

Comparative study of the effects of biologically synthesized copper and zinc oxide quantum nanodots on biofilm-forming genes in *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* bacteria

Yasman Elsadat Nabipour¹, Ardeshtir Hesampour¹, Salman Ahmady Asbchin², Maryam Tajabadi¹, Arman Rostamzad³

¹ Department of Biology, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Microbiology, Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

³ Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Ilam, Ilam, Iran

Abstract

Background: In the current context, the rise of multidrug-resistant (MDR) pathogenic bacteria has become a major threat to the healthcare sector. Biofilm formation is a key factor in the emergence of MDR bacterial infections. The present study aimed to investigate the effects of copper quantum dots (CuQDs) and green-synthesized zinc oxide quantum dots (ZnOQDs) on the expression of biofilm-related genes in *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*.

Materials and methods: This study was designed to compare the effects of ZnOQDs and CuQDs—semiconducting nanoparticles smaller than 10 nm—on drug-resistant Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria. Acorn fruit extract was used as a reducing and stabilizing agent in the green hydrothermal synthesis of the quantum dots. The minimum inhibitory concentration (MIC) for both types of QDs was determined. Subsequently, the expression levels of biofilm-associated genes in *S. aureus* and *K. pneumoniae* were assessed using real-time PCR analysis.

Results: The findings demonstrated that at sub-MIC concentrations—100 µg/mL for ZnOQDs and 200 µg/mL for CuQDs—the expression levels of biofilm-related genes *icaA*, *icaD*, and *icaR* in *S. aureus*, and *wzm* in *K. pneumoniae*, were significantly downregulated compared to the reference gene 16S rRNA.

Conclusion: It is concluded that CuQDs and ZnOQDs could be effective on the expression of biofilm-related genes in *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: Quantum dots, Gene expression, Pathogen, Biofilm.

Cited as: Nabipour YE, Hesampour A, Ahmadi S, Tajabadi M, Rostamzad A. Comparative study of the effects of biologically synthesized copper and zinc oxide quantum nanodots on biofilm-forming genes in *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* bacteria. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2026; 36(2): 189-199.

Correspondence to: Ardeshtir Hesampour

Tel: +98 9123017118

E-mail: Ardeshtir.hesampour@iau.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-7324-5469

Received: 29 Apr 2025; **Accepted:** 8 Oct 2025

بررسی مقایسه‌ای اثرات نانو نقاط کوانتومی مس و اکسید روی سنتز شده به روش زیستی بر ژن‌های ایجاد کننده بیوفیلیم در باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه و استافیلوکوکوس اورئوس

یاسمن السادات نبی پور^۱، اردشیر حسام پور^۱، سلمان احمدی اسبچین^۲، مریم تاج آبادی^۱، آرمان رستم زاد^۳

^۱ گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران

^۳ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

چکیده

سابقه و هدف: در شرایط کنونی، افزایش باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به چند دارو (MDR) به یکی از تهدیدهای مهم برای بخش مراقبت‌های بهداشتی تبدیل شده است. بیوفیلیم یکی از عوامل حیاتی برای ظهور عفونت‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو است. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات نقاط کوانتومی مس و نقاط کوانتومی اکسید روی سنتز شده به روش سبز بر ژن تولید بیوفیلیم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه بود.

روش بررسی: این مطالعه به منظور مقایسه اثر نقاط کوانتومی (نیمه هادی‌های کوچک و با اندازه زیر ۱۰ نانومتر) اکسید روی و مس بر باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی مقاوم به دارو طراحی شد. میوه بلوط برای سنتز سبز نقاط کوانتومی به روش هیدروترمال استفاده شد. مقدار MIC برای نقاط کوانتومی اکسید روی و مس تعیین شد. سپس سطح بیان ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلیم در استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه با استفاده از ارزیابی‌های ریل تایم PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در غلظت sub-MIC نقاط کوانتومی اکسید روی (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و نقاط کوانتومی مس (۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، میزان بیان ژن‌های تولید کننده بیوفیلیم $ica(A,D,R)$ در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و Wzm در باکتری کلبسیلا پنومونیه نسبت به ژن مرجع $rRNA\ 16S$ کاهش معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: از یافته‌های این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که نقاط کوانتومی اکسید روی و مس می‌توانند در کنترل بیان ژن‌های $ica(A,D,R)$ در استافیلوکوکوس اورئوس و نیز wzm در کلبسیلا پنومونیه و به عنوان عوامل ضد بیوفیلیم مفید باشند.

واژگان کلیدی: نقاط کوانتومی، بیان ژن، پاتوژن، بیوفیلیم.

مقدمه

مقاومت ضد میکروبی (Antimicrobial resistance) (AMR) به عنوان یکی از مهم‌ترین تهدیدات جهانی بهداشت عمومی قرن بیست و یکم ظاهر شده است (۱) زندگی و سلامت انسان به

دلیل افزایش مقاومت ضد میکروبی در خطر است. نیاز مبرمی به توسعه ترکیبات ضد باکتریایی جدید برای مبارزه با میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی بیوتیک وجود دارد. برای دستیابی به این هدف، نقاط کوانتومی در نظر گرفته شده است. یک ویژگی اساسی نقاط کوانتومی (QDs) فعالیت ضد میکروبی آنها است. برخلاف آنتی‌بیوتیک‌های سنتی، QD ها نه تنها پایداری ساختاری قوی دارند، بلکه دارای ثبات ساختاری نیز هستند (۱). اثربخشی نقاط کوانتومی در مقایسه با روش‌های آنتی‌بیوتیک معمولی، با حساسیت کمتر به ایجاد مقاومت و

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، گروه زیست شناسی، اردشیر

حسام پور (email: Ardeshir.hesampour@iau.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0002-7324-5469

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۲/۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۷/۱۶

شامل سویه‌های فرصت‌طلب است که اغلب با عفونت‌های بیمارستانی مرتبط هستند، سویه‌های هایپر ویروالنت به‌عنوان باکتری‌های اکتسابی جامعه در نظر گرفته می‌شوند که می‌توانند افراد در تمام سنین، از جمله افراد سالم را آلوده کنند (۱۰).

یک ویژگی مهم بیماری‌زای مورد استفاده توسط کلبسیلا پنومونیه توانایی آن برای تشکیل بیوفیلم‌ها است. تشکیل بیوفیلم منجر به افزایش مقاومت در برابر عوامل استرس‌زای اگزوزن و عوامل ضد میکروبی می‌شود (۱۱).

باکتری‌های با بیوفیلم قوی، نمونه‌های ساختارهای پایدار و پیچیده‌تری تشکیل می‌دهند که شبیه به شرایط واقعی طبیعت یا بالینی است. در باکتری‌های قوی، بیان ژن‌های مرتبط با بیوفیلم (مانند ژن‌های تولید بیوفیلم Wzm و ica (A,D,R) معمولاً بالاتر و قابل تشخیص است؛ به همین دلیل در این پژوهش از سویه‌های دارای بیوفیلم قوی استفاده شد.

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر نقاط کوانتومی مس و اکسید روی بر میزان بیان ژن‌های موثر در تولید بیوفیلم شامل ica(A,D,R) و Wzm بود که در ایجاد بیوفیلم در سویه‌های مقاوم به داروی استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه موثرند. در مطالعه حاضر اثرات ضد میکروبی نقاط کوانتومی سنتز شده از منابع گیاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

تمام مراحل انجام پروژه طبق موازین کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد و کد اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی به شناسه IR.ILAM.REC.1401.008 از کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه ایلام اخذ گردید.

سویه‌های باکتریایی، مواد شیمیایی و شرایط رشد

باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه شامل ایزوله /استافیلوکوکوس اورئوس (تعداد=۴۶) و ایزوله کلبسیلا پنومونیه (تعداد=۳۴) از بیمارستان رازی مربوط به عفونت زخم دیابتی، زخم سوختگی و زخم جراحی بین خرداد ۱۴۰۲ تا آذر ۱۴۰۳ جمع آوری شد. نمونه‌ها با تست‌های معمول بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی مانند کاتالاز، ایندول، سیترات بررسی شدند. علاوه بر این کلبسیلا پنومونیه (NCTC 5056)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 29213)، به عنوان سویه استاندارد در این مطالعه استفاده شدند.

سنتز نقاط کوانتومی و شناسایی MIC و sub-MIC

باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه

سنتز نقاط کوانتومی کربن

عملکرد وسیع الطیف قابل توجه است. پایداری و دوام QD ها فعالیت پایدار بیوفیلم را حتی در شرایط محیطی چالش برانگیز تضمین می‌کند. این بررسی جامع به سنتز، خواص و کاربردهای نقاط کوانتومی (QD)، که به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌پردازد و پیشرفت‌های پیشگامانه‌ای را به نمایش می‌گذارد که این نانومواد را در خط مقدم تحقیقات و نوآوری‌های پیشرفته قرار می‌دهد. این نانومواد مکانیسم‌های چندوجهی را نشان می‌دهند، دیواره‌های سلولی و غشاهای را مختل می‌کنند، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید می‌کنند و به مواد هسته‌ای متصل می‌شوند و به طور موثری از تکثیر میکروبی جلوگیری می‌کنند. از این پس، این بررسی با هدف بررسی QD ها به عنوان عوامل بالقوه برای مهار بیوفیلم‌های میکروبی بیماری‌زا و برجسته کردن پتانسیل امیدوارکننده آینده آنها است (۲). سنتز نقاط کوانتومی کربنی از پیش‌سازهای طبیعی، رویکردی نوآورانه و پایدار در فناوری نانو است. پیش‌سازهای طبیعی منبع غنی از کربن را ارائه می‌دهند که به دلیل آن، برای سنتز نقاط کوانتومی کربنی با حداقل تاثیر زیست‌محیطی ایده‌آل هستند و به دلیل سمیت کم یا حداقل مواد اولیه، پتانسیل بالایی برای کاربردهای زیست‌پزشکی و زیست‌محیطی دارند (۳).

علت انتخاب میوه بلوط در این تحقیق این است که مواد خام پایدار یا زیست توده سبز یکی از منابع ایده آل برای ساخت نقاط کربنی است؛ زیرا سازگار با محیط زیست و ارزان بوده و مهم‌تر از همه به حداقل رساندن تولید زباله کمک می‌کند (۴،۵).

سازمان بهداشت جهانی استافیلوکوکوس اورئوس را به عنوان یک پاتوژن با اولویت بالا در نظر می‌گیرد که باید درمان‌های جدیدی برای آن ایجاد شود. این بررسی رویکردهای درمانی جدید و نانوسیستم‌ها به عنوان ابزاری برای درمان عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس ارائه می‌کند (۶).

نقش بیماری‌زا بودن لایه پلی ساکاریدی بیوفیلم در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بسیار مهم است، به طوری که در سال ۲۰۰۷ کمیته کنترل کننده سلامت و وابسته به سازمان (HICPAC) بهداشت جهانی، طی یک دستورالعمل خاص، روش -های مقابله با این عوامل بیماری‌زا، از جمله بیوفیلم را ارائه داد (۷). حضور این لایه توسط گروه خاصی از اوپرون‌های ساختاری به نام اوپرون‌های داخل سلولی یا Intracellular Adhesin (ICA) (ICA) کد می‌شود که دارای لوکوس‌های ژنی مختلف شامل icaD، icaA و icaR است (۸).

سویه‌های کلبسیلا پنومونیه معمولاً به عنوان فرصت‌طلب، هایپروویروالنت (hyKp) یا مقاوم به چند دارو (MDR) طبقه‌بندی می‌شوند (۹). در حالی که کلبسیلا پنومونیه کلاسیک (cKp)

ساعت در این شرایط هم زده شد. pH مخلوط قبل از افزودن سدیم هیدروکسید در حدود ۳ بوده و کاملاً اسیدی بود، اما با افزودن تدریجی سدیم هیدروکسید قلیایی شد. در این مرحله کم کم رنگ مخلوط تغییر کرد و از آبی به سبز و سبز تیره و در نهایت به رنگ قهوه ای تیره تغییر یافت. رنگ قهوه‌ای تیره نشان از تشکیل نقاط کوانتومی اکسید مس است. پس از مدت ۲ ساعت ذرات بسیار ریز قهوه‌ای رنگ به دست آمد و سپس محلول به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. این عمل دو بار تکرار شد تا تمام ناخالصی‌ها از بین بروند. نانوذرات سنتز شده در آون به مدت ۲۴ ساعت و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای آنالیزهای بعدی خشک شد.

سنجش پایداری ذرات کوانتومی

آنالیز طیف سنجی مرئی فرابنفش

جهت تأیید ساختار نقاط کوانتومی سنتز شده، بعد از گذشت ۱۲۰ دقیقه از زمان واکنش و تغییر رنگ واکنش، آنالیز طیف سنجی مرئی فرابنفش نقاط کوانتومی با استفاده از دستگاه طیف سنجی UV-Vis 200 (Agilent, USA) تا ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

میکروسکوپ الکترونی گذاره

به منظور ریخت شناسی و تأیید اندازه نقاط کوانتومی، عکس برداری از نقاط کوانتومی سنتز شده توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی TEM (Zeiss-EM10C) انجام شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و بازدارندگی (MIC و MBC)

مقادیر MIC و MBC از طریق تکنیک Microdilution Broth مطابق دستورالعمل CLSI اندازه گیری گردید (۱۲). به این ترتیب که در ابتدا سویه‌های باکتریایی هر کدام به طور جداگانه در محیط کشت MHB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوادهی ۱۲۰ rpm کشت داده شدند. در مرحله بعد، ۵۰ میکرولیتر رقت‌های سریالی جداگانه از نانوذرات اکسید روی، مس در محیط کشت MHB با رقت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ ($\mu\text{g/ml}$) در میکروپلیت ۹۶ چاهی اضافه شد؛ سپس ۵ میکرولیتر سوسپانسیونی با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند به چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. یک چاهک حاوی محیط کشت و سویه باکتری مورد نظر بدون نانو پارسیکل به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از گرم‌گذاری میزان MIC و sub-MIC برای هر سویه باکتریایی به عنوان کمترین غلظتی که هیچ رشدی در آن مشاهده نگردید تعیین شد.

از میوه بلوط برای سنتز سبز نقاط کوانتومی اکسید روی و مس به روش هیدروترمال استفاده شد که برای اولین بار در این خصوص مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا میوه بلوط با آب دیونیزه و استون شستشو داده شد و در دمای محیط خشک و به وسیله آسیاب کاملاً پودر شد. پس از بهینه سازی، ابتدا ۵ گرم از نمونه پودر شده را به ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه روی استیرر تحت هم‌زدن شدید، تا حد جوش حرارت داده شد. محلول به دست آمده، توسط سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ rpm (دور در دقیقه) به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شد. پس از سانتریفیوژ، دو فاز تشکیل شد که برای حذف ذرات درشت از فاز رویی با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱، عملیات فیلتراسیون انجام شد. سپس ۲ ml از محلول به دست آمده در اتاقک TLC - UV قرار داده شد و تشکیل ذرات کوانتومی به وسیله بازتاب نور فلورسنت سبز تأیید شد. بقیه محلول به دست آمده در اتوکلاو به مدت ۵ ساعت در دمای ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و پس از اینکه در دمای اتاق خنک شد، ذرات سوسپانسیون زرد رنگ به دست آمده و به وسیله آون به مدت ۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شده و به پودر کریستالی قهوه ای رنگ تبدیل شد و پس از اینکه در دمای اتاق خنک شد، برای آزمایشات بعدی در دمای ۴ درجه سانتی-گراد نگهداری شد.

سنتز نانو نقاط کوانتومی اکسید روی

برای سنتز نقاط کوانتومی اکسید روی با خلوص بالا ابتدا ۱۵۰ میلی لیتر از محلول مایع نیترات روی (۱/۵ میلی مولار) به ۲۰ میلی لیتر از محلول میوه بلوط (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه شد و سپس با ۱۰ میلی لیتر سدیم هیدروکسید (۱ مولار) تیمار شد. ترکیب حاصل در تاریکی و بر روی استیرر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت، کلونید سفید رنگ که نشان دهنده ظهور نقاط کوانتومی اکسید روی است مشاهده شد. محلول حاصل برای خالص سازی بیشتر به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و سپس در آون به مدت ۲ ساعت در ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد.

سنتز نقاط کوانتومی مس

ابتدا به ۲۰ میلی لیتر محلول (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) به دست آمده از میوه بلوط، ۲۰ میلی لیتر از محلول سولفات مس (۰/۱۰ مولار) تازه تهیه شده در حالی که روی استیرر به طور دائم هم زده می‌شد اضافه شد و مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. در ادامه به مخلوط فوق سدیم هیدروکسید (۱ مولار) به صورت قطره قطره اضافه شد تا pH مخلوط به ۱۲ رسید و مخلوط به مدت ۲

تشخیص تولید بیوفیلیم و فعالیت ضد بیوفیلیم نقاط کوانتومی

تشکیل بیوفیلیم با استفاده از روش میکروتیتر پلیت پروتکل Lee و همکارانش ارزیابی می‌شود که در آن اندازه‌گیری جذب نوری انجام می‌شود. آزمون میکروتیتر پلیت در سه تکرار انجام شد و به اندازه سه چاهک برای هر سویه محاسبه شد (۱۳).

سنجش میزان تشکیل بیوفیلیم

وضعیت تشکیل بیوفیلیم در چاهک‌ها نیز طبق فرمول زیر محاسبه شد که در آن میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل و OD میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار است (۱۴).

باکتری‌ها براساس توانایی تشکیل بیوفیلیم تقسیم شدند و چهار گروه برای طبقه‌بندی نتایج در نظر گرفته شدند:

عدم تولید بیوفیلیم = $OD \leq ODC$

تولیدکننده بیوفیلیم ضعیف = $ODc < OD \leq 2ODc$

تولیدکننده بیوفیلیم متوسط = $2ODc < OD \leq 4ODc$

تولیدکننده بیوفیلیم قوی = $4ODc < OD$

استخراج توتال RNA

در پژوهش حاضر استخراج RNA از باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه و استافیلوکوکوس/اورئوس به منظور بررسی بیان ژن‌های Wzm و Ica (A,D,R) پس از تیمار با غلظت sub MIC نانو نقاط کوانتومی فلزی صورت گرفت. استخراج RNA توسط دستورالعمل تهیه شده از شرکت کیاژن انجام گرفت. به طور خلاصه، کلنی منفرد از هر یک انتخاب شد و در ۵ میلی لیتر برات LB تلقیح شد و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۲۴ ساعت انکوباسیون شد. صد میکرولیتر از کشت‌های مایع به ۱۰ میلی لیتر برات LB تازه تلقیح شد و تا فاز نمایش میانی (چگالی نوری تقریباً ۰/۵ در ۶۰۰ نانومتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر ۱۸۵ دور در دقیقه رشد کرد. در آخر توتال RNA با

استفاده از کیت استخراج شد (۱۵).

در مرحله بعد سنتز cDNA توسط کیت تجاری تاکارا ژاپن kits (reagent RTTM Script Prime Takara) صورت گرفت. به این منظور میزان ۵۰۰ نانوگرم از RNA کل استخراج شده در مرحله قبل برداشته و سنتز cDNA با استفاده از دستورالعمل کیت انجام گرفت.

بررسی بیان ژن تولیدکننده بیوفیلیم با روش Real Time PCR

در این پژوهش برای انجام تست RealTime PCR از SYBER green Biosystem (Applied، انگلستان) استفاده شد. طراحی پرایمرهای این تحقیق با نرم افزارهای Primer Express و Runner Gene انجام گرفت. سپس به منظور تایید پرایمرها، با استفاده از توالی‌های موجود در بانک‌های ژنی و ابزار آنلاین BLAST، صحت پرایمرها انجام شد. در این پژوهش تفاوت بیان ژن‌های هدف، بین نمونه‌های کنترل و تیمار شده با روش آماری Tukey's HSD post hoc- test محاسبه شد.

سطح بیان ژن‌های Wzm و Ica (A,D,R) به عنوان نسبت بیان ژن بین ژن هدف و ژن مرجع با کمی سازی نسبی اندازه‌گیری شد. در جدول ۱ توالی جفت پرایمرهای فوروارد و ریورز ژن‌های Wzm و Ica (A,D,R) مشخص شده است.

استخراج RNA توسط دستورالعمل انجام گرفت. غلظت RNA مورد استفاده حدود ۱ تا ۲ میکروگرم در نظر گرفته شد. برای این منظور، جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. هم چنین جذب نوری در طول موج ۲۸۰ برای اطمینان از عدم آلودگی پروتئینی و جذب نوری در ۲۳۰ نانومتر برای اطمینان از عدم طول موج آلودگی نمک و سایر مواد آلی سنجیده شد که برای RNA این نسبت جذب برابر با ۲ قبول بود.

جدول ۱. توالی پرایمرهای الیگونوکلوئیدی استفاده شده برای RealTime PCR

ژن	توالی پرایمر (5' - 3')	اندازه آمپلیکون (bp)
Ica R	F TACTGTCTCAATAATCCCGAA R GGTACGATGGTACTACACTTGATG	453
Ica A	F TCTCCCCCTTATTCAATTTCT R CGATACAATACATCCAAATACTC	1411
Ica D	F CAGACAGAGGCAATATCCAAC R ACAAACAACTCATCCATCCG	225
Wzm	F TGCCAGTTCGGCCACTAAC R GACAACAATAACCGGGATGG	148
16srRNA	F GCCCTCAAGTTCGATTTCGC R ATGGAAGATCAGTGGCGTGG	99

اورئوس در جدول ۲ و توانایی تولید بیوفیلیم در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه در جدول ۳ مشخص شده است.

جدول ۲. توانایی تولید بیوفیلیم در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس. ت

نمونه	ضعیف	متوسط	قوی	جمع
زخم دیابتی	۳* (۳۱)	۶ (۲۴)	۵ (۴۵)	۱۶
زخم سوختگی	۱ (۲۴)	۵ (۴۱)	۳ (۳۵)	۱۳
زخم جراحی	۱ (۲۱)	۴ (۳۷)	۳ (۳۲)	۱۴

*تعداد (درصد)

جدول ۳. توانایی تولید بیوفیلیم در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه

نمونه	ضعیف	متوسط	قوی	جمع
زخم دیابتی	۲* (۱۹)	۷ (۳۴)	۶ (۴۷)	۱۵
زخم سوختگی	۳ (۲۱)	۳ (۴۳)	۴ (۳۶)	۱۰
زخم جراحی	۲ (۲۵)	۵ (۳۷)	۷ (۳۸)	۱۴

*تعداد (درصد)

تعیین MIC و sub-MIC نقاط کوانتومی اکسید روی

و مس به روش میکرودايلوشن

از هر سویه باکتری شش ایزوله که بیوفیلیم‌های قوی تشکیل دادند، برای مطالعه انتخاب شدند. نتایج روش میکرودايلوشن نشان داد که MIC نقاط کوانتومی مس ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و نقاط کوانتومی اکسید روی ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر درش جدایه تشکیل دهنده بیوفیلیم بود. همچنین از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (sub-MIC) نقاط کوانتومی مس و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (sub-MIC) نقاط کوانتومی اکسید روی برای ارزیابی فعالیت ضد بیوفیلیمی استفاده شد.

فعالیت ضد بیوفیلیمی نقاط کوانتومی اکسید روی و

مس در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه مولد بیوفیلیم

فعالیت‌های ضد بیوفیلیم ذرات کوانتومی در برابر ۶ ایزوله از هر باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت، به طوری که آنها قادر به مهار رشد بیوفیلیم باکتری‌ها در غلظت‌های بیشتر از ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نقاط کوانتومی اکسید روی و همچنین مهار رشد بیوفیلیم باکتری‌ها در غلظت‌های بیش از ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نقاط کوانتومی مس شدند. در نتیجه، تمام جدایه‌ها توسط نقاط کوانتومی اکسید روی و مس در سطح OD (۰/۲۲) مهار شدند. سویه‌های مرجع استافیلوکوکوس اورئوس و کلبسیلا پنومونیه به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بر اساس اطلاعات نمودارهای ۱ و ۲ بیشترین میزان مهار تشکیل

بر طبق دستورالعمل، مسترمیکس، پرایمرها و cDNA سنتز شده در حجم مناسبی مخلوط شده و توسط دستگاه Bioneerexicycler 96 Real-time PCR واکنش انجام شد. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر و شامل ۲ میکرولیتر cDNA, 10 پیکومول از پرایمرهای جلوبر و برگشتی برای ژن‌های Wzm و ica (A,D,R)، ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس Bioneer و ۱۱ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل بود. چرخه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی ذوب (Melting Curve) به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. برای هر نمونه، واکنش دو مرتبه انجام گرفت و میانگین مقادیر به دست آمده به عنوان مقدار (کمیت) بیان ژن برای آن نمونه در نظر گرفته شد.

تحلیل آماری

تحلیل و آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (بسته نرم افزاری SPPSS Inc. برای ویندوز نسخه ۱۸) انجام شد. مقایسه نتایج با استفاده از آنالیز واریانس (one-way ANOVA) یک طرفه با میزان احتمال کمتر از ۰/۰۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

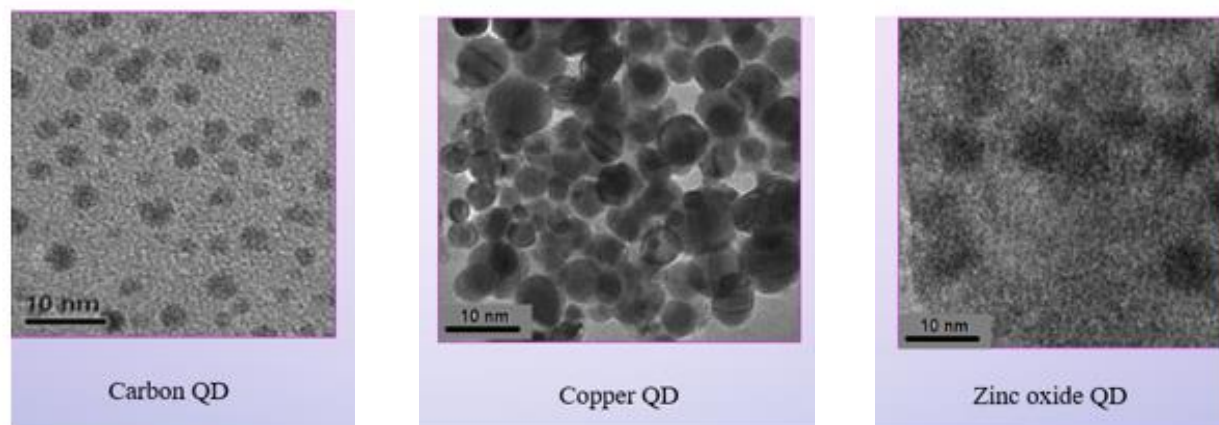
نتایج حاصل از سنتز نانو نقاط کوانتومی

سنتز نقاط کربنی و نقاط کوانتومی‌های مس و اکسید روی به صورت پراکنده و کروی با اندازه متوسط کمتر از ۱۰ نانومتر در تصویر TME توسط آزمایشگاه فناوری نانو دانشگاه صنعتی شریف مورد تایید قرار گرفت.

تصاویر TME مربوط به سنتز نانوقطرات کوانتومی

تشخیص تولید بیوفیلیم

در مجموع ۴۳ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس و ۳۹ ایزوله کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). از بین جدایه‌های دارای بیوفیلیم قوی ۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس و ۶ جدایه کلبسیلا پنومونیه (به طور رندوم ۲ جدایه قوی در تولید بیوفیلیم از نمونه هر نوع زخم)، برای مطالعه بیان ژن بیوفیلیم تحت تاثیر نقاط کوانتومی انتخاب شدند. جدایه‌هایی که توانایی تولید بیوفیلیم متوسط و ضعیفی داشتند، در این مطالعه حذف شدند. توانایی تولید بیوفیلیم در جدایه‌های استافیلوکوکوس



شکل ۱. تصاویر TME مربوط به سنتز نانوقط کوانتومی

اثر sub-MIC نقاط کوانتومی اکسید روی و مس بر بیان ژن‌های تولیدکننده بیوفیلم

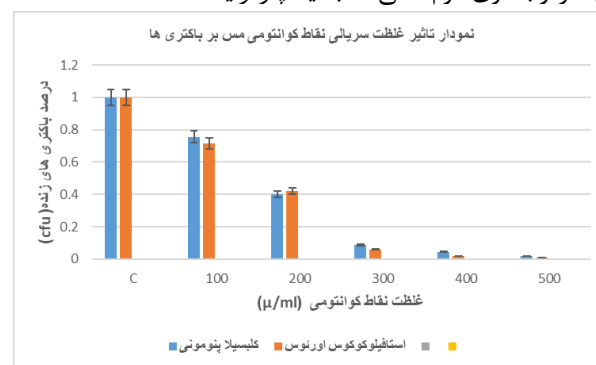
جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلبسیلا پنومونیه* تولید کننده بیوفیلم که توسط نقاط کوانتومی اکسید روی و مس در غلظت‌های ساب MIC مهار شده بودند، برای مطالعه حاضر انتخاب شدند. نتایج Real-time PCR نشان داد که بیان ژن‌های تولید کننده بیوفیلم در این جدایه‌ها مشابه است (بدون تغییر معنی‌دار). مشخص شد که بیان ژن‌های *ica* (A,D,R) و *Wzm* هنگام قرار گرفتن در معرض غلظت‌های زیر MIC نقاط کوانتومی کاهش می‌یابد (شکل ۱) و این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

ارزیابی تاثیر نقاط کوانتومی مس و اکسید روی بر بیان ژن‌های مرتبط با بیوفیلم *ica* (A,D,R) در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

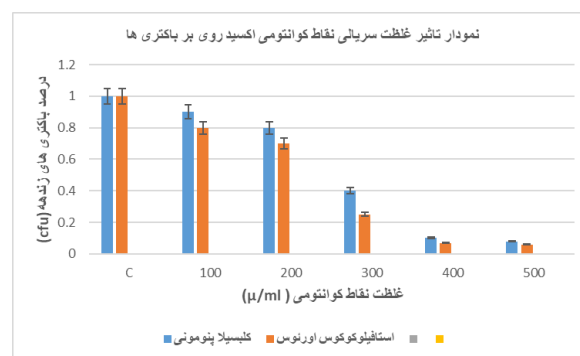
در این مطالعه، تاثیر دو نوع نقاط کوانتومی روی (ZnO-QDs) و نقاط کوانتومی مس (Cu-QDs) بر میزان بیان ژنوم‌های مرتبط با بیوفیلم در دو پاتوژن مقاوم به دارو، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلبسیلا پنومونیه* مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، بیان ژن *ica* به‌عنوان ژن موثر در سنتز پلی‌ساکارید بین‌سلولی (PIA) و تشکیل بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از آزمون‌های RT-PCR نشان داد که تاثیر هر دو نوع نقطه کوانتومی به کاهش میزان بیان ژن *ica* منجر شد. بر اساس اطلاعات نمودار ۳، بیشترین میزان کاهش بیان ژن *ica*، مربوط به تاثیر نقاط کوانتومی مس بر *ica D* بود که به میزان ۵۵ درصد کاهش بیان ژن در مقایسه با بیان

بیوفیلم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلبسیلا پنومونیه*، توسط نقاط کوانتومی مس به میزان ۹۵ درصد و توسط نقاط کوانتومی اکسید روی به میزان ۸۵ درصد بود. در پژوهش حاضر، نتایج به خوبی نشان داد نقاط کوانتومی مس و اکسید روی می‌توانند مانع تشکیل بیوفیلم این باکتری‌ها شوند. همان طور که مشاهده می‌شود تاثیر بازدارندگی تشکیل بیوفیلم توسط نقاط کوانتومی مس نسبت به نقاط کوانتومی اکسید روی بیشتر است و همچنین تاثیر نقاط کوانتومی بر باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) بیشتر از باکتری گرم منفی (*کلبسیلا پنومونیه*) است.



نمودار ۱. تاثیر رقت‌های مختلف نقاط کوانتومی مس بر باکتری‌های مورد بررسی



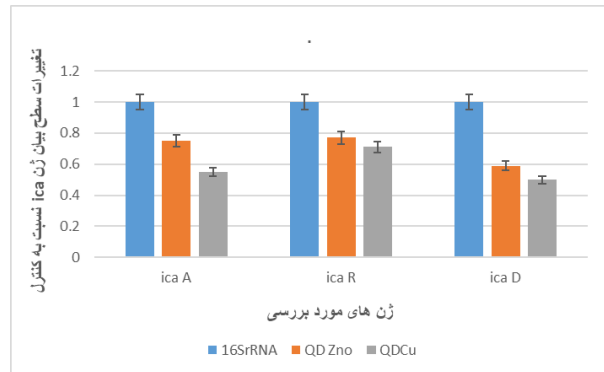
نمودار ۲. تاثیر رقت‌های مختلف نقاط کوانتومی اکسید روی بر باکتری‌های مورد بررسی

بحث

در سال‌های اخیر، بشریت با چالش رو به رشد ناشی از افزایش شیوع باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک مواجه شده است. این امر منجر به افزایش هشداردهنده مرگ و میر و ظهور بیماری‌هایی شده است که مدیریت آنها سخت است. در بسیاری از کشورها به دلیل مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها سویه‌های کلبسیلا پنومونیه به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند و می‌توانند آنزیم‌های مختلف مانند بتالاکتامازهای وسیع الطیف جهت مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها تولید کنند. هم چنین یکی از مکانیسم‌های مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری تولید بیوفیلم است (۱۶). به طور کلی ژن‌های متنوعی در تشکیل بیوفیلم در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه نقش دارند. یکی از ژن‌های تولید بیوفیلم ژن wzm در کلبسیلا پنومونیه نقش به سزایی در تولید بیوفیلم دارد که مسئول سنتز آنتی ژن O در ساختار لیپوپلی ساکارید ژن wzm آنزیم‌های سنتز کننده آنتی ژن O لیپوپلی ساکارید را کد می‌کند که نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم دارد. مطالعات نشان داده‌اند که موتانت‌های فاقد ژن wzm در ارتباط با ژن‌های حس حد نصاب (Quorum sensing) نیز است (۱۷). بنابراین محققان به دنبال راهکارهای درمانی جایگزین برای کنترل عفونت‌های ناشی از کلبسیلا پنومونیه هستند که یکی از این راهکارها استفاده از پلیمرهای طبیعی، سنتتیک و فلزی است (۱۸).

همچنین استافیلوکوکوس اورئوس، به عنوان یک پاتوژن انسانی، عامل اصلی عفونت‌های جامعه و همچنین مراقبت‌های بهداشتی است. این باکتری از عوامل بیماری‌زایی است که به دلیل مقاومت در برابر چندین دارو می‌تواند باعث طیف وسیعی از عفونت‌های شدید و تولید بیوفیلم در دستگاه‌های پزشکی شود. چنین عفونت‌های مزمن مرتبط با بیوفیلم اغلب منجر به افزایش عوارض و مرگ و میر می‌شود و بار اجتماعی-اقتصادی بالایی به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه ایجاد می‌کند (۱۹). بیوفیلم یکی از عوامل حیاتی برای ظهور بیماری‌های مقاوم به چند دارو است. مرگ و میر بالا، عوارض و آسیب‌های مرتبط با دستگاه‌های پزشکی با تشکیل بیوفیلم همراه است که در درجه اول نیاز به جستجوی راهکارهای درمانی جایگزین دارد. اخیراً، نانوتکنولوژی به عنوان روشی توسعه‌دهنده برای ایجاد آسیب‌های مرتبط با بیوفیلم ظاهر می‌شود. کارایی نانوذرات (NPs) در تحقیقات علمی توجه بسیاری را به خود جلب

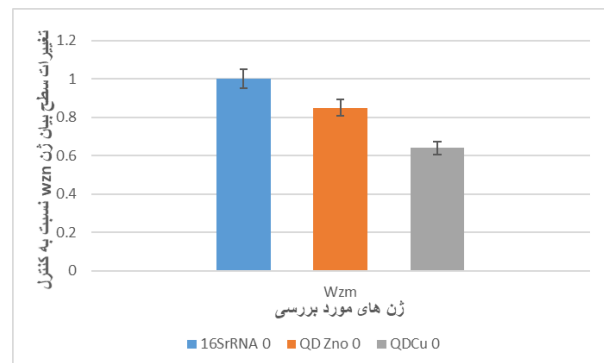
ژن 16S rRNA را نشان داد. در نتیجه نقاط کوانتومی مس نسبت به نقاط کوانتومی دی اکسید روی (که به میزان ۴۱ درصد کاهش بیان ژن ایجاد نمودند)، کاهش چشمگیری در بیان ژن 16S rRNA از خود نشان دادند که از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$).



نمودار ۳. نتایج بررسی بیان ژن ica در بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس تحت تاثیر نقاط کوانتومی

ارزیابی تاثیر نقاط کوانتومی مس و اکسید روی بر بیان ژن‌های مرتبط با بیوفیلم wzm در باکتری کلبسیلا پنومونیه

در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه، ژن wzm که در فرآیند ساخت کپسول و بیوفیلم نقش دارد، به عنوان هدف انتخاب شد. کاهش قابل توجه بیان این ژن تحت تاثیر هر دو نوع نقطه کوانتومی قرار می‌گیرد، اما شدت آن توسط نقاط کوانتومی مس به طور معنی‌داری بیشتر از اکسید روی بود و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در مقایسه با بیان ژن 16S rRNA از خود نشان داد ($P < 0.05$). براساس نمودار ۴، بیشترین میزان کاهش بیان ژن wzm، مربوط به تاثیر نقاط کوانتومی مس بود که به میزان ۴۶ درصد کاهش بیان ژن در مقایسه با بیان ژن 16S rRNA را نشان داد.



نمودار ۴. نتایج بررسی بیان ژن Wzm در بیوفیلم باکتری کلبسیلا پنومونیه تحت تاثیر نقاط کوانتومی

می‌کند و تحقیقات در این زمینه به سرعت در حال افزایش است (۲۰).

مقالات مروری متعددی یک مرور کلی از جنبه‌های مختلف استراتژی‌های ضد بیوفیلیم مبتنی بر فناوری نانو ارائه می‌دهند. وو و همکارانش (۲۰۲۳) آخرین رویکردهای مبتنی بر فناوری نانو را برای جلوگیری از چرخه رشد بیوفیلیم‌ها بررسی کرده‌اند. نویسندگان رویکردهای نانوفناوری فعلی را که باعث تداخل با تشکیل بیوفیلیم باکتریایی در مراحل مختلف می‌شود، مورد بحث قرار دادند و بر اهمیت تنظیم بیوفیلیم تأکید کردند (۲۱).

در حالی که چندین بررسی مروری جامع از استراتژی‌های ضد بیوفیلیم مبتنی بر فناوری نانو ارائه کرده‌اند، بررسی ما به طور خاص بر فعالیت‌های ضد بیوفیلیم و ضد میکروبی طیفی از نانوذرات و نانومواد، از جمله نقاط کوانتومی فلزی بود.

سنتز سبز یک روش سازگار با محیط زیست برای سنتز نانوذرات با طیف گسترده‌ای از خواص منحصر به فرد است که به عصاره‌های گیاهی مورد استفاده بستگی دارد (۲۲). در این مطالعه نانوذرات کوانتومی اکسید روی و مس با اثرات ضد باکتریایی و آنتی بیوفیلیمی با استفاده از سنتز سبز از عصاره گیاهی میوه بلوط تهیه شد.

در مطالعه حاضر، ترکیب بیوفیلیم / استافیلوکوکوس / اورئوس و کلبسیلا پنومونیه از نمونه‌های خلط و زخم عفونی از بیماران بستری در بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه جدا شد و تاثیرات نقاط کوانتومی اکسید روی و مس بر روی ژن تشکیل بیوفیلیم این باکتری‌ها بررسی شد.

در این مطالعات، نقاط کوانتومی با غلظت ساب MIC استفاده شد. مطالعه ما نشان داد که نقاط کوانتومی اکسید روی و مس در ساب MIC و بالاتر، فعالیت‌های آنتی بیوتیکی در برابر کلبسیلا پنومونیه و استافیلوکوکوس / اورئوس تولیدکننده بیوفیلیم نشان داده است.

اثر نانوذرات اکسید روی بر علیه استافیلوکوکوس / اورئوس و MIC در ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر توسط Banerjee و همکارانش (۲۳) گزارش شد.

مجموعه باکتری‌ها از جمله اشربشیا کلی، باسیلوس سوبتلیس و انتروکوکوس فکالیز برای خواص ضد باکتریایی و آنتی بیوفیلیمی با استفاده از نانوذرات آزمایش شده‌اند (۲۴، ۲۵). با این حال، این مطالعه برای اولین بار به اثر نقاط کوانتومی اکسید روی و مس بر روی ژن‌های مربوط به تشکیل بیوفیلیم *ica (A,D,R)* در استافیلوکوکوس / اورئوس و نیز *wzm* در کلبسیلا پنومونیه می‌پردازد.

نتایج تحقیقات افراسیابی و همکارانش در سال ۲۰۲۴ (۲۶) که مشابه مطالعات کنونی است مشخص کرد که یکی از رویکردهای امیدوارکننده در برابر بیوفیلیم‌ها، درمان مبتنی بر نانوذرات (NP) است که در آن نانوذرات با مکانیسم‌های متعدد مانع مقاومت سلول‌های باکتریایی در اشکال پلانکتونیک یا بیوفیلیم می‌شوند. به عنوان مثال، NP‌هایی مانند اکسید روی (Ag)، اکسید مس (Cu) و اکسید آهن (Fe_3O_4) از طریق استراتژی‌های مختلف با بیان ژن باکتری‌های مرتبط با بیوفیلیم تداخل می‌کنند. NP‌ها می‌توانند به ساختار بیوفیلیم نفوذ کنند و بر بیان پمپ جریان، حسگر حد نصاب و ژن‌های مرتبط با چسبندگی تأثیر بگذارند که منجر به مهار تشکیل یا توسعه بیوفیلیم می‌شود (۲۶).

در مطالعات قیدار و همکارانش (۲۷)، سطح بیان ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلیم در استافیلوکوکوس اورئوس، از جمله *icaA*، *icaB*، *fnbA* و *fnbB*، برای تجزیه و تحلیل واکنش فیزیولوژیکی به غلظت‌های کنترل‌شده چنین نانوذراتی با استفاده از ارزیابی‌های RT-qPCR مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعه ما نشان داد که نانوذرات بر ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مؤثر بوده و از این ترکیبات می‌توان در درمان باکتری‌های مقاوم استفاده کرد. علاوه بر این، این مطالعه همچنین پتانسیل امیدوارکننده استفاده از نانوذرات را به عنوان عوامل ضد تشکیل بیوفیلیم نشان می‌دهد.

با توجه به یافته‌های این مطالعه دریافتیم که بین میزان تشکیل بیوفیلیم و بیان ژن همبستگی وجود دارد. نتایج ما نشان داد که نقاط کوانتومی اکسید روی و مس بیان ژن‌های *ica (A,B,R)* را در استافیلوکوکوس / اورئوس و بیان ژن‌های *wzm* را در کلبسیلا پنومونیه به شدت کاهش داد. بنابراین، این مطالعه نشان داد که نقاط کوانتومی بیوسنتز شده باعث کاهش بیوفیلیم می‌شود.

از یافته‌های این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که نقاط کوانتومی اکسید روی و مس، تشکیل بیوفیلیم در استافیلوکوکوس / اورئوس و کلبسیلا پنومونیه را مهار می‌کنند و می‌توانند به عنوان عوامل ضد بیوفیلیم پتانسیل داشته باشند. علاوه بر این، نتایج این مطالعات بر اثر نقاط کوانتومی اکسید روی و مس بر تشکیل بیوفیلیم و ارتباط آنها با نسبت بیان ژن-های *ica (A,D,R)* در باکتری استافیلوکوکوس / اورئوس و ژن-های *Wzm* در باکتری کلبسیلا پنومونیه تأکید کرد. ژن‌های *ica (A,D,R)* در استافیلوکوکوس / اورئوس و نیز *wzm* در کلبسیلا پنومونیه پس از تیمار با نقاط کوانتومی اکسید روی و مس سرکوب شد. نکته مهم، تأثیر قوی تر نقاط کوانتومی مس

بیوفيلم مفید باشند. همچنین مطالعه و بررسی سایر ژن‌های موثر بر تشکیل بیوفيلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کلبسیلا پنومونیه* مورد نیاز است.

بر جلوگیری از تشکیل بیوفيلم در هر دو باکتری مورد بررسی بود. بنابراین، نقاط کوانتومی اکسید روی و مس می‌توانند در کنترل بیان ژن‌های *ica* (A,D,R) در *استافیلوکوکوس اورئوس* و نیز *wzm* در *کلبسیلا پنومونیه* و به عنوان عوامل ضد

REFERENCES

1. Seth S, Rathinasabapathi P, Selvarajan E, Samuel MS, Chandrasekar N, Balaji R. Quantum dots as antibacterial agents. In: Yun Y, Govindaraju S. Carbon and graphene quantum dots for biomedical applications. Sawston, United Kingdom: Woodhead Publishing; 2023. p. 119-28.
2. Koul K, Jawanda IK, Soni T, Singh P, Sharma D, Kumari S. Quantum dots: a next generation approach for pathogenic microbial biofilm inhibition; mechanistic insights, existing challenges, and future potential. Arch Microbiol 2024;206:158.
3. Harmeet Kaur Kohli, Deepa Parab, Green synthesis of carbon quantum dots and applications: An insight. Next Materials 2025;8:100527.
4. Dinç S, Kara M, Yavuz E. Synthesis of carbon dots from biomass resources. In: Khan R, Murali S, Gogoi S, eds. Carbon Dots in Agricultural Systems Strategies to Enhance Plant Productivity. Carbon Dots Agric. Cambridge, Massachusetts: Academic Press; 2022. p.69-116.
5. Lou Y, Hao X, Liao L, Zhang K, Chen S, Li Z, et al. Recent advances of biomass carbon dots on syntheses, characterization, luminescence mechanism, and sensing applications. Nano Select. 2021;2:1117-1145
6. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis 2018;18:318-27.
7. Thilakavathy P, Priyan RV, Jagatheeswari P, Charles J, Dhanalakshmi V, Lallitha S, et al. Evaluation of *ica* gene in *cWzm* rison with phenotypic methods for detection of biofilm production by coagulase negative staphylococci in a tertiary care hospital. J Clin Diagn Res 2015;9:DC16-9.
8. Tyner H, Patel R. Propionibacterium acnes biofilm—A sanctuary for Staphylococcus aureus? Anaerobe 2016;40:63-67.
9. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of Klebsiella Pneumoniae. Int J Environ Res Public Health 2020;17:1-17.
10. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent Klebsiella Pneumoniae. Clin Microbiol Rev 2019; 32: 1-42.
11. Brindhadevi K, LewisOscar F, Mylonakis E, Shanmugam S, Verma TN, Pugazhendhi A. Biofilm and Quorum Sensing Mediated Pathogenicity in Pseudomonas Aeruginosa. Process Biochemistry 2020;96:49-57.
12. Jayaprakash J, Ganesh M, Nandhini K. Green biogenic synthesis of zinc oxide nanoparticles using Pseudomonas putida culture and it's In vitro antibacterial and anti -biofilm activity. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 2019; 2: 101327.
13. Lee B, Schjerling CK, Kirkby N, Hoffmann N, Borup R, Molin S, et al. Mucoid Pseudomonas aeruginosa isolates maintain the biofilm formation capacity and the gene expression profiles during the chronic lung infection of CF patients. APMIS 2011;119:263-74.
14. Nyenje ME, Gree E, Ndip RN. Biofilm Formation and adherence characteristics of *Listeria ivanovii* strains isolated from ready-to-eat foods in Alice, South Africa. ScientificWorldJournal 2012;2012:873909.
15. Shakerimoghaddam A, Ghaemi EA, Jamalli A. Zinc oxide nanoparticle reduced biofilm formation and antigen 43 expressions in uropathogenic Escherichia coli. Iran J Basic Med Sci 2017; 20: 451-56.
16. Minha N, Usman A, Bushra K, Bin C. Green route to synthesize Zinc Oxide Nanoparticles using leaf extracts of Cassia fistula and Melia azadarach and their antibacterial potential. Sci Rep 2020; 10: 9055-103.
17. Valadbeigi H, Sadeghifard N, Kaviar VH, Haddadi MH, Ghafourian S, Maleki A. Effect of ZnO nanoparticles on biofilm formation and gene expression of the toxin-antitoxin system in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2023;22:89.
18. Ahuatzin-Flores OE, Torres E, Chávez-Bravo E. Acinetobacter baumannii, a Multidrug-Resistant Opportunistic Pathogen in New Habitats: A Systematic Review. Microorganisms 2024;12:644.

19. Manandhar S, Singh A, Varma A, Pandey S, Shrivastava N. Biofilm producing clinical *Staphylococcus aureus* isolates augmented prevalence of antibiotic resistant cases in tertiary care hospitals of Nepal. *Front Microbiol* 2018;9:2749.
20. Al-Wrafy FA, Al-Gheethi AA, Ponnusamy SK, Noman EA, Fattah SA. Nanoparticles approach to eradicate bacterial biofilm-related infections: A critical review. *Chemosphere* 2022;288:132603.
21. Wu J, Zhang B, Lin N, Gao J. Recent nanotechnology-based strategies for interfering with the life cycle of bacterial biofilms. *Biomater Sci* 2023;11:1648-64.
22. Hosnedlova B, Kabanov D, Kepinska M, B Narayanan VH, Parikesit AA, Fernandez C, et al. Effect of biosynthesized silver nanoparticles on bacterial biofilm changes in *Staphylococcus aureus* and *E. coli*. *Nanomaterials (Basel)* 2022;12:2183.
23. Pourkhosravani E, Dehghan Nayeri F, Mohammadi Bazargani M. Decoding antibacterial and antibiofilm properties of cinnamon and cardamom essential oils: a combined molecular docking and experimental study. *AMB Express* 2021;11:143.
24. Asadi S, Nayeri-Fasaei B, Zahraei-Salehi T, Yahya-Rayati R, Shams N, Sharifi A. Antibacterial and anti-biofilm properties of carvacrol alone and in combination with cefixime against *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* 2023;23:55.
25. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Bioceramic Materials in Endodontics. *Materials (Basel)* 2021;14:7594.
26. Afrasiabi S, Partoazar A. Targeting bacterial biofilm-related genes with nanoparticle-based strategies. *Front Microbiol* 2024;15:1387114.
27. Gheidari H, Haddadi A, Sadeghi Kalani B, Amirmozafari N. Nanoparticles Impact the Expression of the Genes Involved in Biofilm Formation in *S. aureus*, a Model Antimicrobial-Resistant Species. *J Med Bacteriol* 2018;7:30-41.