baseri-Salehi M, Kheirkhah B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: an updated review article. Immunology Letters 2017; 190: 1-6.

9. Soltani E, Farrokhi E, Zamanzad B, Shahini Shams Abadi M, Deris F, Soltani A, Gholipour A.. Prevalence and distribution of adhesins and the expression of fibronectin-binding protein (FnbA and FnbB) among *Staphylococcus aureus* isolates from Shahrekord Hospitals. BMC Research Notes 2019; 12: 1-5.

10. Veisi S, Asadpour L. Frequency of Methicillin Resistance, fnbA and fnbB Genes in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. Iranian Journal of Medical Microbiology 2018; 12: 16-22.

11. Naskar A, Khan H, Sarkar R, Kumar S, Halder D, Jana S. Anti-biofilm activity and food packaging application of room temperature solution process based polyethylene glycol capped Ag-ZnO-graphene nanocomposite. Materials Science and Engineering: C 2018; 91: 743-753.

12. Anju VT, Paramanantham P, Siddhardha B, Sruthil Lal SB, Sharan A, Alyousef AA, Arshad M, Syed. Malachite green-conjugated multi-walled carbon nanotubes potentiate antimicrobial photodynamic inactivation of planktonic cells and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. International Journal of Nanomedicine 2019; 14: 3861.

13. Martínez-Carmona M, Gun'Ko Y, Vallet-Regí M. ZnO nanostructures for drug delivery and theranostic applications. Nanomaterials 2018; 8: 268.

14. Li J, Zhuang S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. European Polymer Journal 2020, 138: 109984.

15. Rajabloo Z, Farahpour MR, Saffarian P, Jafarirad S.. Biofabrication of ZnO/Malachite nanocomposite and its coating with chitosan to heal infectious wounds. Scientific Reports 2022; 12: 1-17.

16. Haney EF, Trimble MJ. Hancock RE. Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria. Nature Protocols, 2021; 16(5): 2615-2632.

17. Cruz CD, Shah Sk, Tammela P. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. BMC microbiology, 2018; 18: 1-9.

18. Sabaeifard P, Abdi-Ali A, Soudi MR, Dinarvand R. Optimization of tetrazolium salt assay for Pseudomonas aeruginosa biofilm using microtiter plate method. Journal of Microbiological Methods 2014; 105: 134-140.

19. Lotfpour M, Dehghanian C, Emamy M, Bahmani A, Malekan M, Saadati A, Shokouhimehr M. In-vitro

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]

corrosion behavior of the cast and extruded biodegradable Mg-Zn-Cu alloys in simulated body fluid (SBF). Journal of Magnesium and Alloys, 2021; 9: 2078-2096.

20. Panandiker A, Fernandes C, Rao KV. The cytotoxic properties of malachite green are associated with the increased demethylase, aryl hydrocarbon hydroxylase and lipid peroxidation in primary cultures of Syrian hamster embryo cells. Cancer Letter 1992; 24: 93-101.

21. Choodari Gharehpapagh A, Farahpour MR, Jafarirad S. The biological synthesis of gold/perlite nanocomposite using Urtica dioica extract and its chitosan-capped derivative for healing wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. International Journal of Biological Macromolecules 2021; 183: 447-457.

22. Kefeni KK, Msagati TA, Nkambule TT, Mamba BB. Spinel ferrite nanoparticles and nanocomposites for biomedical applications and their toxicity. Materials Science and Engineering: C. 2020 Feb 1;107:110314.

23. Kura, A.U., Hussein, M.Z., Fakurazi, S. and Arulselvan, P., 2014. Layered double hydroxide nanocomposite for drug delivery systems; bio-distribution, toxicity and drug activity enhancement. Chemistry Central Journal, *8*(1), pp.1-8.

24. Rajivgandhi G, Maruthupandy M, Muneeswaran T, Anand M, Manoharan N. Antibiofilm activity of zinc oxide nanosheets (ZnO NSs) using Nocardiopsis sp. GRG1 (KT235640) against MDR strains of gram negative Proteus mirabilis and Escherichia coli. Process Biochemistry 2018; 67: 8-18.

25. Mahamuni PP, Patil PM, Dhanavade MJ, Badiger MV, Shadija PG, Lokhande AC, Bohara RA. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles by using polyol chemistry for their antimicrobial and antibiofilm activity. Biochemistry and biophysics reports. 2019 Mar 1;17:71-80.

26. Divya M, Vaseeharan B, Abinaya M, Vijayakumar S, Govindarajan M, Alharbi NS, Kadaikunnan S, Khaled JM, Benelli G. Biopolymer gelatin-coated zinc oxide nanoparticles showed high antibacterial, antibiofilm and anti-angiogenic activity. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2018 Jan 1;178:211-8.

27. Khan F, Pham DTN, Oloketuyi SF, Manivasagan P. Oh J, Kim YM. Chitosan and their derivatives: Antibiofilm drugs against pathogenic bacteria. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020; 185: 110627.

28. Jin SE, Jin HE. Antimicrobial activity of zinc oxide nano/microparticles and their combinations against pathogenic microorganisms for biomedical applications: From physicochemical characteristics to pharmacological aspects. nanomaterials. 2021 Jan 20;11(2):263.

29. Muslim SN, Kadmy IMA, Ali ANM, Salman BK, Ahmad M, Khazaal SS, Muslim SN. Chitosan extracted from Aspergillus flavus shows synergistic effect, eases quorum sensing mediated virulence factors and biofilm against nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Biological Macromolecules 2018; 107: 52-58.

30. Gheidar H, Haddadi A, Kalani BS, Amirmozafari N. Nanoparticles impact the expression of the genes involved in biofilm formation in S. aureus, a model antimicrobial-resistant species. Journal of Medical Bacteriology. 2018 Oct 7;7(3-4):30-41.

31. Fattah RA, Mohamed TA, Elsayed MS. Effect of chitosan nanoparticles on quorum sensing-controlled virulence factors and expression of LasI and RhlI genes among Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. AIMS microbiology. 2021;7(4):415.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-01-29]