

تأثیر نانوپلیمر قالب مولکولی - نانوذرات اکسید روی (Zn) آغشته شده به اسانس مرزه خوزستانی بر میزان بیان ژن *lasR* در جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا*: یک مطالعه آزمایشگاهی

محسن عزیزی^۱، نیما بهادر^۱، اصغر شریفی^۲

^۱گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران، ^۲مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۲/۰۵/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۹

زمینه و هدف: در این مطالعه، به عنوان یک زمینه پژوهشی، بررسی کاربرد نانوذرات و گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های ناشی از *پسودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این مطالعه تعیین و تأثیر نانوذره روی (Zn) آغشته شده به اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) بر میزان بیان ژن *lasR* در جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* تشکیل دهنده بیوفیلم در شرایط برون تنی بود.

روش بررسی: این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۳۹۹ بر روی ۱۵۰ نمونه بالینی مشکوک به *پسودوموناس آئروژینوزا* غیر تکراری و متناوب که از نمونه‌های پوست، خون و ادرار بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان امام سجاد (ع) شهر یاسوج جمع‌آوری شد، انجام گرفت. پس از ورود ۴ سویه بالینی به همراه یک سویه استاندارد *پسودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 25922) به عنوان نمونه، اسانس مرزه خوزستانی از شرکت دارویی باریج اسانس (کاشان، ایران) تهیه شد. سپس، پس از تعیین هویت نمونه *پسودوموناس آئروژینوزا* جدا شده از بیماران، PCR جهت تأیید حضور ژن *lasR* و ژن *DNA gyrase A*، تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی، آزمون میکرودیالوشن براث، رقیق‌سازی چکربورد، آزمون آگار برای تعیین حداقل غلظت کشندگی، بررسی بیان ژن *lasR* با *Real time PCR*، در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفتند. داده‌های جمع‌آوری شده بر استفاده از آزمون‌های آماری من ویتنی، تی و تی جفت نمونه‌ای تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: با توجه به نتایج الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی، بیشترین مقاومت مربوط به آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، کولیسین (۱۰ میکروگرم) و سیپروفلوکسازین (۵ میکروگرم) بود و کمترین مقاومت مربوط به سفنازیدین (۳۰ میکروگرم)، ایمپنم (۱۰ میکروگرم) بود. همچنین، اسانس مرزه خوزستانی و نانوذرات اکسید روی در برابر سویه استاندارد و جدایه‌های بالینی، دارای حداقل غلظت مهار (۵۱۲-۲۵۶ میکروگرم/میلی لیتر) بودند. حد شاخص غلظت مهار (FIC) برابر عدد ۱ شد که نمایگر اثر افزایش است. همچنین، حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) چهار برابر حداقل غلظت مهار (MIC) بود. بالاترین MIC، مربوط به نانوذرات اکسید روی و کمترین آن مربوط به استفاده هم‌زمان اسانس و نانوذره شد. در حالت ترکیبی تیمارها، به نصف غلظت MIC تیمارهای مجزا، نیاز بود. همچنین، با کاهش اثر مهار کنندگی تیمارهای مورد مطالعه، تولید بیوفیلم افزایش یافت. میزان بیان ژن *lasR* در غلظت MIC انواع تیمارهای مطالعه متفاوت بود؛ کمترین میزان بیان ژن *lasR* در غلظت MIC به هر یک از تیمارها به تنهایی و بیشترین به استفاده هم‌زمان تیمارها اختصاص داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که سویه‌های بالینی به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مقاوم بودند، اما به برخی دیگر حساس بودند. همچنین، ترکیبات اسانس گیاه مرزه خوزستانی شناسایی و تجزیه شدند. اصلی‌ترین ترکیب این اسانس کارواکرول بود که خاصیت ضد عفونی کننده دارد. با استفاده از FT-IR، گروه‌های عاملی پلیمر قالب مولکولی و اسانس شناسایی شدند. نتایج نشان داد که ترکیب اسانس و نانوپلیمر روی به صورت جداگانه منجر به کاهش بیان ژن *lasR* در سویه‌های بالینی می‌شوند. با ترکیب این دو تیمار، تأثیر کاهش بیان ژن *lasR* قوی‌تر و اثربخش‌تر می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *پسودوموناس آئروژینوزا*، نانوذره روی، اسانس مرزه خوزستانی، *lasR*، بیوفیلم

*نویسنده مسئول: نیما بهادر، شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، گروه میکروبیولوژی

Email: bahador@iaushiraz.ac.ir

مقدمه

پسودوموناس آئروژینوزا از جمله باکتری‌های گرم منفی است که در اکثر مراکز بیمارستانی بین ۱۰ تا ۲۰ درصد عفونت ایجاد می‌کند (۱-۳). عفونت پسودوموناس به ویژه در بین مبتلایان به زخم‌های سوختگی، فیبروز کیستیک، لوسمی حاد، پیوند عضو و اعتیاد به دارو از طریق وریدی شیوع گسترده‌ای دارد (۴-۶ و ۱). بیمارانی که به مدت طولانی در بیمارستان بستری هستند، غالباً به وسیله این باکتری در معرض خطر ابتلا به عفونت هستند (۴-۶ و ۱). در این باکتری، بیوفیلم با فعال کردن یک شبکه معمولی کواروم سنسینگ، از نوع LuxI/LuxR-type که شامل یک سنتاز *abaI* و گیرنده *abaR* است، تشکیل می‌شود. در باکتری پسودوموناس آئروژینوزا، دو سیستم کامل کروم سنسینگ وجود دارد، *las* و *rhl* سیستم *las* شامل ژن‌های فعال‌کننده رونویسی *lasR* و *lasI* می‌باشد (۷ و ۸). تشکیل بیوفیلم عامل بیماری‌زای مهمی در عفونت‌های پسودوموناس آئروژینوزا است. از طرف دیگر، افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی پسودوموناس آئروژینوزا، امیدهای زیادی را در درمان بیماران به وجود آورده است (۹). هم‌چنین میزان مرگ و میر ناشی از عفونت‌های سوختگی پسودوموناس در بیماران رو به افزایش است. بنابراین، توجه به ترکیباتی که بتواند نقش مؤثری بر روی این ارگانسیم و عملکرد آن داشته باشد بسیار مهم می‌باشد. در بین ترکیبات مؤثر کارواکروول موجود در اغلب اسانس‌های روغنی دارای خاصیت ضدباکتری است که می‌تواند به عنوان یک

عامل بالقوه برای مهار کوئوروم سنسینگ (QS) (۱) باکتری‌ها به دلیل توانایی این ماده در تعامل با غشای سلولی باکتری و گیرنده‌های پروتئینی درگیر در تشکیل بیوفیلم، عمل نماید (۱۱ و ۱۰). گیاه مرزه خوزستانی دارای خواص ضدباکتریایی، ضدالتهابی و آرامش‌بخش است. این گیاه از تیره نعنائیان و گیاه بومی مناطق گرم و معتدل زاگرس می‌باشد. عمده فعالیت ضد میکروبی این گیاه اساساً به دلیل اجزای فنلی اصلی آن یعنی کارواکروول و تیمول می‌باشد (۱۲ و ۱۳).^۱ تانواکسید روی یکی از مهم‌ترین نانوذرات است که در صنایع مختلفی مانند پزشکی، بهداشتی، آرایشی و صنایع غذایی کاربرد دارد. خواص ضدباکتریایی تانواکسید روی باعث شده تا این نانوذرات به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها مورد استفاده قرار گیرند. نانو اکسید روی به دلیل خاصیت ضدباکتریایی و ضد عفونی در تصفیه آب و پساب برای حذف آلودگی‌های محیط زیست به کار می‌رود. این نانوذرات دارای خاصیت ضد احتراقی هستند و در تولید صابون به دلیل خاصیت مهار بوی بدن و کرم‌های ضد شوره مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۴-۱۷). فلز روی یکی از عناصر ضروری و غیر سمی برای انسان محسوب می‌شود، اکسید روی خاصیت سمی برای سلول‌های انسانی ندارد (۱۸ و ۱۹)، یکی از ویژگی‌های نانوذرات اکسید روی، خاصیت ضد میکروبی آن می‌باشد (۲۱-۱۹). مکانیسم‌های مختلفی برای رفتار ضد میکروبی نانوذرات اکسید

1-Quorum Sensing(QS)

با روش تقطیر در بخار آب^(۱) از شرکت طیب دارو خریداری شده و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند(۲۵).^۱

در این تحقیق شناسایی ترکیبات سازنده اسانس با استفاده از کروماتوگراف GC(مدل HP 6890) با ستون MS-HP5 به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر صورت گرفت. دمای ستون با سرعت ۶ درجه در دقیقه از ۶۰ به ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد رسید و گاز حامل هلیوم ۹۹/۹۹۹ درصد با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه در جریان بود و دمای تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و میزان تزریق ۱ میکرولیتر بود. دستگاه MASS با مدل HP5973 و آنالیز یونیزاسیون ($EI=70\text{ eV}$) بود. در این روش نوع و میزان هر یک از ترکیبات سازنده اسانس با مقایسه طیف جرمی هر یک از ترکیبات سازنده اسانس با طیف جرمی ترکیبات موجود در بایگانی عظیم دستگاه GC-MS و تجزیه و تحلیل پیک‌های مختلف در کروماتوگرام‌ها مشخص شد.

نانوزرات اکسید روی از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان دارای متوسط اندازه ۲۰ نانومتر و ۹۹/۹۹ درصد خلوص از شرکت آمریکایی US Nano خریداری شد.

استخراج DNA مطابق روش *Bolling* انجام شده است. در این روش یک کلنی در ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی حل شده است و به مدت ۱۰ دقیقه در

روی پیشنهاد شده است که از آن میان می‌توان به آزاد شدن یون فلزی، تولید اکسیژن فعال، پراکسید هیدروژن، برهمکنش‌های الکتروستاتیکی، نفوذ به درون سلول، بستن راه‌های ارتباطی سلول، نشت پروتئین و تأثیر در فعالیت برخی از آنزیم‌ها مانند آنزیم‌های پری پلاسمیک، دهیدروژناز و تخریب DNA اشاره کرد(۲۲ و ۲۳). لذا هدف از این مطالعه تعیین و تأثیر نانوذره روی(Zn) آغشته شده به اسانس مرزه خوزستانی(*Satureja khuzestanica*) بر میزان بیان ژن *lasR* در جدایه‌های بالینی پseudomonas آئروژینوزا تشکیل دهنده بیوفیلم در شرایط برون تنی بود.

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۳۹۹ بر روی ۱۵۰ نمونه بالینی مشکوک به پseudomonas آئروژینوزا غیر تکراری و متناوب که از نمونه‌های پوست، خون و ادرار بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان امام سجاده(ع) شهر یاسوج جمع‌آوری شد انجام گرفت. سپس نمونه‌های بالینی به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی منتقل شده و بعد از تأیید با تست‌های بیوشیمیایی، تعداد ۴ سویه بالینی که حضور ژن *lasR* با تست PCR، تأیید شد مورد آزمون‌های بعدی قرار گرفت(۲۴). همچنین در طرح مذکور سویه استاندارد پseudomonas آئروژینوزا(ATCC 25922) به عنوان کنترل وارد مطالعه گردید.

اسانس گیاه مرزه خوزستانی با هر بار بوم(TBQ400-357) از سرشاخه‌های گلدار گیاه و

1-Steam Distillation

تانک الکتروفورز *Major science* ران شده بود. باید توجه داشت که سطح بافر باید ۱ تا ۲ میلی لیتر بالاتر از سطح ژل باشد، به طوری که سطح کل چاهک‌ها را بپوشاند. از آنجا که *DNA* دارای بار منفی می‌باشد، محل قرار گرفتن حفره‌ها در ابتدای الکتروفورز به سمت قطب منفی (کاتد) بود. بدین صورت *DNA* به سمت قطب مثبت حرکت کرده بود.

پس از پایان الکتروفورز، ژل را از پلیت خارج کرده و بر روی دستگاه *ترانس ایلومنیاتور* قرار داده شد. وجود رنگ *اتیدیوم بروماید* در ژل باعث ظاهر شدن باندهای حاوی *DNA* شد. پس از مشاهده باندهای *DNA*، ژل به دستگاه ژل داگ منتقل شد و پس از تنظیمات مورد نیاز، عکس گرفته شد.

جهت انجام کشت آنتی بیوگرام یا تست حساسیت میکروبی، از روش استاندارد *دیسک دیفیوژن ۲۰۲۱ CLSI* استفاده شد، بدین منظور از استاندارد نیم مک فارلند استفاده شد. دیسک‌های آنتی بیوتیکی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت‌های مدیا تهیه شدند که شامل؛ ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکسازین (۵ میکروگرم)، سفتازیدین (۳۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، پپیرسیلین بر تازوباکتام (۱۰/۱۰۰ میکروگرم) و کولیسین (۱۰ میکروگرم)، تیکارسیلین/کلولانیکاسید (۱۰/۷۵ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) بودند.

اسانس گیاه مرزه خوزستانی با هر بار بمیوم (*TBQ400-357*) از سرشاخه های گلدار گیاه و با روش

۱۰۰ درجه سلسیوس جوشانده شده است. سپس با سانتریفیوژ *SiGMA* آلمان با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و ۱۰۰ لاند از محلول رویی که حاوی *DNA* بوده در میکروتیوب ریخته و در ۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شده است.

برای *SET-UP* کردن با توجه به *Tm* مربوط به هر رشته از پرایمرها گرادینت دمایی محاسبه شده است و دمای مطلوب انتخاب شده است (جدول ۱). بر این اساس دمای *Annealing* هر یک از پرایمرهای انتخاب شده جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بعد از گرادینت به دست آمده است (جدول ۲).

در این تحقیق با روش آنالیزی بیوانفورماتیکی برای نواحی بسیار ثابت و حفاظت شده ژن‌های فوق پرایمرهای اختصاصی طراحی شد، توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مورد بررسی از سایت *NCBI* گرفته شد و به کمک روش *Alignment* نواحی بسیار ثابت شناسایی شد و در مرحله بعد به کمک نرم افزار *Gene runner* طراحی پرایمر انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ آورده شده است.

ترکیبات لازم برای واکنش *PCR* با هم مخلوط شده است و واکنش *PCR* در دستگاه *ترموسایکلر Corbett* آمریکا انجام شده است، این روند برای ۳۵ سیکل تکرار شده است (جدول ۳).

پس از تهیه ژل آگاروز ۱/۵ درصد، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول *PCR* را در درون چاهک‌ها ریخته و با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۷۰ دقیقه به وسیله

بعد از شستشوی و خالی کردن چاهک‌ها، به چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر متانول مطلق افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس متانول را دور ریخته و پلیت را ثابت گذاشته تا الکل از آن حذف شد. به چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله یک درصد اضافه کرده و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. به وسیله پیست با آب مقطر چاهک‌ها را شستشو داده شد تا رنگ اضافی حذف شود. در انتها چاهک‌ها خالی شد و به هر یک از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیت استیک اسید گلاسیال ۳۳ درصد افزوده و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه پلیت را با دستگاه الیزا ریدر با طول موج ۶۴۰ نانومتر خوانده شد.

برای بررسی نتایج از روش

Optical density cut-off استفاده شد. به منظور بررسی انحراف معیار و میانگین *OD* چاهک‌های کنترل منفی را محاسبه نموده سپس طبق فرمول زیر محاسبه انجام شد.

(انحراف معیار چاهک های کنترل منفی $\times 3$) +

میانگین *OD* چاهک های کنترل منفی = OD_c

بعد از محاسبه OD_c یا کات آف، *OD*

چاهک‌های مورد مطالعه را طبق جدول زیر دسته‌بندی کردیم (۲۷ و ۲۶).

برای تعیین *MIC* از روش رقت‌گیری سریالی به

صورت سه تکرار در محیط کشت مولر هیتون برات،

انجام شد. بدین صورت که رقت‌های مختلف (۱/۲۵،

۲/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲) میکرولیتر بر

میلی‌لیتر از نانوذرات روی به چاهک‌های پلیت ۹۶

خانه‌ای اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از

تقطیر در بخار آب از شرکت طبیب دارو شهر اهواز، خریداری شده و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ درجه درجه سانتی گراد نگه داری شد (۲۵).

در این مطالعه، ترکیبات سازنده اسانس گیاه مرزه خوزستانی با استفاده از کروماتوگراف *GC* (مدل ۶۸۹۰ HP) با ستون *MS-HP5* به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی متر شناسایی شد. اسانس مرزه خوزستانی در غلظت ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید و در رقت‌های ۱/۲ مورد استفاده قرار گرفت. بعد از به دست آمدن غلظت‌ها، آن‌ها تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. ترکیبات سازنده اسانس با مقایسه طیف جرمی هر یک از ترکیبات سازنده اسانس با طیف جرمی ترکیبات موجود در بایگانی عظیم دستگاه *GC-MS* و تجزیه و تحلیل پیک‌های مختلف در کروماتوگرام‌ها شناسایی شدند.

در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای به هر چاهک ۲۰۰

میکرولیتر محیط حاوی باکتری *Pseudomonas* به

میزان ($10^8 \times 1/5$) اضافه گردید. ۳ چاهک به

عنوان کنترل منفی (حاوی محیط کشت مولر هیتون

براث و تیمارها) و سه چاهک (حاوی محیط کشت مولر

هیتون براث و باکتری) را به عنوان کنترل مثبت در

نظر گرفته شد. سپس پلیت ۲۴ ساعت انکوبه و پس از

زمان مذکور برای مطالعه بیوفیلم رنگ آمیزی صورت

گرفت (۲۷ و ۲۶)، برای این منظور ابتدا محیط کشت‌ها

از داخل چاهک‌ها دور ریخته شد.

سپس چاهک‌ها را یک الی دو بار با بافر *PBS*

با حجم ۲۰۰ میکرولیت شستشو داده شد و مرحله قبل

هیتون آگار کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت کمترین غلظتی از اسانس، نانوذره و یا ترکیب آنها با هم که ۹۹/۹ درصد باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان غلظت کشندگی MBC گزارش شد (۳۱).^۱

برای تعیین قطر هاله عدم رشد سویه‌ها (ZOI)^(۱)، ابتدا از سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند با سوآپ استریل بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. سپس، به وسیله انتهای پیت پاستور شیشه‌ای که دارای قطری برابر دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (ایمی پنم) (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکسازین (۵ میکروگرم)، سفتازیدین (۳۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، پپرسیلین بر تازوباکتام (۱۰/۱۰۰ میکروگرم) و کولیسین (۱۰ میکروگرم)، تیکارسیلین/اکلوانیکاساید (۱۰/۷۵ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) بود، چاهک‌هایی روی محیط کشت، پانچ گردیدند. سپس به وسیله سمپلر، به میزان ۶۰ میکرولیتر از غلظت MIC اسانس مرزه خوزستانی، از غلظت MIC نانوذرات اکسید روی و ترکیب این دو بوسیله سرسمپلر درون چاهک‌های ایجاد شده، ریخته شد. سپس پلیت‌ها را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. همچنین از دیسک آغشته شده به ۲۰ میکرولیتر سی متیل سولفوکساید به عنوان کنترل منفی و از دیسک آنتی‌بیوتیکی جنتامایسین ۱۰ میکروگرم ساخت

سوسپانسیون میکروبی به میزان ($10^8 \times 1/5$) CFU به هر چاهک اضافه گردید و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب در گرمخانه تیمار شدند. ۳ چاهک به عنوان بلانک (کنترل منفی) و سه چاهک به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. در نهایت، کدورت تمام چاهک‌ها با استفاده از دستگاه قرائت گر ایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانش شد. به منظور تعیین MIC/اسانس مرزه خوزستانی، نیز دقیقاً همانند روش فوق عمل شد (۲۸).

به منظور بررسی برهمکنش ضد میکروبی اسانس مرزه خوزستانی با نانوذرات اکسید روی از روش رقیق‌سازی چک‌برد استفاده شد (۲۹ و ۳۰)، که نتایج حاصل از این آزمون با استفاده از فرمول زیر و محاسبه غلظت بازدارنده کسری (FIC) بیان گردیدند:

$$\text{Sum FIC A,B} = \frac{\text{MIC A in combination}}{\text{MIC A alone}} + \frac{\text{MIC B in combination}}{\text{MIC B alone}}$$

Sum FIC A, B: مجموع غلظت بازدارندگی کسری

اسانس و نانوذره

A MIC: حداقل غلظت بازدارندگی اسانس

B MIC: حداقل غلظت بازدارندگی نانوذره

پس از محاسبه FIC index نتایج به صورت زیر تفسیر شد: مقادیر کمتر از ۰/۹ نشان دهنده اثر سینرژیک، مقادیر بین ۰/۹ تا ۱/۱ نشان دهنده اثر افزایشی و مقادیر بیش از ۱/۱ نشان دهنده اثر آنتاگونیسمی بودند.

پس از بررسی نتایج MIC از روی چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه، برای تعیین حداقل غلظت کشندگی همه چاهک‌های فاقد کدورت، جداگانه بر روی محیط مولر

1- Zone of Inhibition)

cdna سازی از طریق انجام *PCR* روی ژل آگارز تأیید گردید. برای ساخت *cdna* از کیت *RT PCR* شرکت سیناژن استفاده شد.

سپس، برای تعیین میزان بیان ژن‌های *lasR* و *DNA Gyrase* از تکنیک *Real time PCR* استفاده شد. محلول‌های مورد نیاز، جهت انجام *Real time PCR*، بر طبق پرتکل کیت *SYBR Green Master Mix* تهیه شدند. تعیین کمی بیان ژن *lasR*، کمیت سنجی نسبی *cdna* ژن‌های مورد بررسی در مقایسه با *cdna* ژن *DNA Gyrase A* به روش ΔCt انجام شد.

با توجه به توضیحاتی که از جنبه‌های مثبت پروژه به بیماران داده شد، مشکل همکاری نکردن بیماران حل شد. جداسازی جدایه‌های بالینی پseudomonas آئروژینوزا تولید کننده بیوفیلیم با افزایش تعداد نمونه‌های بالینی برطرف شد. همچنین، با یافتن جدایه‌های پseudomonas آئروژینوزا که ژن *lasR* را دارا بودند، مشکل با افزایش تعداد نمونه‌های جداسازی از بیماران برطرف شد.

شرکت پادتن طب به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (۳۲).

برای هر نمونه پseudomonas آئروژینوزا مورد مطالعه به میزان ۵۰ میکرولیتر معادل نیم مک فارلند از آن در میکروتیوب ۱/۵ سی‌سی اضافه گردید. در ادامه به هر میکروتیوب مذکور، معادل MIC، حاصل از اسانس، نانوذره و ترکیب این دو، اضافه شده و با محیط کشت مولر هینتون براث استریل، به حجم رسانده شد. بعد از مخلوط کردن آنها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند. سپس انکوباسیون نمونه‌ها جهت استخراج *RNA* مورد استفاده قرار گرفتند (۳۳).

برای استخراج *RNA* از کیت *Cinnapure RNA* شرکت سیناژن استفاده گردید، سپس اندازه‌گیری غلظت *RNA* به وسیله دستگاه نانودراپ انجام شده و نمونه‌ها قرار داده شدند. به منظور بررسی بیان ژن *lasR*، نمونه‌های *RNA* سوش استاندارد و جدایه‌های بالینی پاتوژن، پس از کیفیت سنجی با دستگاه نانو درآپ بلافاصله *cdna* تهیه شدند. صحت انجام واکنش

جدول ۱: پرایمرهای انتخاب شده جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز

پرایمر	توالی	طول آمپلیکون (bp)
F- DNA gyrase A	5'-CGGCGACATCZNCACACC-3'	۱۹۵
R- DNA gyrase A	5'-GGGCCGTTGAZNTCGGZNTA-3'	
F-LasR	5'-GCAZNCGCATGGTCGACAZNA-3'	۲۰۱
R-LasR	5'-CGCTGTGCTCTTGCZNGTTGTGA-3'	

جدول ۲: شرایط انجام واکنش PCR برای ژن lasR

فاز	برنامه	دما	زمان	دوره تعداد
تکثیر اولیه	۱	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۱ دقیقه	۱
تکثیر	۲	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال	۲	۵۴ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه	۳۵
توسعه	۲	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه	۳۵
توسعه نهایی	۳	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۷ دقیقه	۱

جدول ۳: مقادیر مورد نیاز برای انجام واکنش PCR

غلظت	میزان (میکرولیتر)	نوع ماده
۲/۵	۲/۵	PCR buffer
۲	۲	MgCl ₂
۱	۱	dNTPs
۱/۵	۱	Taq polymerase
۲۰	۱/۵	Primer F*3
۲۰	۱/۵	Primer R*3
-	۲	DNA
-	۸	Distilled water
۲۵	-	Total

جدول ۴: توانایی تشکیل بیوفیلم

محاسبه میزان ODc	توانایی تشکیل بیوفیلم
OD > 4×ODc نمونه	قوی
2×ODc < OD ≤ 4×ODc	متوسط
ODc < OD ≤ 2×ODc	ضعیف
OD ≤ ODc نمونه	منفی

یافته‌ها

بر اساس نتایج آزمایشات حساسیت

آنتی‌بیوتیکی، بیشترین مقاومت مربوط به آمیکاسین ۳۰ میکروگرم، کولیسین ۱۰ میکروگرم و سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم مربوط بود و کمترین مقاومت مربوط به سفتازیدیم ۳۰ میکروگرم و ایمپنم ۱۰ میکروگرم بود، مقاومت چند دارویی نیز در ۵ جدایه مورد مطالعه دیده شد (جدول ۵).

در این مطالعه، یک نمونه سوش استاندارد (از ذخایر ملی ژنتیک) و چهار نمونه از جدایه‌های بالینی پسودوموناس آئروژینوزا از بین ۵۰ نمونه جمع‌آوری شده از زخم بیماران سوختگی بیمارستان‌های آموزشی یاسوج به عنوان نمونه وارد مطالعه گردیده است.

بررسی باکتری‌های رشد یافته بر محیط کشت *TSB* با دستگاه الیزا ریدر، بر اساس *OD* چاهک‌های مورد مطالعه، بیشترین درصد تشکیل بیوفیلم در آن‌ها مشاهده شده است، انتخاب شده و حداقل غلظت مهارتی، حداقل غلظت باکتری‌کشی، قطر هاله عدم رشد، درصد تشکیل بیوفیلم و میزان بیان ژن *lasR* در سویه استاندارد و این جدایه‌های بالینی باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* در حضور *اسانس مرزه خوزستانی*، نانوذره روی (*Zn*) و ترکیب نانوذرات اکسید روی با *اسانس مرزه خوزستانی* مورد بررسی قرار گرفتند.

ترکیبات تشکیل دهنده *اسانس گیاه مرزه* در جدول ۶ ارایه شده است. بیشترین ترکیب کارواکرول است که ۹۹/۸۱ درصد از جدول را تشکیل می‌دهد. کارواکرول یک ترکیب شیمیایی با فرمول *C10H14O* است. کمترین ترکیب توجن یا ثوجین است که ۰/۴ درصد از جدول را تشکیل می‌دهد. توجن یا ثوجین یک ترکیب شیمیایی با فرمول *C10H16O2* است.

حداقل غلظت مهارتی (*MIC*) بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر در سویه استاندارد و جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* تشکیل دهنده بیوفیلم مورد مطالعه در حضور *اسانس مرزه خوزستانی*، نانوذرات اکسید روی و ترکیب نانوذرات اکسید روی با *اسانس مرزه خوزستانی* را به تفکیک نشان می‌دهد (جدول ۷).

شاخص غلظت مهارتی نسبی (*FIC*) ترکیب *اسانس مرزه خوزستانی* با نانوذرات اکسید روی (*Zn*)

در این مطالعه حضور ژن *lasR* در باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* مورد مطالعه، به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (*PCR*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، ۱۲ نمونه بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شد که از نظر وجود بیوفیلم قوی تشخیص داده شدند و یک سوش استاندارد به عنوان شاهد (کنترل مثبت) و یک سوش بالینی فاقد ژن مذکور (کنترل منفی)، انتخاب شده و مورد مطالعه مولکولی، قرار گرفتند (شکل ۱).

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جهت شناسایی ژن *lasR* در میان جدایه‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* چاهک ۱: نشانگر ۱۰۰ bp، چاهک‌های ۲-۱۳: جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا*، چاهک‌های ۲، ۴، ۹ و ۱۰ جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* ی واجد ژن *lasR* هستند که در مقابل آنها باندها با طول ۲۰۱ bp تشکیل شده‌اند. چاهک ۱۴: کنترل مثبت (سوش استاندارد *پسودوموناس آئروژینوزا ATCC 25922* واجد ژن *lasR*)، چاهک ۱۵: کنترل منفی (جدایه *پسودوموناس آئروژینوزا* فاقد ژن *lasR*)، چاهک ۱۶: نشانگر ۱۰۰ bp، چاهک‌های ۲، ۴، ۹ و ۱۰ (شکل ۲).

از بین ۱۲ جدایه بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* که تشخیص قطعی داده شدند، تعداد ۴ جدایه بالینی که علاوه بر تأیید هویت به وسیله روش‌ها و پروتکل‌های استاندارد آزمایشگاهی، باکتریایی، بیوشیمیایی و مولکولی تشخیص *پسودوموناس آئروژینوزا*، در آزمایشات فنوتیپی

به روش رقیق‌سازی چکربورد برابر با عدد ۱ بود که نمایگر اثر افزایشی است (جدول ۸).

حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر در سویه استاندارد و جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* تشکیل دهنده بیوفیلم مورد مطالعه در حضور *اسانس مرزه خوزستانی*، نانوذرات اکسید روی و ترکیب *اسانس مرزه خوزستانی* با نانوذرات اکسید روی (Zn) را به تفکیک نشان می‌دهد (جدول ۹). نمونه‌ای از پلیت‌های مورد استفاده جهت تعیین *حداقل غلظت باکتری‌کشی* تیمارهای پژوهش بر علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* تشکیل دهنده بیوفیلم مورد مطالعه در شکل ۳ ارائه شده است.

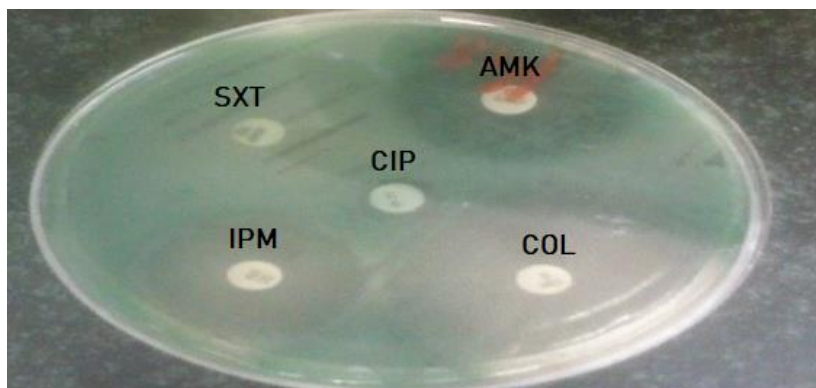
قطر *هاله عدم رشد (ZOI)* در *غلظت MIC اسانس مرزه خوزستانی*، نانوذرات اکسید روی (Zn) و ترکیب نانوذرات اکسید روی با *اسانس مرزه خوزستانی* بر علیه سویه استاندارد (PAO1) و جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* تشکیل دهنده بیوفیلم بر حسب mm را به تفکیک نشان می‌دهد (جدول ۱۰).

میزان تشکیل بیوفیلم سویه استاندارد (PAO1) و جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* بر حسب درصد در غلظت‌های متفاوت *اسانس مرزه خوزستانی* و نانوذرات اکسید روی (Zn) در آن به تفکیک گزارش شده است. بر اساس نتایج این جدول، با کاهش غلظت *اسانس مرزه خوزستانی* و نانوذره روی، درصد تشکیل بیوفیلم افزایش یافته است (جدول ۱۱). نمونه‌ای از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مورد

استفاده جهت تعیین درصد تشکیل بیوفیلم *پسودوموناس آئروژینوزا* های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های متفاوت تیمارهای مطالعه در شکل ۴ ارائه شده است.

میزان تشکیل بیوفیلم سویه استاندارد (PAO1) و جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* بر حسب درصد در غلظت‌های متفاوت ترکیب نانوذرات اکسید روی با *اسانس مرزه خوزستانی* گزارش شده است. بر اساس نتایج جدول فوق، با کاهش غلظت این تیمار ترکیبی، درصد تشکیل بیوفیلم افزایش یافته است. شایان ذکر است غلظت *اسانس* و نانوذره در ترکیب نانوذرات اکسید روی با *اسانس مرزه خوزستانی* با روش رقیق‌سازی چکربورد مشخص شده است (جدول ۱۱).

میزان بیان ژن *lasR* در سویه استاندارد (PAO1) و جدایه‌های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* تشکیل دهنده بیوفیلم در غلظت *MIC اسانس مرزه خوزستانی*، نانوذرات اکسید روی (Zn) و ترکیب نانوذرات اکسید روی با *اسانس مرزه خوزستانی* را به تفکیک نشان می‌دهد (جدول ۱۲). نمودار منحنی ژن *lasR* و *DNA gyraseA* در حضور *اسانس مرزه خوزستانی*، در شکل ۵، ارائه شده است، منحنی ذوب سویه استاندارد *پسودوموناس آئروژینوزا* ارائه شده در شکل ۶، نمایگر این است که دمای ذوب ژن‌های هدف و درون‌زاد مورد مطالعه در یک راستا بوده است.



شکل ۱: تست آنتی‌بیوگرام برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

جدول ۵: وضعیت حساسیت سویه استاندارد و جدایه‌های بالینی باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا*

جدایه‌های بالینی <i>پسودوموناس آئروژینوزا</i>			سویه استاندارد			آنتی‌بیوتیک
حساس تعداد (درصد)	نیمه حساس تعداد (درصد)	مقاوم تعداد (درصد)	حساس تعداد (درصد)	نیمه حساس تعداد (درصد)	مقاوم تعداد (درصد)	
۰(۰)	۱۶(۶۴)	۹(۳۶)	۱(۱۰۰)	۰(۰)	۰(۰)	سفتازیدیم ۳۰ میکروگرم
۲(۸)	۹(۳۶)	۱۴(۵۶)	۱(۱۰۰)	۰(۰)	۰(۰)	سفتوتاکسیم ۳۰ میکروگرم
۲(۸)	۱(۴)	۲۲(۸۸)	۱(۱۰۰)	۰(۰)	۰(۰)	آمیکاسین ۳۰ میکروگرم
۲(۸)	۱۴(۵۶)	۹(۳۶)	۱(۱۰۰)	۰(۰)	۰(۰)	ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم
۳(۱۲)	۸(۳۲)	۱۴(۵۶)	۱(۱۰۰)	۰(۰)	۰(۰)	جنتامایسین ۱۰ میکروگرم
۱(۴)	۱۰(۴۰)	۱۴(۵۶)	۱(۱۰۰)	۰(۰)	۰(۰)	پپیراسیلین/تازوباکتام ۱۱۰ میکروگرم
۴(۱۶)	۱۰(۴۰)	۱۱(۴۴)	۱(۱۰۰)	۰(۰)	۰(۰)	تیکارسیلین اکلاولانیکاسید ۷۵/۱۰
۰(۰)	۴(۱۶)	۲۱(۸۴)	۱(۱۰۰)	۰(۰)	۰(۰)	کولیسین ۱۰ میکروگرم
۰(۰)	۴(۱۶)	۲۱(۸۴)	۰(۰)	۱(۱۰۰)	۰(۰)	سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم



شکل ۲: محصول *PCR* بر ژل آگاروز

جدول ۶: ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه مرزه خوزستانی

ردیف	ترکیبات شیمیایی	درصد	حد پذیرش
۱	توجن یا ثوجین	۰/۴	
۲	آلفا-پاینین	۰/۵۵	
۳	کامفن	۰/۰۶	
۴	بتا-پاینین	۰/۱۲	
۵	بتا-مایرسین	۰/۸۱	
۶	۱-فلاندرین	۰/۱۸	
۷	دلتا-۳-کارن	۰/۰۵	
۸	آلفا-ترپینین	۰/۸۹	
۹	سیمن	۴/۰۹	
۱۰	لیمونن	۰/۴۰	
۱۱	۱-۸-سینئول	۰/۶۱	
۱۲	ترنس-بتا-اوسیمین	۰/۰۴	
۱۳	گاما-ترپینین	۴/۱۸	
۱۴	ترانس-هیدرات سابینین	۰/۱	
۱۵	آلفا-ترپینول	۰/۱۵	
۱۶	سیس-هیدرات سابینین	۰/۰۵	
۱۷	لینالول ال	۰/۵۷	
۱۸	گاما-ترپینین	۰/۰۶	
۱۹	برنئول ال	۰/۱۲	
۲۰	۴-ترپینین	۰/۹۷	
۲۱	ایزوتیمول متیل اتر	۰/۲۳	
۲۲	کاروون	۰/۱۶	
۲۳	تیمول	۰/۶۱	
۲۴	کارواکرول	۸۱/۹۹	
۲۵	اوژنول	۰/۱۴	
۲۶	کارواکریل استات	۰/۳۶	
۲۷	ترانس کاریوفیلین	۰/۲۶	
۲۸	آلوآرومادرن	۰/۰۷	
۲۹	نریل استون	۰/۰۵	
۳۰	بتا-بیزابولن	۰/۰۴	
۳۱	سیس-آلفا-بیسابولول	۰/۹۴	
۳۲	بتا-المان	۰/۱۷	
۳۳	گاما-ترپینین	۰/۱۶	
۳۴	توجن یا ثوجین	۰/۱۲	

کارواکرول کمتر از ۹۰ درصد

جدول ۷: حداقل غلظت مهارئ اسانس مرزه خوزستانی، نانوذره قالب مولکولی - نانوذرات اکسید روی و ترکیب نانوذرات اکسید روی با اسانس مرزه خوزستانی بر علیه سویه استاندارد و جدایه‌های بالینی باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* تشکیل دهنده بیوفیلم مورد مطالعه

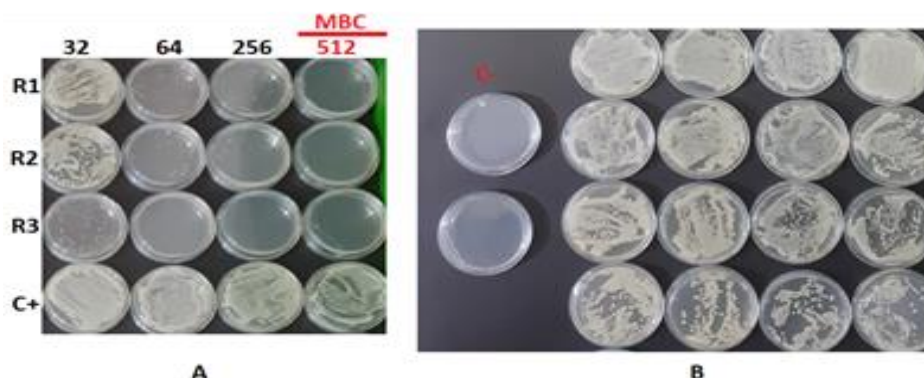
پسودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه	اسانس مرزه خوزستانی (میکروگرم بر میلی لیتر)	نانوذره روی (میکروگرم بر میلی لیتر)	غلظت اسانس (میکروگرم بر میلی لیتر)	برهمکنش ضد میکروبی ترکیب اسانس مرزه خوزستانی با نانوذرات اکسید روی (Zn) به روش رقیق‌سازی چکربورد غلظت نانوذره (میکروگرم بر میلی لیتر)
سویه استاندارد	۲۵۶	۲۵۶	۱۲۸	۱۲۸
جدایه بالینی ۱	۵۱۲	۲۵۶	۲۵۶	۱۲۸
جدایه بالینی ۲	۲۵۶	۵۱۲	۱۲۸	۲۵۶
جدایه بالینی ۳	۵۱۲	۵۱۲	۲۵۶	۲۵۶
جدایه بالینی ۴	۲۵۶	۲۵۶	۱۲۸	۱۲۸

جدول ۸: شاخص غلظت مهارتی نسبی (FIC) ترکیب اسانس مرزه خوزستانی با نانوذرات اکسید روی (Zn) به روش رقیق‌سازی چک‌بورد

تفسیر نتیجه	شاخص غلظت مهارتی نسبی (FIC)	پسودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه
اثر افزایشی	۱	سویه استاندارد
اثر افزایشی	۱	جدایه بالینی ۱
اثر افزایشی	۱	جدایه بالینی ۲
اثر افزایشی	۱	جدایه بالینی ۳
اثر افزایشی	۱	جدایه بالینی ۴

جدول ۹: حداقل غلظت باکتری‌کشی اسانس مرزه خوزستانی، نانوذره روی (Zn) و ترکیب نانوذرات اکسید روی با اسانس مرزه خوزستانی بر علیه *Pseudomonas آئروژینوزا* های تشکیل دهنده بیوفیلم مورد مطالعه

ترکیب اسانس مرزه خوزستانی با نانوذره روی (Zn) غلظت نانوذره- نانوذره (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	غلظت اسانس (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	نانوذرات اکسید روی (Zn) (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	اسانس مرزه خوزستانی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	پسودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه
۲۵۶	۲۵۶	۵۱۲	۵۱۲	سویه استاندارد
۲۵۶	۲۵۶	۵۱۲	۵۱۲	جدایه بالینی ۱
۵۱۲	۲۵۶	> ۵۱۲	۵۱۲	جدایه بالینی ۲
۵۱۲	۵۱۲	> ۵۱۲	> ۵۱۲	جدایه بالینی ۳
۵۱۲	۵۱۲	> ۵۱۲	۵۱۲	جدایه بالینی ۴



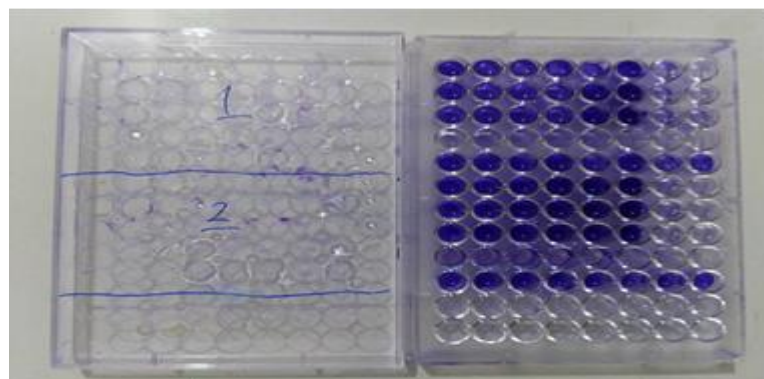
شکل ۴: نمونه‌ای از پلیت‌های مورد استفاده جهت تعیین حداقل غلظت *Pseudomonas آئروژینوزا* باکتری‌کشی اسانس مرزه خوزستانی بر علیه سویه استاندارد (A) و جدایه‌های بالینی مورد مطالعه (B)

جدول ۱۰: قطر هاله عدم رشد در غلظت MIC اسانس مرزه خوزستانی، نانوذرات اکسید روی (Zn) و ترکیب اسانس مرزه خوزستانی با نانوذرات اکسید روی (Zn) بر علیه *Pseudomonas آئروژینوزا* های تشکیل دهنده بیوفیلم مورد مطالعه

ترکیب اسانس مرزه خوزستانی با نانوذرات اکسید روی (Zn) (میلی‌متر)	نانوذرات اکسید روی (Zn) (میلی‌متر)	اسانس مرزه خوزستانی (میلی‌متر)	پسودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه
۱۰	۷/۵	۹	سویه استاندارد
۹	۷/۵	۷/۵	جدایه بالینی ۱
۷/۵	۶/۵	۶/۵	جدایه بالینی ۲
۷	۶	۶	جدایه بالینی ۳
۶	۶	۶	جدایه بالینی ۴

جدول ۱۱: درصد تشکیل بیوفیلم پَسودوموناس آئروژینوزا های مورد مطالعه در غلظت‌های متفاوت اسانس مرزه خوزستانی و نانوذرات اکسید روی (Zn) بر اساس میکروگرم بر میلی‌لیتر

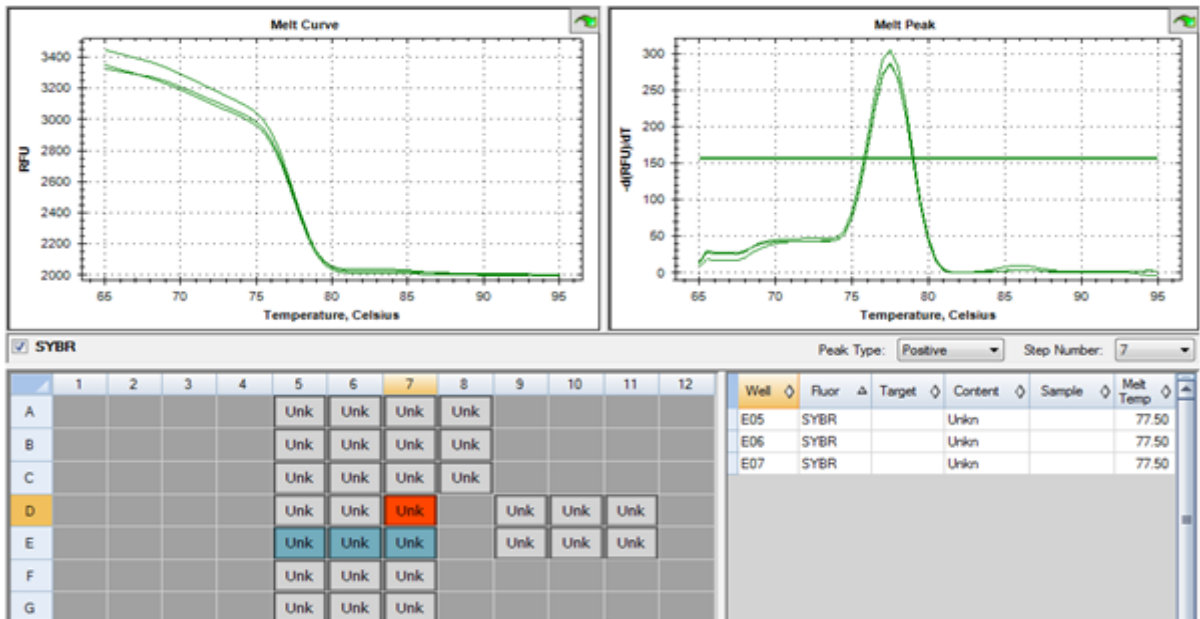
تیمار	غلظت سودومونس آئروژینوزا مورد مطالعه	کنترل منفی	۵۱۲	۲۵۶	۱۲۸	۶۴	۳۲	۱۶	۸	۴	کنترل مثبت
اسانس مرزه خوزستانی	سویه استاندارد	۰	۱۷/۳۱	۴۱/۸۶	۴۶/۰۱	۶۳/۰۷	۷۲/۴	۷۳/۰۱	۸۹/۹۸	۱۰۰	۱۰۰
	جدایه بالینی ۱	۰	۱۳/۰۸	۴۷/۱۴	۷۴/۳۵	۹۱/۸۷	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	جدایه بالینی ۲	۰	۵/۶۳	۱۴/۳۴	۶۵/۶۶	۹۸/۴۱	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	جدایه بالینی ۳	۰	۳۵/۵۴	۴۴/۹۴	۸۶/۴۳	۹۶/۱۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
نانوذرات اکسید روی (Zn)	جدایه بالینی ۴	۰	۲۳/۱۵	۵۳/۱۲	۷۴/۳	۹۷/۴۸	۹۸/۱۴	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	سویه استاندارد	۰	۲۸/۳۱	۴۹/۸۶	۷۷/۰۱	۹۳/۰۷	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	جدایه بالینی ۱	۰	۱۳/۰۸	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	جدایه بالینی ۲	۰	۵/۶۳	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	جدایه بالینی ۳	۰	۳۵/۵۴	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	جدایه بالینی ۴	۰	۴۶/۱۵	۸۵/۱۲	۹۸/۳	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰



شکل ۴: نمونه‌ای از پلیت ۹۶ خانه‌ای مورد استفاده جهت تعیین درصد تشکیل بیوفیلم پَسودوموناس آئروژینوزا های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های متفاوت تیمارهای مطالعه

جدول ۱۲: میزان بیان ژن lasR در پَسودوموناس آئروژینوزا های مورد مطالعه در غلظت MIC اسانس مرزه خوزستانی، نانوذرات اکسید روی (Zn) و ترکیب نانوذرات اکسید روی با اسانس مرزه خوزستانی

تیمارهای مطالعه	پَسودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه	سویه استاندارد	جدایه بالینی ۱	جدایه بالینی ۲	جدایه بالینی ۳	جدایه بالینی ۴
اسانس مرزه خوزستانی	RQ	۰/۷۸۳۶	۰/۴۳۵۸	۰/۸۳۴۸	۱/۰۲۴۹	۰/۰۰۰۲
	تفسیر نتیجه	کاهش بیان ژن	کاهش بیان ژن	کاهش بیان ژن	افزایش بیان ژن	کاهش بیان ژن
نانوذره روی	RQ	۱/۰۳۰۶	۰/۵۷۳۲	۱/۰۹۷۹	۰/۸۸۶۹	۰/۰۰۰۲
	تفسیر نتیجه	افزایش بیان ژن	کاهش بیان ژن	افزایش بیان ژن	کاهش بیان ژن	کاهش بیان ژن
ترکیب نانوذرات اکسید روی با اسانس مرزه خوزستانی	RQ	۱/۰۳۰۶	۰/۵۷۳۲	۱/۰۹۷۹	۰/۸۸۶۹	۰/۰۰۰۲
	تفسیر نتیجه	افزایش بیان ژن	کاهش بیان ژن	افزایش بیان ژن	کاهش بیان ژن	کاهش بیان ژن



شکل ۶: منحنی ذوب سویه استاندارد *پسودوموناس آئروژینوزا*

بحث

زخم‌های سوختگی، مسئله مهار و برخورد این باکتری با نانوذرات مطرح است. گسترش علم نانو تکنولوژی در دهه گذشته، فرصت‌هایی را برای کشف اثر ضدباکتریایی نانوذرات فلزی فراهم کرده است. اعتقاد بر این است که نانوذرات فلزی علاوه بر اثر مهاری ذره، به دلیل اندازه کوچک، نسبت سطح به حجم بالایی دارد که باعث تماس بیشتر با محیط و در نتیجه تأثیر ضد باکتریایی بیشتر خواهد شد. کارواکرول موجود در اغلب اسانس‌های روغنی دارای خاصیت ضدباکتری، می‌تواند به عنوان یک عامل بالقوه برای مهار QS باکتری‌ها به دلیل: توانایی این ماده در تعامل با غشای سلولی باکتری و گیرنده‌های پروتئینی درگیر در تشکیل بیوفیلم، عمل نماید (۱۶ و ۱۷). گیاه مرزه خوزستانی از تیره نعنائیان بوده و گیاه بومی مناطق گرم و معتدل زاگرس می‌باشد. این گیاه و ترکیبات آن موضوع تحقیق چندین محقق بوده است و فعالیت ضد

زخم‌های ناشی از سوختگی، محیط مناسبی برای رشد گونه‌های مختلف باکتریایی به شمار می‌رود. از جمله باکتری‌های مختلفی که در زخم‌های سوختگی ایجاد عفونت می‌کنند، می‌توان اعضای مختلف جنس‌های *پسودوموناس*، *استافیلوکوکوس* و *آئروباکتریاسه* را نام برد. گونه‌های جنس *پسودوموناس* دارای فاکتورهای ساختاری، آنزیم‌ها و توکسین‌هایی هستند که عامل ویرولانسی و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و گندزداها می‌باشد. افزایش روز افزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی *پسودوموناس آئروژینوزا*، مشکلات زیادی را در درمان بیماران به وجود آورده است. هم‌چنین میزان مرگ و میر ناشی از عفونت‌های سوختگی *پسودوموناس* در بیماران رو به افزایش است. به دلیل آسیب‌های و تخریب برگشت ناپذیر عفونت‌های *پسودوموناس آئروژینوزا* در

میکروبی آن نیز به اثبات رسیده است (۱۹ و ۱۸). هدف از این مطالعه تعیین و تأثیر نانوذره روی (Zn) آغشته شده به اسانس مرزه خوزستانی (Satureja khuzestanica) بر میزان بیان ژن lasR در جدایه‌های بالینی پَسودوموناس آئروژینوزا تشکیل دهنده بیوفیلم در شرایط برون تنی بود.

پَسودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب در حال گسترش است (۳۵ و ۳۴). یکی از مهم‌ترین عفونت‌های ناشی از این باکتری سپسیس زخم و بافت نرم می‌باشد (۳۶-۳۸). مقاومت آنتی‌بیوتیکی پَسودوموناس آئروژینوزا به واسطه مکانیسم‌های اکتسابی و ذاتی است که یکی از مهم‌ترین آنها، تشکیل بیوفیلم می‌باشد (۴۰ و ۳۹). تشکیل بیوفیلم، تحت تنظیم سیستم کوئوروم سنسیگ باکتری، قرار دارد (۲۰). پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که تعداد سلول‌های بیوفیلم و سلول‌های مقاوم به سوش استاندارد در حضور اسانس مرزه خوزستانی، نانوذره اکسید مس و نانو کمپلکس روی افزایش یافته است. در یک تحقیق انجام شده به وسیله خسروانی و همکاران، تأثیر این مواد بر بیان ژن آلکالین پروتئاز در سویه‌های پَسودوموناس آئروژینوزا بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده هم‌زمان از اسانس مرزه خوزستانی و نانوپلیمر قالب مولکولی - نانوذرات اکسید روی (MIP-Zn) منجر به کاهش قابل ملاحظه‌ای در حداقل میزان مهار (MIC) شده است. در این تحقیق، اثر توأمان اسانس مرزه خوزستانی و نانوپلیمر قالب مولکولی - نانوذرات اکسید روی بر غلظت‌های مهار

این مواد در مقابل پَسودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مهار کنندگی اسانس و نانوپلیمر به صورت هم‌زمان نسبت به استفاده هر یک به تنهایی به طور معنی‌داری کاهش یافته است. این کاهش در MIC، به‌ویژه در حالت ترکیب اسانس مرزه خوزستانی و نانوپلیمر قالب مولکولی - نانوذرات اکسید روی (MIP-Zn)، نشان‌دهنده افزایش اثربخشی این مواد در مقابل باکتری مذکور بوده است. نتایج پژوهش‌های اخیر نیز تأیید کرده‌اند که اسانس مرزه خوزستانی به‌عنوان یک مکمل درمانی، ممکن است در مهار ژن بیوفیلم پَسودوموناس آئروژینوزا، مؤثر باشد. این تأثیر مهارتی در حضور اسانس، با کاهش بیان ژن lasR مرتبط با بیوفیلم، به وضوح مشاهده شده است. در تحقیق دیگری انجام شده به وسیله سنگالی و همکاران، نقش بتا سیکلوهکسترین در افزایش ترشح داروهای محلول ضعیف از ماتریس‌های پلیمری ناهمگن و آب دوست بررسی شد (۲۱). بر اساس نتایج این تحقیق، بتا سیکلوهکسترین به‌عنوان یک کانال عمل عمل کرده و باعث افزایش ترشح دارو شده است. این ویژگی می‌تواند در صنعت داروسازی برای رهایش کنترل شده و بهبود خواص داروها مورد استفاده قرار گیرد. در نهایت، استفاده هم‌زمان از اسانس مرزه خوزستانی و نانوپلیمر قالب مولکولی - نانوذرات اکسید روی به‌عنوان یک راهکار مؤثر در مهار رشد و بیوفیلم باکتری‌ها، به‌ویژه پَسودوموناس آئروژینوزا، نشان داده شده است. این ترکیبات با افزایش اثرات ضد باکتریایی خود، می‌توانند به‌عنوان

داده است که ترکیب *اسانس مرزّه خوزستانی*، *نانوذرات اکسید روی (Zn)* و استفاده هم‌زمان آن‌ها علاوه بر افزایش فعالیت ضد باکتریایی، توانایی مهار بیشتری در تشکیل بیوفیلم و کاهش ژن *lasR* را ارائه می‌دهد. این نتایج اشاره دارد که این ترکیبات ممکن است به عنوان مکمل‌های مؤثر در درمان عفونت‌های باکتریایی و مهار فاکتورهای حدت باکتری مورد استفاده قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه مقطع دکتری تخصصی رشته میکروبیولوژی با کد اخلاق IR.IAU.SHIRAZ.REC.1402.015 از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه و همچنین دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، انجام شد. لذا نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات مدیر گروه میکروبیولوژی و همه کارکنان آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، پرسنل پرستاری و همکاران بخش سوختگی در بیمارستان‌های یاسوج، همچنین از زحمات بی‌دریغ مدیر آزمایشگاه دکتر عزیزی یاسوج و تمام اعضای محترم هیئت علمی دانشگاه‌های آزاد اسلامی شیراز و علوم پزشکی یاسوج که با ارائه کمک‌های ارزشمند خود، ما را در انجام این مقاله یاری نمودند، صمیمانه تشکر و تقدیر نمایند.

گزینه‌هایی مؤثر در درمان و پیشگیری از عفونت‌های باکتریایی در انواع مختلفی از محیط‌ها و سویه‌ها مورد استفاده قرار گیرند.

محدودیت‌های مطالعه فوق شامل؛ نحوه جمع‌آوری نمونه‌ها و انجام آزمایشات، تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده، نحوه گزارش‌دهی و تفسیر نتایج، تعداد نمونه‌ها و شرایط آزمایش، محیط آزمایش، انجام آزمایش، تحلیل داده‌ها و منابع مالی بودند. لذا افزایش تعداد جدایه‌های باکتریال *سودوموناس آئروژینوزا* مورد مطالعه در حین نمونه‌گیری و بررسی تأثیر تیمارهای مطالعه بر کاهش بیان سایر ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی *سودوموناس آئروژینوزا* پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

با تجزیه و تحلیل تعاملات بین ترکیب اسانس و نانوذره در مطالعه حاضر، نتیجه گرفته شد که نه تنها مقادیر *MIC* و *MBC* بهبود یافته‌اند، بلکه قطر حلقه عدم رشد نیز افزایش یافته است. به طور هم‌زمان، کاهش تشکیل بیوفیلم و مهار ژن *lasR* نیز به نحو مؤثری دیده شد. ارزیابی شاخص *FIC* نیز این تأثیر مثبت را تأیید کرد. ارتفاع مقادیر *MIC* و *MBC* برای *اسانس مرزّه خوزستانی* نسبت به *نانوذرات اکسید روی (Zn)*، همچنین کمترین میزان *ZOI*، نشانگر تأثیر قوی و مؤثرتر تیمارها بر باکتری بوده است. این تحقیق نشان

REFERENCES

1. Motbainor H, Bereded F, Mulu W. Multi-drug resistance of blood stream, urinary tract and surgical site nosocomial infections of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* among patients hospitalized at Felegehiwot referral hospital, Northwest Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases* 2020; 20(1): 92.
2. Salomoni R, Léo P, Montemor A, Rinaldi B, Rodrigues M. Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotechnology, Science and Applications* 2017; 10: 1-15.
3. Silva A, Silva V, Igrejas G, Poeta P. Carbapenems and *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and epidemiology. *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment: Elsevier*; 2020; 253-68.
4. Lund-Palau H, Turnbull AR, Bush A, Bardin E, Cameron L, Soren O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Review of Respiratory Medicine* 2016; 10(6): 685-97.
5. Alhussain FA, Yenugadhati N, Al Eidan FA, Al Johani S, Badri M. Risk factors, antimicrobial susceptibility pattern and patient outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* infection: A matched case-control study. *Journal of Infection and Public Health* 2021; 14(1): 152-7.
6. Torres M, Gómez S, Galindo R, Vargas J. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection of central venous catheter in a patient with kidney disease receiving hemodialysis treatment: a case report and literature review. *J Clin Case Rep* 2018; 8(1153): 2.
7. Kumar R, Chhibber S, Gupta V, Harjai K. Screening & profiling of quorum sensing signal molecules in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from catheterized urinary tract infection patients. *The Indian Journal of Medical Research* 2011; 134(2): 208.
8. Senturk S, Ulusoy S, Bosgelmez-Tinaz G, Yagci A. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infections. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2012; 6(06): 501-7.
9. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease* 2013; 67(3): 159-73.
10. Tapia-Rodriguez MR, Hernandez-Mendoza A, Gonzalez-Aguilar GA, Martinez-Tellez MA, Martins CM, Ayala-Zavala JF. Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. *Food Control* 2017; 75: 255-61.
11. Burt SA, Ojo-Fakunle VT, Woertman J, Veldhuizen EJ. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One* 2014; 9(4): e93414.
12. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 94(3): 223-53.
13. Esmaeili D. The Study of Inhibition Effects *Satureja khuzestanica* Essence against Gene Expression of *Acinetobacter baumannii* with Real time PCR Technique. *Iran J Med Microbiol* 2015; 9(1): 313.
14. Agarwal H, Menon S, Kumar SV, Rajeshkumar S. Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route. *Chemico-biological Interactions* 2018; 286: 60-70.
15. Fouda A, Saad E, Salem SS, Shaheen TI. In-Vitro cytotoxicity, antibacterial, and UV protection properties of the biosynthesized Zinc oxide nanoparticles for medical textile applications. *Microbial Pathogenesis* 2018; 125: 252-61.
16. 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; 11(2): 263.
17. Seil JT, Webster TJ. Antibacterial effect of zinc oxide nanoparticles combined with ultrasound. *Nanotechnology* 2012; 23(49): 495101.
18. Biavatti MW. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 45(3): 371-8.
19. Humphries R, Bobenchik AM, Hindler JA, Schuetz AN. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100. *Journal of Clinical Microbiology* 2021; 59(12): 10.1128.
20. Gales AC, Reis AO, Jones RN. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(1): 183-90.
21. Marambio-Jones C, Hoek EM. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research* 2010; 12(5): 1531-51.
22. Arends SR, Butler D, Scangarella-Oman N, Castanheira M, Mendes R. Intermethod comparability analyses of gepotidacin antimicrobial susceptibility tests using a large collection of globally collected

- Escherichia coli* and *Staphylococcus saprophyticus* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2024; 116181.
23. Mirzaei F, Salouti M, Shapouri R, Heidari Z. Antimicrobial effect of plant peptide MBP-1 and silver nanoparticles, along with their synergistic effect on skin infection due to *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro and animal model. *Pajoochandeh Journal* 2013; 18(2): 64-8.
24. Xuan G, Lv C, Xu H, Li K, Liu H, Xia Y, Xun L. Sulfane sulfur regulates LasR-mediated quorum sensing and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antioxidants* 2021; 10(9): 1498.
25. Benkova M, Soukup O, Marek J. Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of Applied Microbiology* 2020; 129(4): 806-22.
26. Burton E, Yakandawala N, LoVetri K, Madhyastha M. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2007; 34(1): 1-4.
27. Colagiorgi A, Festa R, Di Ciccio PA, Gogliettino M, Balestrieri M, Palmieri G, et al. Rapid biofilm eradication of the antimicrobial peptide 1018-K6 against *Staphylococcus aureus*: A new potential tool to fight bacterial biofilms. *Food Control* 2020; 107: 106815.
28. Mohammadzadeh Moghaddam M, Elhamirad A, Shariatifar N, Saidee Asl M, Armin M. Antibacterial effects of essential oil of *Cardaria draba* against bacterial food borne pathogens. *The Horizon of Medical Sciences* 2014; 19(5): 9-16.
29. Dadgar M, Bafroee T, Sadat A, Minaeian S. The effect of antibacterial synergism of silver nanoparticles with extract of *Urtica dioica* and *Allium hirtifolium* against multidrug resistant *Klebsiella* (MDR) isolated from ICU patients. *Medical Science Journal of Islamic Azad University-Tehran Medical Branch* 2019; 29(2): 131-40.
30. Oroojalian F, Orafaee H, Azizi M. Synergistic antibacterial activity of medicinal plants essential oils with biogenic silver nanoparticles. *Nanomedicine Journal* 2017; 4(4): 237-44.
31. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(6): 3128.
32. Rothenburger S, Spangler D, Bhende S, Burkley D. In vitro antimicrobial evaluation of Coated VICRYL* Plus Antibacterial Suture (coated polyglactin 910 with triclosan) using zone of inhibition assays. *Surgical Infections* 2002; 3(S1): s79-s87.
32. Bahador A, Saghii H, Ataee R, Esmaeili D. The study of inhibition effects *Satureja khuzestanica* essence against gene expression *Bacillus acinetobacter baumannii* with real time PCR technique. *Iranian Journal of Medical Microbiology* 2015; 9(1): 42-9.
34. Henriot CP, Martak D, Genet S, Bornette G, Hocquet D. Origin, fluxes, and reservoirs of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* in aquatic ecosystems of a French floodplain. *Science of The Total Environment* 2022; 834: 155353.
35. Rezzoagli C, Granato ET, Kümmerli R. Harnessing bacterial interactions to manage infections: a review on the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* as a case example. *Journal of Medical Microbiology* 2020; 69(2): 147.
36. Bobrov AG, Getnet D, Swierczewski B, Jacobs A, Medina-Rojas M, Tyner S, et al. Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and therapeutics in military-relevant animal infection models. *Apmis* 2022; 130(7): 436-57.
37. Garcia-Clemente M, de la Rosa D, Máiz L, Girón R, Blanco M, Oliveira C, et al. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* infection on patients with chronic inflammatory airway diseases. *Journal of Clinical Medicine* 2020; 9(12): 3800.
38. Parkins MD, Somayaji R, Waters VJ. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2018; 31(4): e00019-18.
39. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates* 2019; 44: 100640.
40. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T-J, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances* 2019; 37(1): 177-92.
41. Vuotto C, Longo F, Donelli G. Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *International Journal of Oral Science* 2014; 6(4): 189-94.

The Effect of Molecular Template Nanopolymer-zinc oxide(Zn) Nanoparticles Impregnated with Khuzestani Essential Oil on *lasR* Gene Expression in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a laboratory study

Azizi M¹, Bahadur N^{1*}, Sharifi A²

1Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran 2Cell and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

Received: 23 Jul 2023 Accepted: 10 Des 2023

Abstract

Background & aim: In the present study, as a research background, the application of nanoparticles and herbal medicines in the treatment of diseases caused by *Pseudomonas aeruginosa* was investigated. The aim of this study was to determine the effect of zinc nanoparticles (Zn) impregnated with Khuzestan savory (*Satureja khuzestanica*) essential oil on the expression of *lasR* gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, which are biofilm-forming bacteria, under extracellular conditions.

Methods: The present experimental study was conducted in 2019 on 150 non-repetitive and intermittent clinical samples suspected of *Pseudomonas aeruginosa*, which were collected from skin, blood, and urine samples of hospitalized patients in various wards of Imam Sajjad (AS) Hospital in Yasuj city. After the entry of 4 clinical strains along with a standard strain of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25922) as a sample, Khuzestan savory essential oil was prepared from Barij Essence Pharmaceutical Company (Kashan, Iran). Then, after identifying the *Pseudomonas aeruginosa* sample separated from the patients, PCR was performed to confirm the presence of *lasR* and DNA gyrase A genes, determine the antibiotic sensitivity pattern, broth microdilution test, checkerboard dilution, and agar test to determine the minimum inhibitory concentration, and real-time PCR to investigate the expression of *lasR* gene under laboratory conditions. The collected data were analyzed using Mann-Whitney U, T-Test, and Paired T-Test statistical tests.

Results: According to the results of the antibiotic sensitivity pattern, the highest resistance was related to amikacin (30 µg), colistin (10 µg), and ciprofloxacin (5 µg), and the lowest resistance was related to ceftazidime (30 µg) and imipenem (10 µg). Also, Khuzestan savory essential oil and zinc oxide nanoparticles had a minimum inhibitory concentration of 256-512 µg/mL against standard strains and clinical isolates. The relative minimum inhibitory concentration index (FIC) was equal to 1, which represents an increase in effect. Also, the minimum bactericidal concentration (MBC) was four times the minimum inhibitory concentration (MIC). The highest MIC was related to zinc oxide nanoparticles and the lowest was related to the simultaneous use of essential oil and nanoparticles. In the combined mode of treatments, half the MIC of separate treatments was required. Also, with the reduction of the effect m.

Conclusion: The results indicated that clinical strains were highly resistant to some antibiotics but sensitive to others. Also, Khuzestan savory essential oil and zinc oxide nanoparticles were effective against standard strains and clinical isolates. The main component of this essential oil was carvacrol, which has antimicrobial properties. The results showed that the combination of essential oil and nanoparticles led to a stronger and more effective reduction in *lasR* gene expression. The study concluded that the combination of Khuzestan savory essential oil and zinc oxide nanoparticles is a promising complementary and alternative therapeutic approach for the treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Silver nanoparticles, Khuzestan thyme essential oil, *LasR*, Biofilm

*Corresponding author: Bahadur N, Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

Email: bahador@iaushiraz.ac.ir

Please cite this article as follows: Azizi M, Bahadur N, Sharifi A. The Effect of Molecular Template Nanopolymer-zinc oxide(Zn) Nanoparticles Impregnated with Khuzestani Essential Oil on *lasR* Gene Expression in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a laboratory study Armaghane-danesh 2024; 28(6): 775-794.