

The effect of alumina nanoparticles from hydroalcoholic extract of *Rheum persicum* on biofilm production genes in *Pseudomonas aeruginosa*

Sajad Karimi Ghahfarokhi¹ , Farhad Gilavand¹ , Abdolrazagh Marzban² , Amirarsalan Kavyanifard^{3*} 

¹ Dept of Microbiology, Islamic Azad University, Khorramabad Branch, Khorramabad, Iran

² Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

³ Dept of Biology, Payame Noor University, Tehran, 1395-4697, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: Aug. 16, 2025

Received in revised form:

Jan. 28, 2026

Accepted: Feb. 25, 2026

Published Online: May. 26, 2026

* Correspondence to:

Amirarsalan Kavyanifard

Dept of Biology, Payame Noor University, Tehran, 1395-4697, Iran

Email:

kavyanifarda@pnu.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic bacterium that is naturally resistant to antimicrobial substances. This bacterium is one of the most important causes of hospital-acquired infections in infants and burn patients. The aim of this study was to synthesise alumina nanoparticles using *Rheum persicum* hydroalcoholic extract and investigate its effect on biofilm production genes in *P. aeruginosa*.

Materials & Methods: In this study, alumina nanoparticles were successfully synthesised from hydraulic *Rheum persicum* extract. To ensure the formation of nanoparticles with UV-VIS absorption, SEM scan, FTIR spectrum, nanoparticle size and volume study, and XRD spectrum were performed, and then antimicrobial activity was investigated by determining MIC and MBC values. Finally, the expression of the *mvfR* and *pslA* biofilm generator genes was evaluated.

Results: The results of the different analyses showed that the alumina nanoparticles are produced from *R. persicum* hydraulic extract. The MIC and MBC values of the nanoparticles were determined as 1000 and 1500 micrograms per ml, respectively. The results of the effect of nanoparticles on biofilm genes showed a significant decrease in expression of *mvfR* and *pslA* genes.

Conclusion: The results show that the efficiency of this nanoparticle is very good and can be used to inhibit the growth of this bacterium.

Keywords: Antibiofilm, Alumina Nanoparticle, *Pseudomonas aeruginosa*, *mvfR*, *pslA*

Cite this paper: Karimi Ghahfarokhi S, Gilavand F, Marzban A, Kavyanifard A. The effect of alumina nanoparticles from hydroalcoholic extract of *Rheum persicum* on biofilm production genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2026;34(2):71-90.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is one of the most important opportunistic human pathogens and a major cause of healthcare-associated infections (1). This bacterium possesses several virulence factors, including the ability to produce biofilm, exotoxin, alginate, lipopolysaccharide, and pili, all of which contribute to its pathogenicity (2). Biofilm formation is one of the major mechanisms that enables *P. aeruginosa* to colonize various tissues, particularly in immunocompromised patients, individuals with implanted medical devices, and

patients with burn wounds (3). The genus *Rheum* belongs to the Polygonaceae family and comprises approximately 103 species worldwide, distributed mainly in North America, Europe, and the eastern Mediterranean regions, including Turkey, Iran, Afghanistan, Pakistan, Russia, and China (4). Any particle with dimensions in the nanometer range is referred to as a nanoparticle (NP) (5). NPs have attracted considerable attention due to their relatively low toxicity and broad potential for biomedical applications, making them promising candidates for combating pathogenic microorganisms. Although nanoparticles have long



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

Journal of Ilam University of Medical Sciences, Volume 34, Issue 2, 2026

been synthesized using chemical and physical methods, green synthesis has emerged as a clean, non-toxic, and environmentally friendly alternative. It has been shown that electrostatic interactions between negatively charged microbial cell surfaces and positively charged nanoparticles facilitate nanoparticle binding to the cell membrane, leading to disruption of membrane permeability and, ultimately, cell death. In addition, nanomaterials can inhibit bacterial adhesion and delay biofilm formation, thereby preventing bacterial colonization and proliferation. The aim of this study was to synthesize alumina nanoparticles using hydroalcoholic extract of *R. persicum* and to investigate their effects on selected genes involved in biofilm formation in *P. aeruginosa*.

Methods

For extraction, 10 g of dried powder of *R. persicum* was added to 90 ml of distilled water and 10 ml of ethanol. Then, it was sonicated (45°C) for 1 hour. A concentrated 1 M aluminium nitrate solution was used to synthesise alumina NPs as follows: 0.5 ml of aluminium nitrate solution was added to 10 ml of *R. persicum* hydroalcoholic extract and stirred for 48 hours (11). Many analyses were done to ensure the formation of NPs, including a UV-VIS absorption assay in the wavelength range of 200–400 nm (13), an FTIR spectrum (14), an SEM scan, a nanoparticle size and volume study, and an XRD spectrum were performed, and then antimicrobial activity was investigated by MIC and MBC determination using the microdilution method in a 96-well microtiter plate in Mueller Hinton broth according to the CLSI standard dilution method A8-M07 (15). Finally, the effect of synthesised NPs on the expression of *mvfR* and *plsA*, as biofilm-producing genes, was evaluated using real-time PCR. The WizScript™ RT Master kit (Wizbiosolutions Inc., South Korea) was used for RNA extraction, and the WizScript™ cDNA Synthesis Kit (Wizbiosolutions Inc., South Korea) was used for cDNA synthesis according to the manufacturer's instructions. To determine the primers, the sequences of the studied genes were extracted from GenBank, and then the best primer sequence was designed and selected with the help of GeneRunner software. After performing real-time PCR, the results were analysed by the Relative Expression Software Tool (REST). All experiments were performed in triplicate.

Results

After 48 sonications, the colour of the solution containing the hydroalcoholic extract of *R.*

persicum and aluminium nitrate solution changed from yellow to dark brown, indicating the production of aluminium oxide or alumina NPs. The results of various analyses were as follows: the produced NPs had a size between 50 and 300 nm. The surface charge of the NPs was in the range of 25–55 mV (the surface charge of most NPs was in the range of 43 mV). The results of the XRD spectrum indicated the presence of alumina NP crystals with a cubic crystal structure. The MIC and MBC values of the NPs were determined to be 1000 and 1500 µg/ml, respectively. The results of the effect of NPs on biofilm genes showed a significant decrease in the expression of *mvfR* and *plsA* genes. The effect of the nanoparticle in inhibiting the expression of the *mvfR* gene was about 1.04 times that of the extract, and its effect in inhibiting the expression of the *plsA* gene was about 19.02 times that of the hydroalcoholic extract of *R. persicum*.

Conclusion

Findings showed that the alumina NPs synthesised from the hydroalcoholic extract of *R. persicum* had the following characteristics: a cubic crystal structure with a size between 50 and 300 nm and a surface charge of 25–55 mV. The NPs were founded to have an acceptable and strong inhibitory and lethal effect on *P. aeruginosa*. Meanwhile, the effect of synthesised alumina NPs in inhibiting the expression of the *mvfR* gene was about 9.96 times, and its effect in inhibiting the expression of the *plsA* gene was about 190.28 times that of the hydroalcoholic extract of *R. persicum*. Considering the results, it can be said that NPs obtained from hydroalcoholic extract of *R. persicum* can be a candidate to inhibit the growth of *P. aeruginosa*.

Authors' Contribution

Conceptualization, Methodology, Validation, Formal Analysis, Investigation, Software, Resources, Data Curation: SK, FJ, AM, Writing—Original Draft Preparation, Writing—Review & Editing, Visualization, Supervision, Project Administration: SK, AK.

Ethical Statement

Due to the lack of animal testing, there was no need to obtain an ethics code. The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Funding

This article is derived from a section of the thesis completed at the Master's level under the approved code 83460165 by Islamic Azad University, Khorramabad branch (Iran). Authors declare that no funds, grants, or other support was received during the preparation of this manuscript.

Acknowledgment

Authors thanks who participated in the whole phases of research.

تأثیر نانوذرات آلومینای حاصل از عصاره هیدروالکلی ریواس بر ژن‌های تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروجینوزا

سجاد کریمی قهفرخی^۱، فرهاد گیلاوند^۱، عبدالرزاق مرزبان^۲، امیرارسلان کاویانی‌فرد^{۳*}

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد، خرم آباد، ایران

^۲ مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

^۳ گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ۱۳۹۵-۴۶۹۷، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

مقدمه: سودوموناس آئروجینوزا باکتری فرصت طلبی است که به صورت ذاتی به مواد ضد میکروبی مقاوم است. این باکتری از مهم ترین عوامل ایجاد عفونت های بیمارستانی در بیماران بخش نوزادان و سوختگی است. هدف از این مطالعه سنتز نانوذرات آلومینا با استفاده از عصاره هیدروالکلی ریواس و بررسی تأثیر آن بر ژن های تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروجینوزا بود.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۲۵

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۱۱/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۶

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۳/۰۵

مواد و روش ها: در این بررسی، نانوذرات آلومینا از عصاره هیدروالکلی ریواس با موفقیت سنتز شد. به منظور اطمینان از تشکیل نانوذره، تجزیه و تحلیل های جذب UV-vis، اسکن SEM، طیف FTIR، بررسی اندازه و بار سطحی ذره های نانوذرات و طیف XRD انجام و سپس فعالیت ضد میکروبی آن با تعیین مقادیر MIC و MBC بررسی گردید. در نهایت، میزان بیان ژن های تولید کننده بیوفیلم *pslA* و *mvfR* ارزیابی شد.

نویسنده مسئول:

یافته های پژوهش: نتایج تجزیه و تحلیل های مختلف نشان داد که از عصاره هیدروالکلی ریواس، نانوذره آلومینا ساخته شده است. مقادیر MIC و MBC این نانوذرات به ترتیب معادل ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر تعیین شد. نتایج اثر نانوذره بر ژن های بیوفیلم نشان دهنده کاهش معنی دار بیان هر دو ژن *pslA* و *mvfR* بود.

امیرارسلان کاویانی فرد

گروه زیست شناسی، دانشگاه

پیام نور، تهران، ۱۳۹۵-۴۶۹۷،

ایران

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج مشخص شد که میزان کارایی این نانوذره بسیار مناسب است و می توان از آن برای مهار رشد این باکتری بهره برد.

واژه های کلیدی: ضد بیوفیلمی، نانوذره آلومینا، سودوموناس آئروجینوزا، *pslA* *mvfR* Email: kavayanifarda@pnu.ac.ir

استناد: کریمی قهفرخی سجاد، گیلاوند فرهاد، مرزبان عبدالرزاق، کاویانی فرد امیرارسلان. تأثیر نانوذرات آلومینای حاصل از عصاره هیدروالکلی ریواس بر ژن های تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروجینوزا. مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام، خرداد ۱۴۰۵؛ ۳۴(۲): ۷۱-۹۰.

مقدمه

باکتری سودوموناس آئروجینوزا یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا به‌شمار می‌رود. این باکتری یک باسیل گرم منفی بیماری‌زای فرصت‌طلب است که قابلیت بالایی در بیماری‌زایی و ایجاد عفونت در بیماران بستری و افراد دارای نقص در دستگاه دفاعی بدن دارد. این ارگانیسم می‌تواند هر عضوی از بدن را درگیر کند و بیماری‌های بالینی مهمی از جمله عفونت‌های مجاری تنفسی، بافت نرم، استخوان‌ها، عفونت دستگاه ادراری و باکتری می‌را به‌وجود می‌آورد (۱). این باکتری به‌عنوان دومین باکتری بیماری‌زای رایج در جراحی و سومین عامل شایع عفونت‌های بیمارستانی، پس از *شریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است (۲). این باکتری عامل‌های ویروالانس متعددی مانند قابلیت تولید بیوفیلم، تولید آگزوتوکسین، آلترینات، لیپولی‌ساکارید، پلی، فسفولیپاز C9، الاستاز و الکالین پروتئاز را دارد که تولید عامل‌های ویروالانس در بیماری‌زایی آن نقش دارند (۳).

بیوفیلم‌ها اجتماعات باکتریایی بسیار سازمان‌یافته‌ای هستند که به یکدیگر و/یا به سطوح می‌چسبند و در یک ماتریس پلی-ساکارید قرار دارند که به آن‌ها امکان مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، استرس‌های محیطی، بیوشیمی‌ها و مواد شوینده را می‌دهد. بر اساس بعضی برآوردها، بین ۶۵ تا ۸۰ درصد از عفونت‌های میکروبی در انسان با تولید بیوفیلم همراه هستند (۴). بیوفیلم یکی از عواملی است که به استقرار *سودوموناس آئروجینوزا* روی بافت‌های مختلف، به‌ویژه در بیماران نقص ایمنی، بیماران با دستگاه‌های کاشته‌شده و زخم‌های سوختگی میزبان کمک می‌کند. *سودوموناس آئروجینوزا* از چهار دستگاه سنجش اولیه شامل *asI/lasR*، *Pqs*، *rhlI/rhlR* (که با عنوان *MvfR* نیز شناخته می‌شود) و *IqsR* برای کنترل بیان ژن و هماهنگی مؤثر در تولید بیوفیلم استفاده می‌کند. این سازوکارها برای هماهنگی تولید بیوفیلم‌ها و تضمین پایداری جوامع باکتریایی در داخل آن‌ها حیاتی هستند؛ به عبارت دیگر، ژن‌های *mvfR* در ایجاد کروم‌سنسینگ دخالت دارند. ژن‌های *mvfR* عامل تنظیمی مرتبط با سیگنالینگ و کنترل تولید عوامل فعال‌کننده بیوفیلم و

کروم‌سنسینگ هستند و به‌ویژه با تولید پیگمنت‌ها بر بیان ژن‌های مرتبط با مسیر تولید بیوفیلم اثر می‌گذارند (۶). پلی‌ساکاریدی که توسط ژن *pslA* کدگذاری می‌شود، یک آگروپلی-ساکارید با بار خنثی است که از D-مانوز، D-گلوکز و L-رامنوز تشکیل شده است و پشتیبانی ساختاری را در تشکیل بیوفیلم فراهم می‌کند. به‌طور دقیق‌تر، *plsA* نقش‌های مرتبط با مسیرهای اسیدهای چرب و چربی‌های جداره سلولی را دارد. این ژن به‌ویژه در تنظیم توزیع و جانمایی پلیمرهای ماتریکس و همچنین سیگنال‌دهی داخلی بیوفیلم ارتباط دارد (۷)؛ بنابراین، ژن‌های *MvfR* و *pslA* از ژن‌های مهم در تولید بیوفیلم توسط *سودوموناس آئروجینوزا* هستند و مهار این ژن‌ها می‌تواند تا حد فراوانی تشکیل بیوفیلم در این ارگانیسم را مختل و به مبارزه با آن کمک کند.

جنس ریواس با نام علمی *Rheum L*، متعلق به خانواده *Polygonaceae* است که حدود ۱۰۳ گونه در جهان دارد و به‌طور عمده در آمریکای شمالی، اروپا و نواحی شرقی مدیترانه شامل ترکیه، ایران، افغانستان، پاکستان، روسیه و چین می‌روید (۸). این جنس در غرب، مرکز، جنوب و شمال شرقی ایران پراکنش دارد. چهار گونه چندساله از جنس ریواس به نام‌های *R. turkestanicum*، *R. persicum*، *R. khorasanicum* و *ribes* در ایران گزارش شده است (۹). ساقه برگ و ساقه گل این گیاه به‌صورت خام و پخته خوردنی است. ریزوم‌های گیاه نیز مصرف غذایی دارند. برگ‌ها مقدار فراوانی اکزالات دارد که خوردن فراوان آن به‌صورت خام یا پخته، موجب عوارض در کلیه‌ها می‌شود. در طب سنتی، ریواس طبیعت سرد و اثر ملین دارد و ناقل نمک‌های صفراوی و محرک ترشح کبد شناخته شده است. علاوه بر این، با تحریک ترشح نمک‌های صفراوی از کبد، به تنظیم جذب چربی از روده کمک می‌کند (۱۰).

برخی از مولکول‌های زیستی موجود در عصاره‌های گیاهی مانند ترکیبات فنلی، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، آنزیم‌ها، کوآنزیم‌ها، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و اسیدهای آلی می‌توانند به‌عنوان عوامل احیاکننده، پوشش‌دهنده و پایدارکننده برای نانوذرات عمل نمایند. این مولکول‌های

زیستی به سطح نانوذرات متصل می‌شوند و از تجمع آن‌ها جلوگیری و پایداری آن‌ها را فراهم می‌کنند. علاوه بر این، عوامل پوشش‌دهنده بر اندازه، شکل و خواص سطحی نانوذرات سنتز شده تأثیر می‌گذارند (۱۱).

در گونه‌های مختلف جنس ریواس، مولکول‌های زیستی متنوعی وجود دارد که از جمله آن‌ها موارد زیر ترکیبات فنی، فلاونوئیدها، آنتراکینون‌ها، کریسوفانول، فیزیون و امودین، فلاونوئیدهای کوئرستینی مختلف قابل ذکر است. این ترکیبات می‌توانند به عنوان عوامل احیا کننده و پایدار کننده در طول سنتز نانوذرات عمل کنند. آن‌ها با اهدای الکترون به یون‌های فلزی در محلول پیش‌ساز، احیا و در نتیجه، تشکیل نانوذرات را تسهیل می‌نمایند (۸).

نانوذرات ترکیباتی هستند که ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوتی دارند و اندازه آن‌ها بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است. نانوذرات به واسطه اندازه بسیار کوچکشان و نسبت حجم به سطح بالا که در مقایسه با مواد با اندازه مولکولی بزرگ، به بروز تفاوت‌های فیزیکی و شیمیایی (از قبیل خواص مکانیکی، خواص فضایی و بیولوژیکی، جذب نور و نقطه ذوب) در آن‌ها منجر می‌شود، مورد توجه فراوانی قرار گرفته‌اند (۱۲). نانوذرات در چرخه حیات و اکوسیستم، پایین‌ترین سطح سمیت را از خود نشان داده‌اند؛ بنابراین، استفاده از این مواد برای مبارزه با میکروب‌های بیماری‌زا می‌تواند انتخاب مناسبی باشد؛ از این رو، روش‌هایی برای تهیه و ساخت مواد نانو وجود دارد که از جمله می‌توان به قوس الکتریکی (پلازما)، احیای شیمیایی، فرسایش لیزری و روش‌های سنتز سبز اشاره کرد (۱۳). مدت‌هاست که نانوذرات به روش‌های شیمیایی و فیزیکی تولید می‌شوند؛ اما پیشرفت‌های اخیر نشان می‌دهد که میکروارگانیزم‌ها و دستگاه‌های بیولوژیکی نقش حیاتی در تولید نانوذرات فلزی دارند. روش‌های سنتز سبز به علت خواص متفاوت نوری، شیمیایی فتوالکتروشیمی و الکترونیکی توجه بسیاری را به خود جلب کرده است؛ همچنین سنتز نانوذرات به روش سبز روشی ایمن، غیرسمی و سازگار با محیط‌زیست است که مربوط به موجودات مختلفی از قبیل باکتری قارچ مخمر و

گیاهان است (۱۴).

نانوذرات اکسید فلزی بر اساس نسبت سطح به حجم، خاصیت ضدباکتریایی متفاوتی از خود نشان می‌دهند. باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، در مقابل نانوذرات فلزی، مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند که این می‌تواند به ساختار دیواره سلولی ارتباط داشته باشد (۱۵). تحقیقات متعدد مبتنی بر واکنش‌های احتمالی میان نانوذرات با ماکرومولکول‌های موجودات زنده انجام گرفته است. اختلاف میان بار منفی میکروارگانیزم و بار مثبت نانوذره، به صورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذره عمل می‌کند و باعث اتصال نانوذره به سطح سلول می‌شود و در نتیجه، می‌تواند باعث مرگ سلول گردد. غیر فعال شدن تراوایی غشا در نهایت باعث مرگ سلول می‌شود؛ همچنین نانو مواد چسبیدن سلول باکتری و تشکیل بیوفilm را به تأخیر می‌اندازند که این عمل سبب می‌گردد گروهی از باکتری‌ها نتوانند تثبیت شوند و تکثیر یابند (۱۶). امروزه، مطالعات بسیاری وجود دارد که نشان‌دهنده اثر ضدباکتریایی اکسید روی، اکسید آهن، دی‌اکسید تیتانیوم، اکسید نقره، اکسید مس و سایر نانوذرات است (۱۷).

آلومینیوم فراوان‌ترین عنصر در پوسته زمین (۸ درصد پوند) و سومین عنصر در ترکیب لیتوسفر است؛ بنابراین، عنصری ارزان و قابل دسترس در نظر گرفته می‌شود (۱۷). اکسیدهای آلومینیوم نانومقیاس (α - and γ - Al_2O_3) به علت خواص منحصر به فرد خود مانند پایداری شیمیایی و مکانیکی بالا و مساحت سطح بزرگ نسبت به حجم، کاربرد فزاینده‌ای در زمینه‌های مختلف پیدا کرده‌اند (۱۸). اگرچه سلول همه موجودات زنده، حاوی مقادیری آلومینیوم هستند؛ اما مشخص شده است اکسیدهای آلومینیوم به علت بی‌حرکی، در فرایندهای بیوشیمیایی طبیعی شرکت نمی‌کنند و بنابراین، اکسیدهای آلومینیوم سمیت سلولی ندارند و زیست‌سازگارتر از سایر اکسیدهای فلزی هستند (۱۷).

از آنجاکه بررسی‌های ما نشان داد که مطالعات انجام گرفته درباره آثار ضدباکتریایی نانوذرات آلومینیوم، در مقایسه با سایر اکسیدهای فلزی، بسیار کمتر است؛ بنابراین،

داشته شد. جداسازی نانوذرات توسط سانتریفیوژ با دور RPM14000 به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C صورت گرفت. رسوب نانوذرات توسط اتانول و آب مقطر شستشو و در نهایت، در آون خلأ در 60°C خشک گردید.

بررسی خصوصیات نانوذره تولیدشده؛ طیف سنج مرئی فرابنفش (UV-vis): اثبات تولید نانوذرات بر اساس تغییر جذب و رنگ آن است که از طریق طیف سنجی نوری از نانوذره و عصاره گیاه، مقایسه آن‌ها تأیید می‌شود؛ بنابراین، پس از مشاهده تغییر رنگ محیط، نمونه‌ها توسط طیف سنج نوری در محدوده طول موج ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر (Jenway 6300)، برای نانوذرات آلومینا بررسی شدند. در کنار نمونه نانوذره، از ترکیبات موجود در عصاره نیز طیف سنج نوری در همان محدوده جذب انجام شد (۱۹).

بررسی طیف سنجی مادون قرمز نانوذرات آلومینا: برهم کنش‌های نانوذرات آلومینا با ترکیبات بیولوژیک گیاهی که در مخلوط واکنش بودند، توسط طیف سنجی مادون قرمز بررسی گردید (Thermo, model: AVATAR). طیف سنجی مادون قرمز برای شناسایی و نشان دادن گروه‌های عاملی دخیل در فرایند تشکیل نانوذره انجام می‌گیرد. برای انجام طیف سنجی مادون قرمز، پودر نمونه خشک شده نانوذره به میزان حداقل ۲۱ میلی گرم برای ثبت طیف مادون قرمز به کار گرفته شد (۲۰). برای انجام طیف سنجی مادون قرمز، ابتدا ۱۰ میلی گرم از نانوذرات خشک شده در دسیکاتور به ۱ گرم برمید پتاسیم خشک اضافه گردید و پس از همگن کردن آن، درون دستگاه پرس قرار گرفت. قرص تهیه شده برای انجام تجزیه و تحلیل در دستگاه جای گرفت.

تعیین خصوصیات مورفولوژی و اندازه نانوذرات آلومینا: مورفولوژی و ریخت شناسی نانوذرات آلومینا سنتز شده توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (FESEM) مربوط به دانشگاه لرستان (شکل شماره ۱) بررسی گردید (TESCAN, model MIRA 3, czech). روش آماده سازی نمونه بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد توسط اپراتور دستگاه انجام شد.

ضروری به نظر می‌رسید که آثار ضدباکتریایی نانوذرات آلومینیوم بررسی شود. هدف از انجام این مطالعه سنتز نانوذرات آلومینا با استفاده از عصاره هیدروالکلی R. persicum و بررسی این نکته بود که آیا این نانوذرات روی برخی از ژن‌های مسیر تولید بیوفيلم در باکتری سودوموناس آئروجینوزا اثر مهاری دارند یا خیر.

مواد و روش‌ها

عصاره گیری از ریواس: نمونه‌های گیاهی در اردیبهشت ماه از مناطق اشترانکوه دورود در لرستان جمع آوری و پس از شستشو، در سایه خشک و سپس با کمک آسیاب پودر شدند. به منظور عصاره گیری از گیاه ریواس، ابتدا ۱۰ گرم پودر خشک شده در یک ارلن ریخته و ۹۰ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰ میلی لیتر اتانول به آن اضافه گردید؛ سپس نمونه به مدت ۱ ساعت در بن ماری (45°C) و تحت تأثیر سونیکاتور قرار گرفت. در نهایت، عصاره هیدروالکلی توسط کاغذ فیلتر واتمن از باقی مانده گیاه جدا شد. در ادامه، عصاره فیلتر شده به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (RPM6000) گردید (۱۴). مایع رویی سانتریفیوژ شده تا زمان تولید نانوذره در دمای 4°C نگهداری شد. به منظور تعیین قدرت احیا کنندگی عصاره به دست آمده، مقدار پلی فنل تام به روش فولین-سیکالتو اندازه گیری گردید. پس از استاندارد سازی بر حسب اکسی والان گالیک اسید، مقدار پلی فنل تام ۹ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد.

تولید نانوذره آلومینا: برای سنتز نانوذرات آلومینا، ابتدا یک محلول غلیظ ۱ مولار از نیترات آلومینیوم در آب مقطر تهیه گردید؛ سپس به ۱۰ میلی لیتر عصاره هیدروالکلی ریواس، ۰/۵ میلی لیتر از این محلول نیترات آلومینیوم اضافه شد. پس از آن pH محلول واکنش توسط هیدروکسید سدیم نیم مولار بر روی ۸ تنظیم گردید. به منظور هسته زایی و رشد نانوذرات، دمای نمونه تا 80°C بالا برده و به مدت ۲ ساعت در همین شرایط روی استیرر هم زده شد (۱۷). پس از آن، دما به 25°C کاهش داده و به مدت ۱۲ ساعت روی مگنت استیرر نگه



شکل شماره ۱. میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی دانشگاه لرستان

برای تعیین فازهای بلورین کریستالی نانوذرات و اندازه گیری ثابت های کریستالیزاسیون نانوذرات آلومینا، از الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) توسط دستگاه پراش سنج پودری اشعه ایکس (PHILIPS, model PW1730) با منبع لامپ Cu LFF در طول موج $\lambda = 1.540598 \text{ \AA}$ استفاده گردید. برای تعیین سایز نانوذرات و نحوه توزیع آن ها در محیط، از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) استفاده شد [Malvern, Nano S (red badg-632.8 nm), England]. این روش برای اندازه گیری اندازه ذرات در محیط محلول است. محلول مدنظر متشکل از نانوذرات پخش شده در یک حلال با غلظت مشخصی است که با برخورد پرتو نور لیزر ۶۳۲ نانومتری به محلول حاوی نانوذرات اطلاعات مربوط به گستره اندازه آن ها را ارائه می دهد (۱۷). این اندازه گیری توسط دستگاه DSL شرکت Malvern انگلستان مدل Nano S (red badg-632.8 nm) انجام شد. تجزیه و تحلیل XRD نمونه نانوذرات توسط اپراتور دستگاه بر اساس دستورالعمل استاندارد صورت گرفت.

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات آلومینا: فعالیت ضد میکروبی نانوذره آلومینای تولید شده با عصاره هیدروالکلی ریواس روی باکتری سودوموناس آئروجینوزا (ATCC 15692) به روش های انتشار دیسک (DDT)، تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) بررسی گردید. برای انجام آزمایش DDT، ابتدا استوک غلیظی از نانوذرات با غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر آب تهیه شد. از این استوک و پس از ورتکس، به ترتیب مقادیر ۱۰، ۲۰، ۶۰ و ۱۰۰ میکرولیتر روی دیسک های خام استریل قرار داده و در دمای اتاق و در شرایط

استریل خشک شدند؛ سپس این دیسک های پوشش دار شده (با غلظت های متفاوتی شامل ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از نانوذرات آلومینا) روی محیط حاوی باکتری قرار گرفت. به منظور مقایسه اثر عصاره با نانوذره، مجموعه ای از دیسک های پوشش داده شده با عصاره هیدروالکلی ریواس بدون نانوذره به عنوان شاهد (با غلظت هایی همانند نانوذره) قرار داده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت ($C37^\circ$)، قطر هاله عدم رشد (mm) اندازه گیری گردید. برای تعیین مقادیر MIC نانوذرات آلومینای تولید شده، بالاترین غلظت استفاده شده ۲۵۰۰ میکروگرم در یک میلی لیتر محیط کشت بود. روش کار انجام شده مطابق با روش استاندارد CLSI با تغییراتی بود که متناسب با ارزیابی نانوذرات است. در این آزمایش، دایلویشن به صورت فاکتور ۲ انجام شد و مقایسه گروه ها تنها بین رقت های نانوذره با عصاره گیاه ریواس صورت گرفت. این آزمایش به صورت میکرو دایلویشن در پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه و در محیط مولر هیتون برات انجام گردید. برای تعیین مقادیر MBC نانوذره، از چاهک هایی که رشد در آن ها مشاهده نشده بود، یک سواب برداشته و روی پلیت های مولر هیتون آگار کشت داده شدند. تشکیل نشدن کلنی در هر کدام از پلیت ها پس از ۲۴ ساعت ($C37^\circ$) انکوباسیون، نشان دهنده MBC آن غلظت از نانوذره بود (۲۱). همه آزمایش ها به صورت سه تکرار انجام گرفت.

بررسی بیان ژن های بیوفیلم: برای بررسی تأثیر نانوذرات آلومینا بر مقدار بیان ژن های تولید کننده بیوفیلم در سودوموناس آئروجینوزای مطالعه شده، بیان ژن های mv/R و $pslA$ در حضور غلظتی از نانوذره ارزیابی گردید که معادل

دمایی استفاده شد که در جدول شماره ۲ آمده است (۲۳). برای تعیین نوع پرایمر استفاده شده، ابتدا توالی ژن‌های مطالعه شده از سایت NCBI Genbank استخراج گردید و سپس با کمک نرم‌افزار Gene runner، بهترین توالی پرایمری طراحی و انتخاب شد. برای اطمینان از انطباق پرایمرها با ژن‌های مدنظر و تطابق نداشتن پرایمر، بلاست در سایت NCBI صورت گرفت. از ژن Rpos که یک ژن house keeping متعلق به خانواده ژن‌های پروتئین‌های ریبوزومی باکتری سودوموناس است، به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید. پس از انجام Real time PCR، نتایج با نرم‌افزار Relative Expression Software Tool (REST) Real time PCR تجزیه و تحلیل شد. مقایسه آماری نتایج Real time PCR توسط آزمون t مستقل و در سطح معنی داری ۰/۰۵ و با استفاده از نرم‌افزار SPSS Vol. 18 انجام گرفت.

مقدار MIC بود. این مقدار برای نانوذره ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره ریواس ۱۵۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر بود. از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط مولر هیتون براث (C37°) و کیت RT Master WizScript™ (Wizbiosolutions Inc., South Korea) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده برای استخراج RNA استفاده شد. کیفیت RNA استخراج شده با اندازه‌گیری OD (۲۸۰/۲۶۰) کنترل گردید که مناسب‌ترین نسبت آن ۲ است. برای ساخت cDNA از کیت cDNA Synthesis Kit WizScript™ (Wizbiosolutions Inc., South Korea) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده و cDNA سنتز شده بلافاصله به دمای C21°- انتقال داده شد.

برای بررسی بیان ژن‌های بیوفیلیم از Real-Time PCR و توسط پرایمرهایی استفاده گردید که توالی آن‌ها در جدول شماره ۱ آمده است (۲۲). برای انجام واکنش از برنامه

جدول شماره ۱. پرایمرهای استفاده شده برای انجام Real time PCR به منظور بررسی بیان ژن‌های بیوفیلیم

Product length (bp)	Sequence (5'-3')	Gene
145	Forward: GCTTCGCCTGATCCCTTACA	MvfR
	Reverse: GCGTATCAGGCTGACCATGT	
107	Forward: GCGCTGTTCCTGCTGTACTA	pslA
	Reverse: CAGGCGAAGAACATGATGCG	
150	Forward: ATGCCGTTACGTCGACGAC	Rpos (housekeeping)
	Reverse: CTAGCTAGCAGTCTGACGT	

جدول شماره ۲. برنامه دمایی Real-Time PCR به منظور بررسی بیان ژن‌های مطالعه شده

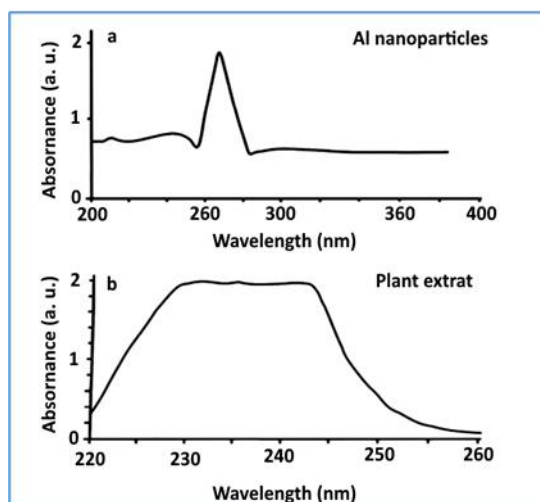
مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
Preincubation	۹۵	۱۰ دقیقه	۱
Amplification	۹۵	۲۰ ثانیه	۴۵
	دمای ذوب پرایمر	۳۰ ثانیه	
	۷۲	۳۰ ثانیه	
Melting	۹۵	۱۰ ثانیه	۱
	۶۰	۶۰ ثانیه	
	۹۷	۱ ثانیه	
Cooling	۳۷	۳۰ ثانیه	۱

سونیکاسیون، رنگ محلول حاوی عصاره هیدروآلکیلی گیاه ریواس و محلول نترات آلومینیوم (۱ مولار) از زرد به قهوه‌ای تیره تغییر یافت که نشان‌دهنده تولید نانوذره اکسید آلومینیوم

یافته‌های پژوهش

نتایج بررسی تشکیل نانوذره آلومینا: پس از ۴۸

(شکل شماره ۲. سمت چپ)، با اطمینان می‌توان گفت، این نانوذرات با استفاده از احیا توسط عصاره هیدروالکلی ریواس سنتز شده‌اند. گذشته از این، مقایسه پیک UV-vis مربوط به عصاره هیدروالکلی که تنها در محدوده کمتر از ۲۵۰ نانومتر بود، تأییدی بر این واقعیت است که این پیک (۲۷۱ نانومتر) ناشی از سنتز نانوذرات آلومینیوم است.



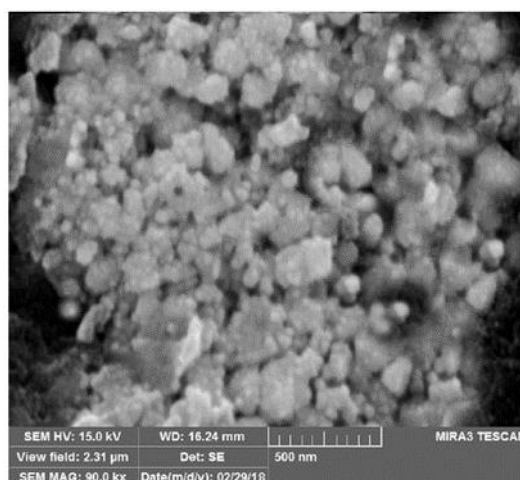
شکل شماره ۲. راست. تغییر رنگ محلول حاوی عصاره هیدروالکلی گیاه ریواس و محلول نیترات آلومینیوم از زرد (A) به قهوه‌ای تیره (B)؛ چپ. نتایج طیف‌سنجی UV-vis حاصل از نانوذرات آلومینا (a) و عصاره هیدروالکلی ریواس (b)

بررسی شد (شکل شماره ۳). ذرات نانو ایجادشده حاصل از عصاره هیدروالکلی ریواس اندازه‌ای بین ۵۰ تا ۳۰۰ نانومتر داشتند.

یا آلومینا بود (شکل شماره ۲. سمت راست). برای بررسی و تأیید تشکیل نانوذرات آلومینا از عصاره هیدروالکلی ریواس، مقادیر جذب UV-vis بررسی شد. از آنجاکه نانوذرات آلومینیوم در محدوده ۲۵۰-۳۰۰ نانومتر پیک رزونانس دارند (۱۹) و در طیف‌سنجی UV-vis مشخص گردید که نانوذره ایجادشده در طول‌موج ۲۷۱ نانومتر بیشترین جذب را دارد



نتایج بررسی نانوذره آلومینا توسط میکروسکوپ الکترونی SEM: در مرحله دوم، به‌منظور اطمینان از سنتز نانوذرات ایجادشده، در زیر میکروسکوپ الکترونی SEM



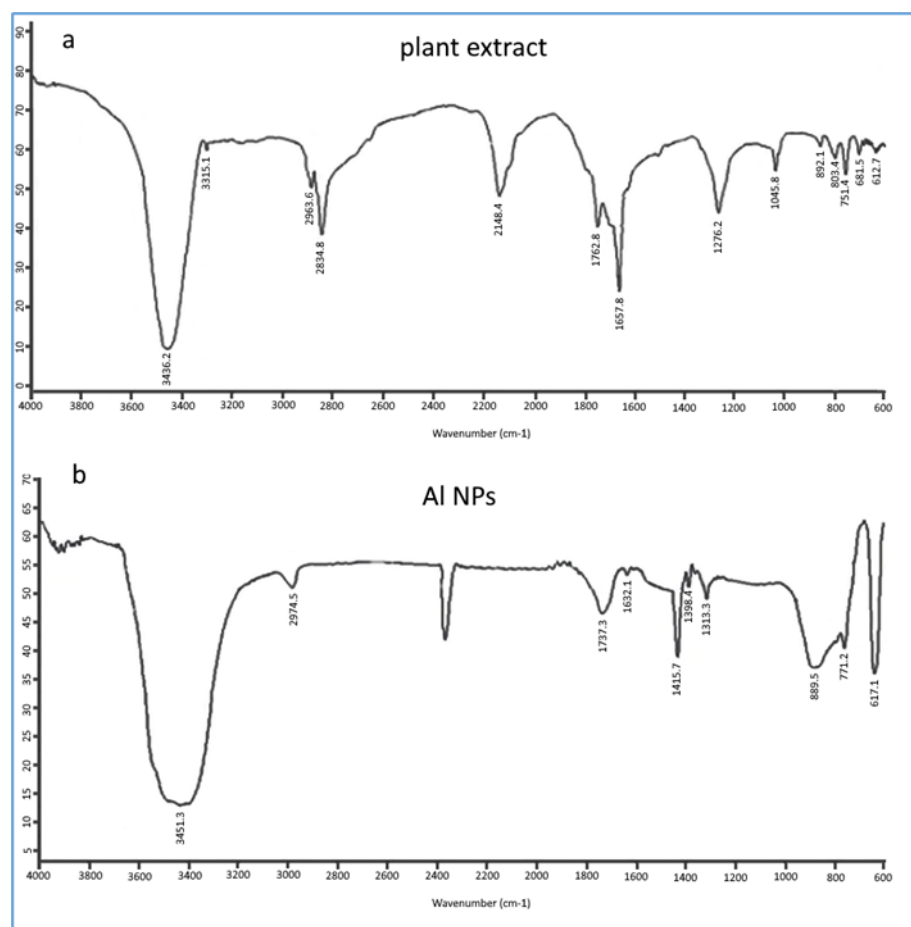
شکل شماره ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM از نانوذره آلومینای سنتز شده

محدوده ۴۰۰-۵۰۰ cm-1 انجام شد (شکل شماره ۴). نتایج این تجزیه و تحلیل به‌صورت دو طیف عصاره هیدروالکلی ریواس و نانوذرات آلومینا در شکل شماره ۴ نشان داده شده است.

نتایج تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی مادون قرمز نانوذرات آلومینا: آزمون طیف‌سنجی FTIR به‌منظور شناسایی گروه‌های فعال و گروه‌های احیاکننده یون‌های آلومینیوم در

موقعیت‌های ۱۷۳۷ و ۲۳۶۴ می‌تواند مربوط به گروه‌های آلکن، کربونیل و هیدروکسیلی قندهای احیاکننده باشد.

پیک‌های مربوط به ارتعاشات در طول موج‌های ۳۴۵۲ و ۲۹۷۴ مختص به گروه‌های هیدروکسیل و آلکیل در ترکیبات احیاکننده موجود در عصاره است. پیک‌های دیگر در

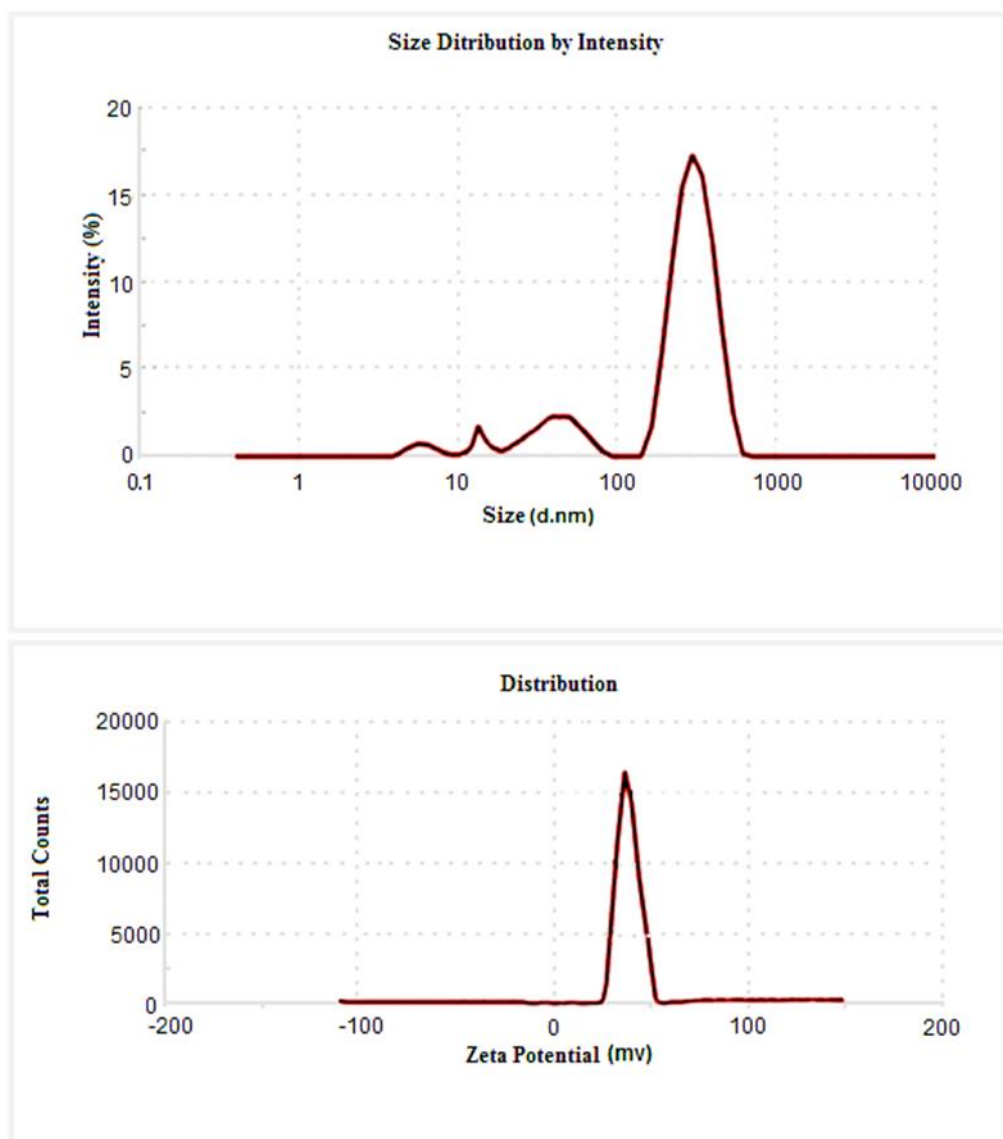


شکل شماره ۴. نتایج تجزیه و تحلیل به صورت دو طیف عصاره هیدروالکلی ریواس و نانوذره

نانوذرات در محدوده ۴۳ میلی‌ولت است. همان‌طور که در تصویر میکروسکوپ SEM نشان داده شد، اندازه نانوذرات ۵۰ تا ۳۰۰ نانومتر بود، درحالی‌که در تجزیه و تحلیل DLS، توزیع اندازه ذرات به صورت پیک ماکزیمم ۴۸۵ نانومتری بود. این اختلاف ناشی از هیدراته شدن نانوذرات در فاز آبی است که در تجزیه و تحلیل DLS مشاهده می‌گردد. درواقع، این روش قطر هیدرودینامیکی نانوذرات را اندازه می‌گیرد که در اغلب اوقات بزرگ‌تر از اندازه‌ای است که توسط میکروسکوپ الکترونی تعیین می‌شود؛ همچنین پتانسیل زتا که نشان‌دهنده بار سطحی نانوذرات است، نقش مؤثری در پایداری آن‌ها دارد. این شاخص نشان می‌دهد که نانوذراتی که بار سطحی آن‌ها بیشتر از ۳۰+ و کمتر از ۳۰- باشند، به علت غلبه نیروی دافعه، پایداری بیشتری در نانوذرات

بررسی اندازه و بار سطحی ذره‌ای نانوذرات آلومینا: نتایج تجزیه و تحلیل نانوذرات با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی در شکل شماره ۵ نشان داده شده است. همان‌گونه که در قسمت بالای این شکل دیده می‌شود، بیشترین توزیع اندازه نانوذرات در محدوده ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر دیده شد و در این محدوده، یک پیک اصلی در ناحیه ۴۸۵ نانومتری ظاهر گردید که نشان از یکدست بودن اندازه نانوذرات به دست آمده در این محدوده داشت؛ همچنین همان‌طور که در قسمت پایین این شکل دیده می‌شود، اندازه بار سطحی ذره‌ای نانوذرات در محدوده ۵۵-۲۵ میلی‌ولت به دست آمد و یک پیک اصلی آن مقدار عددی ۴۳ میلی‌ولت را نشان داد؛ پس می‌توان گفت که میزان بار سطحی ذره‌ای نانوذرات در محدوده ۵۵-۲۵ میلی‌ولت و بار سطحی بیشتر

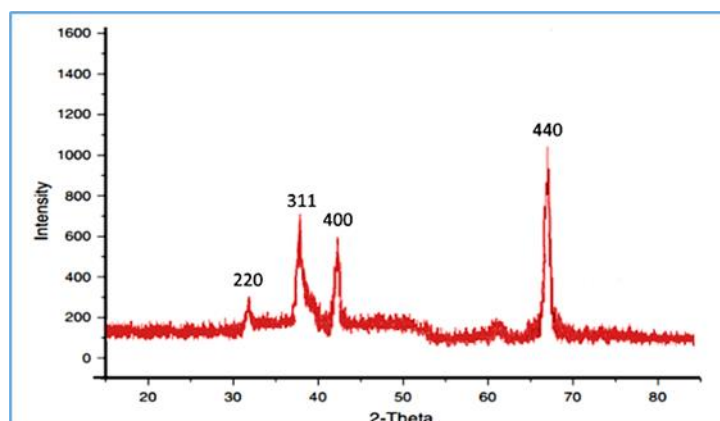
تولیدشده وجود دارد و اثر تجمع در آن‌ها به‌طور مؤثری کاهش می‌یابد (۲۴).



شکل شماره ۵. نمودار توزیع اندازه نانوذرات (بالا) و بار سطحی ذره‌ای نانوذرات (پایین) به‌دست آمده با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی

۴۵/۹۲، ۶۱/۰۵ و ۶۷/۰۲، مؤید وجود صفحات با شدت ۲۲۰، ۳۱۱، ۴۰۰ و ۴۴۰ است. این نتایج نشان‌دهنده یک ساختار کریستالی مکعبی در نانوذره آلومینا بود (شکل شماره ۶).

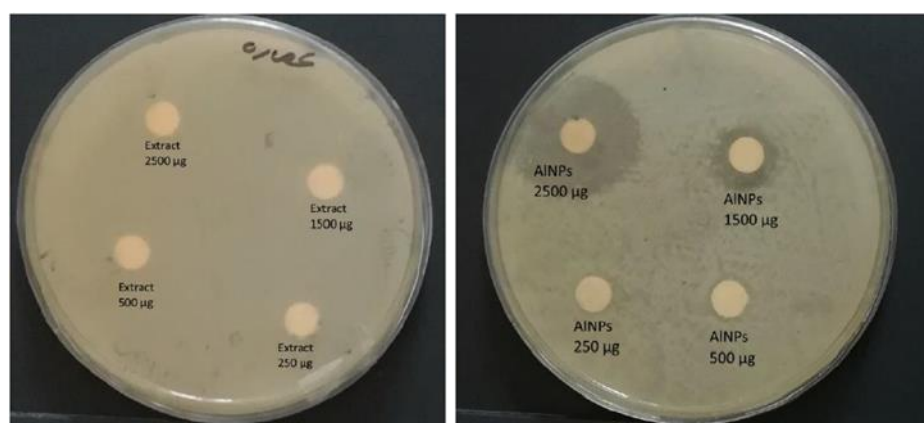
تجزیه و تحلیل پراش اشعه ایکس: طیف XRD نشان‌دهنده وجود کریستال‌های نانوذرات آلومینا است. وجود صفحات کریستالی در ۲- θ های ۳۲/۱۲، ۳۷/۲۳، ۶۳/۶۱



شکل شماره ۶. تجزیه و تحلیل پراش اشعه ایکس نانوذرات

غلظت‌های یادشده، تأثیری بر رشد باکتری مطالعه‌شده نداشت؛ اما نانوذرات در غلظت‌های ۱۵۰۰ (μg/mL) و ۲۵۰۰ مانع از رشد باکتری گردید. مقادیر قطر هاله عدم رشد برای این غلظت‌ها به ترتیب $12/4 \pm 2/3$ و $27/3 \pm 3/2$ اندازه‌گیری شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات آلومینا: نتایج آزمایش انتشار دیسک نانوذرات آلومینا و نیز عصاره هیدروالکلی ریواس که در چهار غلظت مختلف روی باکتری سودوموناس آئروجینوزا انجام گرفت، در شکل شماره ۷ نشان داده شده است. نتایج نشان داد، عصاره در هیچ کدام از



شکل شماره ۷. نتایج آزمایش انتشار دیسک حاصل از نانوذره (راست) و عصاره هیدروالکلی ریواس (چپ) بر باکتری سودوموناس آئروجینوزا

است. در این جدول، سه معیار ارزیابی اثر ضد میکروبی برای نانوذره و عصاره هیدروالکلی ریواس اندازه‌گیری شده است.

در جدول شماره ۳، تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره آلومینا بر باکتری سودوموناس آئروجینوزا نشان داده شده

جدول شماره ۳. تجزیه و تحلیل پراش اشعه ایکس نانوذرات

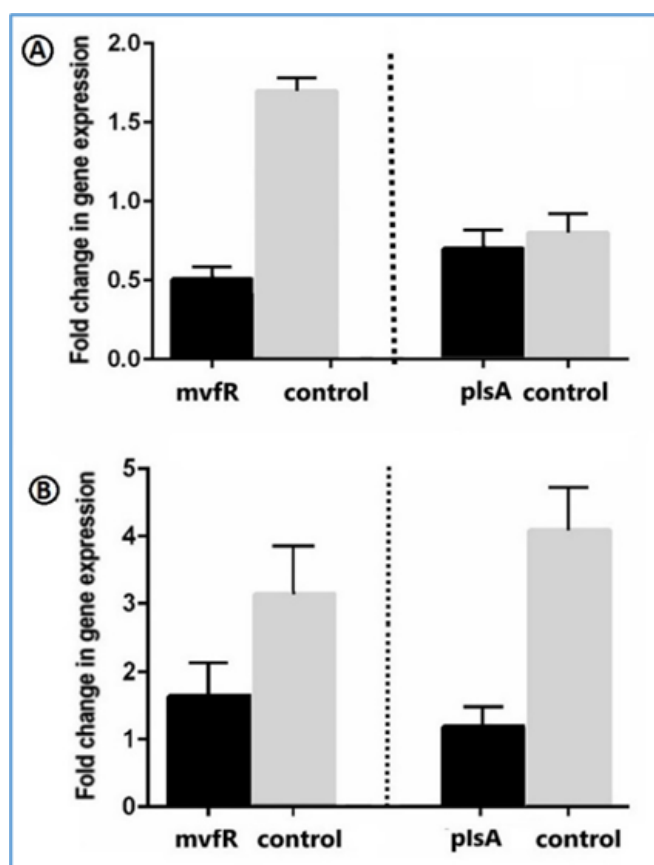
آزمایش	MIC (μg/mL)	MBC (μg/mL)	قطر هاله ضد میکروبی (mm)	ضدیوفیلیمی (μg/mL)
نانوذره	۱۰۰۰	۱۵۰۰	$27/3 \pm 3/2$	۷۵۰
عصاره ریواس	۲۵۰۰	—	—	—

غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و عصاره هیدروالکلی ریواس در غلظت ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به طور معنی‌داری بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با تشکیل بیوفilm، یعنی

بررسی بیان ژن‌های بیوفilm: همان‌طور که در شکل شماره ۸ قابل مشاهده است، نتایج سنجش بیان ژن به روش Real-time PCR نشان داد که تیمار با نانوذرات آلومینا در

mvfR و *plsA* را کاهش می‌دهد. این نتایج مؤید تأثیر بازدارندگی هر دو عامل مطالعه‌شده بر سازوهای مولکولی تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروجینوزا است. جدول شماره ۴ نشان‌دهنده محاسبات آماری و مقایسه میان گروه کنترل و ژن‌های تیمار شده با نانوذرات و عصاره است. نتایج نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار بیان ژن *mvfR* در گروه تیمار با نانوذرات آلومینا به میزان ۱/۷ برابر است که در کنترل ۳/۲ برابر بود. این کاهش معادل ۴۶/۸۸ درصد و از نظر آماری معنی‌دار است ($P < 0.01$). بیان ژن *plsA* نیز تحت تأثیر نانوذرات آلومینا از ۴/۲ برابر در کنترل به ۱/۲ برابر در گروه تیمار رسید که نشان‌دهنده کاهش چشمگیر ۷۱/۴۲ درصد است و این کاهش نیز از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.01$). تیمار با عصاره ریواس سبب کاهش بیان ژن *mvfR* از ۱/۷ برابر (کنترل) به ۰/۵ برابر شد که بیان‌کننده کاهش ۷۰/۵۸ درصد و از نظر آماری معنی‌دار است ($P < 0.01$). درباره ژن *plsA*، کاهش بیان از ۰/۷۱ برابر در کنترل به ۰/۶۷ برابر در گروه تیمار مشاهده گردید که از نظر عددی کاهش اندکی (۵/۶۳ درصد)

را نشان می‌دهد؛ اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P < 0.05$). در مقایسه تأثیر دو عامل تیماری، نانوذرات آلومینا بیشترین اثر بازدارندگی را بر بیان ژن *plsA* داشتند (کاهش ۷۱/۴۲ درصد)، در حالی که عصاره ریواس قوی‌ترین اثر را بر ژن *mvfR* نشان داد (کاهش ۷۰/۵۸ درصد). به‌طور کلی، هر دو عامل توانایی کاهش بیان ژن‌های بیوفیلم را دارند؛ اما الگوی تأثیرگذاری آن‌ها متفاوت است. نانوذرات آلومینا به‌طور یکسان بر هر دو ژن تأثیر قوی داشتند، در حالی که عصاره ریواس به‌صورت انتخابی بیان *mvfR* را مهار کرد. با توجه به تحلیل آماری انجام‌شده می‌توان ادعا کرد که نانوذرات آلومینا در غلظت مطالعه‌شده به‌طور معنی‌داری بیان هر دو ژن *mvfR* و *plsA* را کاهش می‌دهند. از سویی، عصاره هیدروالکلی ریواس به‌طور معنی‌دار بیان ژن *mvfR* را کاهش می‌دهد؛ اما تأثیر آن بر ژن *plsA* از نظر آماری معنی‌دار نیست. این یافته‌ها نشان می‌دهد که هر دو عامل می‌توانند به‌عنوان عوامل بازدارنده بالقوه در کنترل تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا مورد توجه قرار گیرند.



شکل شماره ۸. اثر نانوذرات آلومینای ساخته شده (پایین) و عصاره هیدروالکلی گیاه ریواس (بالا) بر بیان ژن‌های تولیدکننده بیوفیلم در باکتری

سودوموناس آئروجینوزا

جدول شماره ۴. با استفاده از فرمول t-test و محاسبه درجه آزادی (df) و مقایسه با مقادیر بحرانی t

مقایسه گروه‌ها	t-value	df	P-value	معنی داری
mvfR کنترل و عصاره ریواس	۶/۹۳	۲/۸	<0.01	**
plsA کنترل و عصاره ریواس	۴/۳۳	۳/۱	< 0.05	*
mvfR کنترل و نانوذرات آلومینا	۷/۷۵	۲/۵	<0.01	**
plsA کنترل و نانوذرات آلومینا	۳/۸۷	۳/۵	< 0.05	*

بحث و نتیجه گیری

عفونت‌های ایجاد شده توسط سودوموناس آئروجینوزا اغلب شدید و تهدیدکننده زندگی است؛ همچنین به علت وجود سازوکارهای ذاتی و اکسایشی مقاومت به عوامل ضد میکروبی، غالباً جلوگیری از انتشار این باکتری در محیط‌های بیمارستانی مشکل است. این باکتری ارتباط مستقیمی با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد، به طوری که حدود ۳۱ درصد عفونت‌های بیمارستانی مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروجینوزا است (۲۵، ۲۶).

به علت موفقیت روزافزون و نیز سهولت تولید نانوذرات توسط ارگانیزم‌های مختلف، استفاده از انواع مختلف آن‌ها در این زمینه بسیار سریع توسعه یافت. بیوستر نانوذرات فلزی یک روش دوستدار محیط زیست یا شیمی سبز است که در آن از مواد شیمیایی گران قیمت، سمی و مضر استفاده نمی‌شود. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که تمایل به تولید و استفاده از مواد با ابعاد نانومتری با توجه به خصوصیات جالب این مواد، روز به روز در حال افزایش است (۲۶، ۱۴، ۵). مشخص شده است که نانوذرات بسیاری از فلزات و اکسیدهای فلزی می‌توانند اثر ضدباکتریایی داشته باشند؛ اما اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسید آلومینیوم در مقایسه با خواص ضد میکروبی شناخته شده نانوذرات اکسید فلزاتی مانند روی، نقره، آهن و مس، کمتر مطالعه شده است. به طور کلی، مطالعه دقیق‌تر خواص ضدباکتریایی نانوذرات اکسید آلومینیوم به علت سمیت اندک آن‌ها برای سلول‌های

یوکاریوتی مورد توجه بسیاری است (۱۷). در این مطالعه، با استفاده از نمک نیتрат آلومینیوم، از عصاره هیدروالکلی گیاه *R. persicum*، نانوذرات آلومینا ساخته شد. در این فرایند، تغییر رنگ عصاره از زرد به قهوه‌ای تیره نشان‌دهنده تولید نانوذره اکسید آلومینیوم یا آلومینا بود. به منظور اطمینان از تشکیل نانوذره و همچنین بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات تولید شده، تجزیه و تحلیل‌های مختلفی مانند جذب UV-vis، اسکن SEM، طیف FTIR، بررسی اندازه و بار سطحی ذره‌ای نانوذرات با کمک DLS و طیف XRD انجام گرفت. نتایج این تجزیه و تحلیل‌ها سنتر موفق نانوذرات آلومینا را از عصاره هیدروالکلی ریواس اثبات کردند. افزون بر این، برخی ویژگی‌های این نانوذرات نیز آشکار شد. پژوهشگران دیگری نیز توانسته‌اند از دیگر گیاهان، نانوذرات آلومینیوم را تولید کنند؛ به عنوان مثال، گروه ساها-لسکار (۲۷) توانستند از دانه‌های *Carica papaya* و گروه صالح و همکاران (۲۸) از دانه‌های *Phoenix dactylifera* چنین نانوذراتی را سنتر کنند. نتایج بررسی با کمک میکروسکوپ الکترونی SEM نشان داد که نانوذرات ایجاد شده اندازه‌ای بین ۳۰۰ تا ۵۰ نانومتر داشتند. از سویی، نتایج تجزیه و تحلیل DLS نشان دادند که توزیع اندازه نانوذرات در محدوده ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر و به‌ویژه در محدوده ۴۸۵ نانومتری است. این تفاوت در نتایج به علل متعددی است، از جمله اینکه DLS اندازه ذرات را بر اساس پراکندگی نور در محلول تخمین می‌زند که به آن اندازه استتاجی گفته می‌شود، در حالی که SEM اندازه فیزیکی ذرات را در حالت خشک و بدون لایه‌های آبی اندازه‌گیری

می‌کند که می‌تواند بسیار دقیق‌تر و نزدیک‌تر به اندازه واقعی ذرات فیزیکی باشد. گذشته از این، اندازه‌های حاصل از DLS معمولاً بزرگ‌تر از اندازه واقعی ذرات هستند؛ زیرا نانوذرات در محیط‌های محلول و کلئیدی، معمولاً با غشا یا لایه‌های آب‌پوش یا تجمعات همراه‌اند که اندازه را افزایش می‌دهند؛ همچنین DLS در برخورد با دستگاه‌های پیچیده، از جمله ترکیبات نانوذرات، غلظت‌های بالا و ذرات غیر کروی، محدودیت‌هایی دارد (۲۸). طیف حاصل از تجزیه و تحلیل XRD وجود کریستال‌های غیرکروی (ساختار کریستالی مکعبی) نانوذرات آلومینا را نشان داد.

حضور گروه‌های فعال و گروه‌های احیاکننده در عصاره هیدروالکلی ریواس نیز توسط طیف‌سنجی FTIR تأیید شد. این بیومولکول‌های احیاکننده که در عصاره هیدروالکلی ریواس وجود دارند، هم به‌عنوان احیاکننده و هم به‌عنوان پوشش برای نانوذرات آلومینا ایفای نقش کرده‌اند و توانسته‌اند نانوذرات را در مقابل اکسیداسیون و تبدیل به اکسید آلومینیوم محافظت کنند (۲۹).

درباره میزان و قدرت ضدباکتریایی نانوذرات آلومینای تولیدشده روی سودوموناس آئروجنیوزا و بر اساس مقادیر حاصل از تجزیه و تحلیل MIC مشخص گردید که قدرت ممانعت‌کنندگی نانوذرات ۲/۵ برابر قدرت عصاره هیدروالکلی ریواس بود (به ترتیب ۱۰۰۰ در برابر ۲۵۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر).

همچنین مقدار MBC نانوذرات آلومینا ۱۵۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر تعیین شد، درحالی که عصاره هیدروالکلی به‌تنهایی، حتی در غلظت ۲۵۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر نیز، قادر به کشتن باکتری مطالعه‌شده نبود؛ بنابراین، می‌توان گفت که میزان و قدرت ضدباکتریایی نانوذرات آلومینای حاصل از عصاره هیدروالکلی ریواس بسیار بیشتر از عصاره آن است.

نبی‌پور و همکاران (۳۱) به بررسی مقایسه‌ای آثار آنتی‌باکتریال نانو پارتیکل‌های نقره بر باکتری‌های سودوموناس آئروجنیوزا و استافیلوکوکوس اورئوس پرداختند. نتایج تجزیه و تحلیل آماری مشخص کرد که در

چگالی ۰/۵ درصد، نانوذرات باکتری کشت هستند و می‌توانند ۱۰۰ درصد این باکتری‌ها را از بین ببرند و در تراکم ۰/۱ درصد برای هر دو باکتری، باکتریوستاتیک است؛ همچنین آنان مشاهده کردند که باکتری‌ها پس از تماس با نانوذرات از بین رفتند؛ بنابراین، استفاده از نانوذرات فلزی می‌تواند به‌عنوان روش جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها برای مقابله با عفونت‌های باکتریایی باشد.

انصاری و همکاران (۳۲) نیز به سنتز سبز نانوذرات Al_2O_3 از عصاره برگ‌های *Cymbopogon citratus* و بررسی آثار ضدباکتری آن‌ها در برابر جدایه‌های بالینی مقاوم چنددارویی سودوموناس آئروجنیوزا پرداختند. این گروه در نتایج خود اعلام کردند که این نانوذرات به شکل کاملاً مؤثری موجب حذف و از بین بردن باکتری مقاوم سودوموناس آئروجنیوزا می‌شود و توانایی آن به‌مراتب بالاتر از آنتی‌بیوتیک‌ها است. محدوده MIC و MBC به‌دست آمده توسط این گروه به ترتیب ۳۲۰۰-۱۶۰۰ میکروگرم در میکرولیتر و ۶۴۰۰-۳۲۰۰ میکروگرم در میکرولیتر ثبت شد. نانوذره تولیدشده گروه ما (با مقادیر MIC و MBC به ترتیب ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر)، قدرتمندتر از نتایج این گروه بود.

رجایی و همکاران (۳۳) بررسی فعالیت مهارکنندگی نانوذرات اکسید روی در سویه‌های سودوموناس آئروجنیوزای جداشده از زخم‌های سوختگی اقدام کردند. در این بررسی، سودوموناس آئروجنیوزا به آنتی‌بیوتیک‌های پیراسیلین، توبرامایسین، جنتامایسین حساسیت نشان داد. نانوذرات اکسید روی ۵ نانومتری در غلظت ۲۵۰۰۰، ۵۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، فعالیت ضدباکتریایی علیه سودوموناس آئروجنیوزا جداشده از زخم سوختگی داشت. هنگامی که اندازه این نانوذرات بزرگ‌تر شد (۱۰۰ نانومتر)، تنها در غلظت‌های بالا، یعنی ۱۰۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، فعالیت ضدباکتریایی نشان داد. نتایج این مطالعه نشان داد که نخست، نانوذرات اکسید روی اثر مهار بر سودوموناس آئروجنیوزا دارد و گذشته از آن، با افزایش غلظت و کاهش اندازه نانوذرات، فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها افزایش می‌یابد.

مولکول‌های سیگنالی آسپیل هوموسرین لاکتون رقابت کنند یا از اتصال آن‌ها به گیرنده‌های سلولی جلوگیری نمایند. این تداخل انتخابی تر در دستگاه ارتباط سلولی، توجیه‌کننده تأثیر قوی تر عصاره بر ژن *mvfR* در مقایسه با *plsA* است (۳۷). به‌طور کلی، نانوذرات آلومینا به‌عنوان یک عامل فیزیوکوشیمیایی با اثر وسیع‌الطیف خود و عصاره ریواس به‌عنوان یک مهارکننده زیستی هدفمندتر عمل می‌کنند.

در پژوهشی که راسمیراواکا و همکاران (۳۸) انجام دادند، مشخص شد، ترکیب Anthraquinone emodin که از ریواس (*R. palmatum* L.) استخراج شده بود، در غلظت ۲۰ μM از تشکیل بیوفیلم توسط *P. aeruginosa* جلوگیری می‌کند. نتایج این پژوهش با نتایج گروه ما همخوانی دارد.

از آنجا که *mvfR* در باکتری سودوموناس آئروجینوزا، یک تنظیم‌کننده کلیدی در مسیرهای ژنی مرتبط با کروم‌سنسینگ و تولید عوامل تنظیمی بیوفیلم است، هنگامی که این ژن مهار شود، سطح بیان بسیاری از ژن‌های مربوط به تولید و بلوغ بیوفیلم کاهش می‌یابد و در نتیجه، تشکیل بیوفیلم و رسوب ماتریکس به‌شدت کاهش می‌یابد (۳۹). مهار ژن *plsA* می‌تواند به تغییر در ترکیب ماتریکس و کاهش چسبندگی و استحکام بیوفیلم منجر گردد. با کاهش دسترسی به مواد خام لازم برای ماتریکس بیوفیلم، تشکیل بیوفیلم کاهش می‌یابد (۴۰)؛ بنابراین، وقتی هر دو ژن یا مسیر مرتبط با *mvfR* و *plsA* هم‌زمان مهار شوند، آثار افزایش‌یافته‌ای در کاهش بیوفیلم مشاهده می‌گردد؛ زیرا هم سیگنالینگ کروم‌سنسینگ و هم پلتفرم‌های چربی-غشایی که برای ساخت ماتریکس لازم است، تحت تأثیر قرار می‌گیرند؛ پس می‌توان گفت، نانوذرات آلومینای تولیدشده با کاهش بیان این دو ژن، نقش مهمی در مهار تولید بیوفیلم توسط این باکتری دارند.

گفتنی است که مطالعه حاضر در شرایط *In vitro* انجام گرفت و لازم است مطالعات تکمیلی دیگری روی نانوذرات تولیدشده با کمک عصاره هیدروالکلی ریواس انجام گیرد. این مطالعات شامل بررسی آثار سیتوتوکسیک این

اگرچه نانوذرات آلومینای سنتز شده ما بین ۱۰ تا ۶۰ برابر بزرگ‌تر از نانوذرات سنتز شده رجایی و همکاران (۳۳) بود؛ اما در غلظت‌های بسیار پایین‌تر (یعنی ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر)، در برابر باکتری سودوموناس آئروجینوزا مؤثر بود. این تفاوت می‌تواند ناشی از ماهیت متفاوت نانوذرات (آلومینا در برابر اکسید روی) و نیز سویه‌های باکتریایی مطالعه شده باشد.

گروه گودکوف و همکاران (۱۷) عنوان کردند که سودوموناس آئروجینوزا در برابر نانوذرات اکسیدهای مختلف آلومینیوم (AlOxNPs) حتی در غلظت کم (۰/۲۵-۱ میلی گرم در لیتر) نیز، در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبتی مانند *Bacillus altitudinis*، از حساسیت بالاتری برخوردار است. این امر می‌تواند نویدبخش استفاده از نانوذرات آلومینیوم به‌عنوان کاندیداهای مناسبی برای مقابله با این باکتری باشد.

اگرچه نتایج این مطالعه نشان داد که عامل نانوذرات آلومینا و عصاره هیدروالکلی ریواس به‌طور معنی‌داری بیان ژن‌های کلیدی بیوفیلم (*mvfR* و *plsA*) را در باکتری سودوموناس آئروجینوزا کاهش می‌دهند؛ اما سازوکارهای اثر آن‌ها متفاوت است. مطالعات نشان داده است که نانوذرات آلومینا به‌طور عمده از طریق القای استرس اکسیداتیو ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، تأثیر خود را اعمال می‌کنند (۳۴). این استرس می‌تواند به مولکول‌های حیاتی سلولی آسیب بزند و مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با سیستم کروم‌سنسینگ را مختل کند که نتیجه آن، کاهش بیان ژن‌های وابسته از جمله *mvfR* است (۳۵)؛ همچنین نانوذرات با داشتن بار سطحی مثبت، با غشای باکتریایی برهم‌کش می‌دهند و یکپارچگی آن را مختل می‌کنند که ممکن است انتقال سیگنال‌های محیطی و درون‌سلولی را تحت تأثیر قرار دهند. این تأثیرات فیزیوکوشیمیایی گسترده به کاهش چشمگیر هر دو ژن *mvfR* و *plsA* منجر شده است (۳۶). از سویی، عصاره ریواس از طریق سازوکارهای اثر آن، بر مهار مستقیم کروم‌سنسینگ عمل می‌کند. بر اساس مقالات مشخص شده است که ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره ریواس مانند مشتقات آنتراکینون و ترکیبات فنلی ممکن است با

حامی مالی نداشته است.

نانوذرات بر سلول-های یوکاریوت (مانند خطوط سلول جانوری و انسانی) باشد. چنانچه ثابت شود که این نانوذرات سمیتی برای این سلول‌ها ندارند، مطالعات دیگر می‌تواند شامل مطالعات دربارهٔ آثار ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی این نانوذرات در شرایط *In vivo* و در حیوانات مدل و یا حتی مطالعات بالینی باشد.

درمان مؤثر عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروجینوزا* و رابطهٔ مستقیم میان مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری با میزان بیان ژن‌های تولید بیوفیلیم آن (به‌ویژه ژن‌های *mvfR* و *plsA*) مشهود است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد، عصارهٔ هیدروالکلی ریواس و نانوذرة آلومینای تولیدشده از این گیاه می‌تواند اثر مهاری و کشندگی بسیار مناسبی بر این باکتری داشته باشد؛ اما میزان تغییر در مهار بیان ژن‌های *mvfR* و *plsA* توسط نانوذرات تولیدی نشان داد که نانوذرات بسیار مؤثرتر از عصاره بودند (تأثیر نانوذرات در ممانعت از بیان ژن *mvfR* کمی بیش از ۱/۰۴ برابر عصاره و تأثیر آن در ممانعت از بیان ژن *plsA* بیش از ۱۹/۰۲ برابر عصاره بود). بر پایهٔ نتایج می‌توان گفت که نانوذرات حاصل از عصارهٔ هیدروالکلی ریواس می‌توانند برای مهار رشد *سودوموناس آئروجینوزا* استفاده شوند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که تضاد منافعی در این مقاله وجود ندارد.

کد اخلاق

این مقاله برگرفته از بخشی از پایان‌نامه با عنوان «تولید نانوذرات آلومینا با استفاده از عصارهٔ هیدروالکلی ریواس و تأثیر آن بر ژن‌های مسیر تولید بیوفیلیم در *سودوموناس آئروجینوزا* با استفاده از Real Time PCR» است که در سطح کارشناسی ارشد با کد مصوب ۸۳۴۶۰۱۶۵ توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد تکمیل شده است. نویسندگان از ساخت داده‌ها، جعل، سرقت ادبی و سوءرفتار اجتناب کردند. با توجه به نداشتن آزمایش حیوانی، نیازی به اخذ کد اخلاق نبود.

حمایت مالی

نویسندگان این مقاله اظهار می‌دارند که این پروژه

References

- Schwartz B, Klamer K, Zimmerman J, Kale-Pradhan PB, Bhargava A. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in clinical settings: a review of resistance mechanisms and treatment strategies. *Pathogens*. 2024; 13:975. doi: 10.3390/pathogens13110975.
- Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2022; 7:199. doi:10.1038/s41392-022-01056-1.
- Abou Elez RM, Zahra EMF, Gharieb RMA, et al. Resistance patterns, virulence determinants, and biofilm genes of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fish and fish handlers. *Sci Rep*. 2024; 14:24063. doi:10.1038/s41598-024-73917-4.
- Pinto H, Simões M, Borges A. Prevalence and impact of biofilms on bloodstream and urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10:825. doi:10.3390/antibiotics10070825.
- Kunisch F, Campobasso C, Wagemans J, et al. Targeting *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with an evolutionary trained bacteriophage cocktail exploiting phage resistance trade-off. *Nat Commun*. 2024; 15:8572. doi: 10.1038/s41467-024-52595-w
- Lima EMF, Bueris V, Germano LG, Sircili MP, Pinto UM. Synergistic effect of the combination of phenolic compounds and tobramycin on the inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Microb Pathog*. 2024; 197:107079. doi: 10.1016/j.micpath.2024.107079.
- Emami S, Nikokar I, Ghasemi Y, et al. Antibiotic resistance pattern and distribution of *pslA* gene among biofilm producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from waste water of a burn center. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8: e23669. doi: 10.5812/ijm.23669.
- Ghasemi G, Fattahi M, Alirezalu A. Screening genotypes and optimizing ultrasonic extraction of phenolic antioxidants from *Rheum ribes* using response surface methodology. *Sci Rep*. 2024; 14:21544. doi: 10.1038/s41598-024-72214-4.
- Jafari A, Taheri G, Bradaran B, Bahrami AR. *Rheum khorasanicum* (Polygonaceae), a new species from Iran. *Ann Bot Fenn*. 2012; 49:255-258. doi: jstor.org/stable/23728161.
- Yolbas I. Phenolic compound content and antioxidant activity of *Rheum ribes* shells. *Hindawi*. 2024; 2024:9151180. doi: 10.46460/ijiea.1390339.
- Kazemi S, Hosseingholian A, Gohari SD, Feirahi F, Moammeri F, Mesbahian G, et al. Recent advances in green synthesized nanoparticles: from production to application. *Mater Today Sustain*. 2023; 24:100500. doi: 10.1016/j.mtsust.2023.100500.
- Omeiri M, Hadidi E, Awad R, Boukhari J, Yusef H. Aluminum oxide, cobalt aluminum oxide, and aluminum-doped zinc oxide nanoparticles as an effective antimicrobial agent against pathogens. *Heliyon*. 2024;10: e31462. doi: 10.1016/j.heliyon. 2024.e31462.
- Srinivasan LV, Rana SS. A critical review of various synthesis methods of nanoparticles and their applications in biomedical, regenerative medicine, food packaging, and environment. *Discov Appl Sci*. 2024; 6:371. doi: 10.1007/s42452-024-06040-8.
- Usman O, Mohsin Baig MM, Ikram M, et al. Green synthesis of metal nanoparticles and study their anti-pathogenic properties against pathogens effect on plants and animals. *Sci Rep*. 2024; 14:11354. doi: 10.1038/s41598-024-61920-8.
- Belcheva M, Georgiev G, Tsyntsarski B, Szeluga U, Kabaivanova L. Antibacterial properties of metal nanoparticles-incorporated activated carbon composites produced from waste biomass precursor. *Diam Relat Mater*. 2024; 141:110545. doi: 10.1016/j.diamond.2023.110545.
- Mondal SK, Chakraborty S, Manna S, Mandal SM. Antimicrobial nanoparticles: current landscape and future challenges. *RSC Adv*. 2024; 1:388-402. doi: 10.1039/D4PM00032C.
- Gudkov SV, Burmistrov DE, Smirnova VV, Semenova AA, Lisitsyn AB. A mini review of antibacterial properties of Al₂O₃ nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*. 2022; 12:2635. doi:10.3390/nano12152635.
- Manikandan V, Jayanthi P, Priyadharsan A, et al. Green synthesis of pH-responsive Al₂O₃ nanoparticles: application to rapid removal of nitrate ions with enhanced antibacterial activity. *J Photochem Photobiol a Chem*. 2019; 371:205-15. doi: 10.1016/J.JPHOTOCHEM.2018.11.009.
- Arif M, Razaa H, Akhter T. UV-Vis spectroscopy in the characterization and applications of smart microgels and metal nanoparticle-decorated smart microgels: a critical review. *RSC Adv*. 2024; 14:2024. doi: 10.1039/d4ra07643e.
- Kamnev AA, Dyatlova YA, Kenzhegulov OA, Vladimirova AA, Mamchenkova PV, Tugarova AV. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic analyses of microbiological samples and biogenic selenium nanoparticles of microbial origin: sample preparation effects. *Molecules*. 2021; 26:1146. doi: 10.3390/molecules26041146.
- Jyolsna P, Gowthami V, Aseen AH. Adsorption performance with field emission scanning

- electron microscopy of fruit peel induced silver nanoparticles in $C_{16}H_{18}ClN_3S$ for waste water treatment. *MethodsX*. 2024; 13:102951. doi: 10.1016/j.mex.2024.102951.
22. Zamanpour S, Eraghi V, Hashemi M, Ram M, Afshari A. Optimizing real-time PCR for accurate identification and quantification of common probiotic bacteria in Iranian probiotic dairy products. *Indian J Microbiol*. 2024; 65:1891-1905. doi:10.1007/s12088-024-01325-3.
 23. Marzban A, Azadeh N, Vida T, Shiva AF. Multifunctional hydrogel of zein-tartaric acid encapsulated with oregano essential oils to combat *Pseudomonas aeruginosa* through biofilm inhibition. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2025; 108:106934. doi: 10.1016/j.jddst.2025.106934.
 24. Shakib P, Mirzaei SZ, Sharafi Z, et al. Biofabrication of copper oxide nanoparticles mediated with *Echium amoenum* petal extract for evaluation of biological functions. *Biomass Conv Bioref*. 2024; 14:25651-25661. doi:10.1007/s13399-023-04796-4.
 25. Guesmi M, Ben Hmida M, Smaoui S, et al. A comprehensive methodology for identifying *Pseudomonas aeruginosa* strains exhibiting biofilm and virulence factor traits and assessment of biofilm resistance against commercial disinfectant. *Microbiol Res*. 2025; 16:62. doi: 10.3390/microbiolres16030062.
 26. Azimzadeh M, Greco G, Farmani A, et al. Biofilm inhibition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* using green-synthesized silver nanoparticles and colistin. *Sci Rep*. 2025; 15:14993. doi: 10.1038/s41598-025-00005-6.
 27. Laskar I, Saha R. Synthesis of aluminum oxide nanoparticles using seeds of *Carica papaya* and evaluation of it for antimicrobial, antioxidant, and photocatalysis activity. *J Anal Sci Technol*. 2024; 15:52. doi: 10.1186/s40543-024-00468-8.
 28. Saleh AK, Shaban AS, Diab MA, et al. Green synthesis and characterization of aluminum oxide nanoparticles using *Phoenix dactylifera* seed extract along with antimicrobial activity, phytotoxicity, and cytological effects on *Vicia faba* seeds. *Biomass Conv Bioref*. 2024; 14:31859-75. doi: 10.1007/s13399-023-04800-x.
 29. Rodriguez-Loya J, Lerma M, Gardea-Torresdey JL. Dynamic light scattering and its application to control nanoparticle aggregation in colloidal systems: a review. *Micromachines*. 2024; 15:24. doi: 10.3390/mi15010024.
 30. Do JM, Hong JW, Yoon HS. Microalgae-mediated green synthesis of silver nanoparticles: a sustainable approach using extracellular polymeric substances from *Graesiella emersonii* KNUA204. *Front Microbiol*. 2025; 16:1589285. doi: 10.3389/fmicb.2025.1589285.
 31. Nabipour Y, Rostamzad A, Ahmadyasbchin S. The evaluation of antimicrobial properties of zinc and silver nanoparticles on pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Sci J Ilam Univ Med Sci*. 2015; 20:3.5.
 32. Ansari M, Khan H, Alzohairy M, Jalal M, Syed GA, Musarrat J. Green synthesis of Al_2O_3 nanoparticles and their bactericidal potential against clinical isolates of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016; 31:153-164. doi: pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25304025.
 33. Rajaei S, Seychani M, Yousefi M. Investigation of nano-oxidizing inhibitory activity in *Pseudomonas aeruginosa* strains separated from burn wounds. *J Qom Univ Med Sci*. 2014; 18:30-37.
 34. Mestres G, Espanol M, Xia W, Tenje M, Ott M. Evaluation of biocompatibility and release of reactive oxygen species of aluminum oxide-coated materials. *ACS Omega*. 2016; 1:706-13. doi: 10.1021/acsomega.6b00198.
 35. Shao X, Yao C, Ding Y, Hu H, Qian G, He M, et al. The transcriptional regulators of virulence for *Pseudomonas aeruginosa*: therapeutic opportunity and preventive potential of its clinical infections. *Genes Dis*. 2023; 10:2049-2063. doi: 10.1016/j.gendis.2022.09.009.
 36. Wheeler KM, Oh MW, Fusco J, Mershon A, Kim E, De Oliveira A, et al. *MvfR* shapes *Pseudomonas aeruginosa* interactions in polymicrobial contexts: implications for targeted quorum-sensing inhibition. *Cells*. 2025; 14:744. doi: 10.3390/cells14100744.
 37. Bernabè G, Marzaro G, Di Pietra G, Otero A, Bellato M, Pauletto A, et al. A novel phenolic derivative inhibits AHL-dependent quorum sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Pharmacol*. 2022; 13:996871. doi: 10.3389/fphar.2022.996871.
 38. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:759348. doi: 10.1155/2015/759348.
 39. Azimzadeh M, Greco G, Farmani A, et al. Biofilm inhibition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* using green-synthesized silver nanoparticles and colistin. *Sci Rep*. 2025; 15:14993. doi:10.1038/s41598-025-00005-6.
 40. Liu Q, Wu Q, Liu J, Xu T, Liu J, Wu Q, et al. New insights into the mediation of biofilm formation by three core extracellular polysaccharide biosynthesis pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 2025;26:3780. doi:10.3390/ijms26083780.