

The investigation of antibacterial activity of bohemite-gold and bohemite-gold-chitosan on bacteria causing infection in skin wounds

Hilda Parastar¹, Mohammad Reza Farahpour^{2*}, Rasoul Shokri¹, Saeed Jafarirad³, Mohsen Kalantari¹

1. Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

3. Basic Science Research Center, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

Aim and Background: Nanocomposites are prepared from various materials that may have antibacterial activity. This study aimed to investigate antibacterial and antifungal activities of nanocomposites of bohemite-gold and bohemite-gold-chitosan by help of aqueous extract of peppermint.

Material and methods: In the current study, the nanocomposites were prepared by exextracellular biosynthesis and antibacterial properties were investigated by minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and killing-time curve by classic method of consecutive dilutions by Clinical & Laboratory Standards Institute.

Results: The results showed that MIC and MBC were 10 µg/mL and 20 µg/mL for bohemite group, respectively. The results also showed that MIC and MBC were 2.50 µg/mL and 5 µg/mL against *Acinetobacter baumannii* and 5 µg/mL and 10 µg/mL against *Escherichia coli*, respectively. The greatest antibacterial activity for of bohemite-gold and bohemite-gold-chitosan was observed for a period of 6 to 24 h. Based on our findings, bohemite showed lower antibacterial activity compared with bohemite-gold and bohemite-gold-chitosan against the mentioned bacteria.

Conclusion: The prepared nanocomposites did not show any antifungal activity. Thus, bohemite-gold and bohemite-gold-chitosan nanocomposites have antibacterial activities against bacteria inducing infection in wound.

Keywords: Nanocomposite, Chitosan, Bohemite, Gold, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, Infected wound, Iau Science.

Corresponding author:

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

Email: m.farahpour@iaurmia.ac.ir

بررسی اثرات ضد باکتریایی نانوکامپوزیت‌های

بوهمیت - طلا و بوهمیت - طلا - کیتوزان

بر باکتری‌های ایجادکننده زخم‌های عفونی در پوست

هیلدا پرستار^۱، محمدرضا فرهپور^{۲*}، رسول شکری^۱، سعید جعفری راد^۲، محسن کلانتری^۱

۱. مرکز تحقیقات زیست‌شناسی ایران، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

۲. گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

۳. دانشکده شیمی، دانشگاه سراسری تبریز، تبریز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: نانو کامپوزیت‌ها از ترکیبات مختلفی تهیه میشوند و میتوانند دارای خاصیت آنتی باکتریایی باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد باکتریایی نانو کامپوزیت‌های بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوزان به کمک عصاره آبی گیاه نعناع فلفلی میباشد. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه نانو کامپوزیت‌های بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوزان به روش بیوسنتز خارج سلولی تهیه شدند، سپس خواص ضد باکتریایی آنها با روش‌های تعیین حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت کشندگی و سنجش زمان مرگ باکتری‌ها با روش کلاسیک تهیه رفتهای متوالی کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاهی تعیین و گزارش گردید. **یافته‌ها:** بر اساس نتایج به دست آمده، حداقل غلظت‌های بازدارندگی و کشندگی برای گروه بوهمیت به ترتیب ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. بر اساس نتایج، حداقل غلظت‌های بازدارندگی و کشندگی برای گروه‌های بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوزان علیه باکتری *اسینتوباکتر بومانی* و به ترتیب ۲/۵۰ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری *اشریشیا کلی* به ترتیب ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. بیشترین فعالیت ضد باکتریایی نانو کامپوزیت بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوزان برای دوره ۶ تا ۲۴ ساعته بود. **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده در تمام مطالعات انجام گرفته، بوهمیت دارای فعالیت ضد باکتریایی کمتری در مقایسه با گروه‌های بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوزان در مقابل باکتریهای مذکور بود. نانو کامپوزیت‌های بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوزان دارای اثرات ضد میکروبی روی باکتریهای عفونی کننده ی زخم هستند.

واژگان کلیدی: نانو کامپوزیت، کیتوزان، بوهمیت، طلا، *اسینتوباکتر بومانی*، *اشریشیا کلی*، زخم عفونی، Iau Science.

مقدمه

بهره‌گیری از فناوری نانو و سنتز ترکیبات ضد باکتریایی است که مورد توجه پژوهشگران در جهت مقابله با ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها می‌باشد. نانو ذرات (مواد در مقیاس ۱۰۰-۱ نانومتر) دارای ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی منحصر به فردی همانند واکنش پذیری بالا، نسبت بالاتر سطح به حجم، ویژگی‌های الکتریکی و مغناطیسی و نوری مناسب هستند و چون عوامل بیماری‌زا قادر به ایجاد توسعه مقاومت در برابر این نانو ذرات نیستند، می‌توان از آنها را در زمینه کنترل بیماری‌های عفونی استفاده کرد. در سال‌های اخیر، اثرات ضد باکتریایی هرکدام از نانو ذرات طلا و بوهمیت علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی به صورت جداگانه و در تحقیقات مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است (۵،۶). نانو ذرات طلا و بوهمیت دارای سمیت پایین هستند و در طبیعت یافت می‌شوند و در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶،۷،۸). فعالیت آنتی باکتریایی بوهمیت مربوط به اثرات آن در نفوذ به سلول باکتری، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و آزاد سازی یون آلومینیوم اکسید است که دارای خاصیت باکتری‌کشی است (۶،۹). تمامی این عوامل

فزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، کارایی ناکافی آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان بیماری‌های عفونی و اثرات جانبی آنها، استفاده از انواع آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر و کارآمد را محدود و بی‌اثر نموده است (۱،۲). محققان، تحقیقات گسترده در جهت کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید با کارایی بالا برای فائق آمدن بر این محدودیت‌ها انجام داده اند (۳،۴). بر همین اساس محققان دریافتند به دلیل مشکلات بالایی که درمان از طریق آنتی‌بیوتیک‌ها با آن مواجه است، باید به دنبال راه حل‌های متفاوت و بلند مدت باشند (۳،۴). از جمله راهکارها که بجای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد،

نویسنده مسئول:

گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد

اسلامی، ارومیه، ایران

پست الکترونیکی: m.farahpour@iaurmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۶

دیونیزه برای تهیه همه محلول‌ها استفاده شد. کیتوزان با وزن ۱۹۰۰۰۰ تا ۳۱۰۰۰۰ دالتون از شرکت سیگما و گرید دارویی پودر بوهمیت از شرکت Sarabnefelin تبریز خریداری شد. نمک طلا از شرکت Merck خریداری شد.

تهیه عصاره گیاهی

به منظور تهیه عصاره‌ی گیاه، گیاه نعنای فلفلی از مناطق اطراف شهر تبریز جمع‌آوری و جهت شناسایی و تعیین گونه به دانشکده علوم پایه دانشگاه ارومیه تحویل داده شد. برای استخراج متابولیت‌های مهم گیاه، از روش ماسراسیون استفاده گردید به طوری که ابتدا ۱۰ گرم از پودر خشک گیاه موردنظر با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین شد و به یک بشر شیشه‌ای ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید و به مخلوط اجازه داده شد به مدت ۲۴ الی ۷۲ ساعت با استفاده از دستگاه تکاننده با دور ۵۸ و در تاریکی هم زده شود. سپس این مخلوط جهت غنی‌سازی کامل، به مدت ۲۰ دقیقه در یک حمام با توان فراصوت ۱۲۰ وات قرار گرفت. این روش اثر قابل توجهی بر استخراج ترکیبات زیست‌فعال از گیاه دارد. سپس با استفاده از تکنیک ریزموج مخلوط مرحله قبل به مدت ۵ دقیقه تحت دستگاه ریزموج آزمایشگاهی با قدرت ۳۲۰ وات قرار گرفت. به منظور جداسازی بقایای گیاه از عصاره، مخلوط مذکور توسط گاز استریل ۴ لایه و کیف صاف گردید. نمونه پس از سانتریفیوژ توسط فیلتر میکروبی ۰/۴۵ میکرونی استریل شد و در ظروف استریل دربسته مات قرار گرفت و برای مطالعات و مراحل بعدی در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید (۱۸،۲۳).

تهیه سویه باکتریایی

در تحقیق حاضر از دو سویه باکتریایی *اشریشیا کلی* (ATCC 13706) و *اسینتوباکتر بومانی* (PTCC 1855) استفاده شد. سویه‌های مورد مطالعه از مرکز کلکسیون باکتری ایران وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تحت نظارت وزارت علوم تهیه گردید، جدول (۱). از کشت ۲۴ ساعته، سوسپانسیون نیم مک فارلند از باکتری‌ها جهت استفاده در مراحل بعدی تهیه شد. برای انجام هر آزمون جهت بررسی اثرات ضد باکتریایی، کشت تازه ۲۴ ساعته تهیه گردید (۲۰).

باعث برهمکنش الکترواستاتیکی میان باکتری و یون‌های آلومینیوم اکسید و آسیب به DNA از طریق اعمال فشار اکسیداتیو و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (۶). نانو ذرات طلا با غشای سلولی باکتری‌ها برهمکنش نشان داده و با تجمع نانو ذرات طلا بر روی غشا، سلول باکتری را از بین می‌برد (۱۰). کیتوزان به عنوان دومین زیست‌ماده رایج در طبیعت، دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش‌دهنده کلسترول، غیر سمی بودن، ضد سرطان، چسبندگی زیستی، زیست‌تخریب‌پذیری، ضد میکروبی، سازگاری زیستی بالا، منعقدکننده خون و کاهش‌دهنده درد است (۱۱،۱۲). از جمله مواردی که نیاز به مراقبت با آنتی‌بیوتیک‌ها دارد، زخم‌های عفونی است که باکتری‌های *اسینتوباکتر بومانی* (*Acinetobacter baumannii*) و *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) می‌تواند آلوده شود (۴). باکتری *اسینتوباکتر بومانی*، از جمله باسیل و کوکوسیل‌های گرم منفی و هوازی مطلق از جنس *اسینتوباکتری*‌ها است که زندگی در محیط مرطوب را ترجیح داده، به طور وسیعی در خاک و آب وجود دارد (۱۳،۱۴). این باکتری به طور فزاینده‌ای به عنوان عامل مهمی در عفونت‌های بیمارستانی مطرح می‌گردد. *اسینتوباکتر بومانی* مقاومت قابل توجهی نسبت به گروه‌های آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان داده است. سویه‌های مقاوم به چند دارو و سویه‌هایی که تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز هستند، به عنوان عامل بیماری‌های عفونی جدی در بخش‌های مختلف بیمارستان و در میان افراد بستری شده مطرح هستند و موضوع درمان را با مشکلات جدی مواجه کرده است (۱۴). باکتری *اشریشیا کلی*، باسیل‌های گرم منفی بی‌هوازی اختیاری از خانواده انتروباکتریاسه‌ها است (۱۵،۱۶). بر اساس تحقیقات انجام یافته، گزارشات مبنی بر عفونت‌های گزارش شده از بیماران بستری شده در بیمارستان‌ها به دنبال شیوع عفونت‌های *اشریشیا کلی* افزایش یافته است. این باکتری نیز مقاومت‌های متعددی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بر علیه‌شان از خود نشان داده و روند درمان عفونت‌های حاصل را با مشکلات مختلفی مواجه نموده است (۱۷). نظر به ویژگی‌های نانو کامپوزیت‌ها و کیتوزان مورد استفاده در مطالعه، چنین انتظار می‌رود که اثرات ضد باکتریایی این نانو کامپوزیت‌ها علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارای اهمیت فراوان و کاربرد تجاری باشد. با این وجود مطالعات انجام گرفته در این زمینه محدود بوده و نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد؛ بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد باکتریایی نانو کامپوزیت‌های بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوزان بر روی باکتری‌های ایجادکننده عفونت در زخم‌های پوستی استمواد و روش‌ها جهت حصول اطمینان از نتایج، تمام مواد شیمیایی به‌کاربرده شده در این مطالعه دارای گرید تحلیلی بودند و از آب

جدول ۱. انواع میکروارگانیسم‌ها و آنتی‌بیوتیک استاندارد انتخابی

کنترل مثبت	ATCC/PTCC	باکتری
کانامایسین	ATCC 13706	اشریشیا کلی
ایمی پنم	PTCC 1855	اسینتوباکتر بومانی

بیوسنتز خارج سلولی نانو کامپوزیت بوهمیت/طلا

برای سنتز نانو کامپوزیت بوهمیت/طلا ۰/۱۵ گرم نمک طلا با یک گرم بوهمیت آسیاب شده و ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره گیاهی تهیه شده مخلوط شد. بر اساس مطالعات قبلی مخلوط در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت روی همزن حرارتی به شدت به هم زده شد (۲۱). سپس، با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV-VIS در محدوده طول‌موج ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر و با استفاده از تابش‌های ریزموج و گرمادهی کاهش یون طلا مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد، محلول موردنظر سانتریفیوژ گردید. عمل سانتریفیوژ ۳ بار تکرار شد تا از جداسازی کامل نانو ذرات اطمینان حاصل گردد. برای جداسازی محصول خام، پس از سانتریفیوژ، رسوب به‌دست‌آمده با آب مقطر و الکل اتیلیک شسته شد تا یون‌های باقی‌مانده و سایر ناخالصی‌های موجود در محصول به‌دست‌آمده، حذف شود. به‌این‌ترتیب، فاز جامد آماده، جدا و شسته شد و در آون در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت خشک گردید. مشخصه یابی نانو کامپوزیت سنتز شده از طریق روش‌های معمول مورد ارزیابی و تایید قرار گرفت (۲۱).

تهیه مشتقات کیتوزان (عامل دار کردن نانو کامپوزیت بوهمیت/طلا با کیتوزان)

جهت عامل دار کردن نانو کامپوزیت بوهمیت/طلا با کیتوزان از روش اصلاح فیزیکی (Physical modification) استفاده شد. به‌این‌ترتیب که ابتدا یک گرم از پودر نانو کامپوزیت بوهمیت/طلا به تدریج به ۱/۵ میلی‌لیتر محلول کیتوزان پروتونه شده (استیک اسید 1 w/w، 2 میلی‌لیتر اسید غلیظ در ۱۹۸ میلی‌لیتر آب دیونیزه) در دمای اتاق اضافه شد و مخلوط به‌دست‌آمده توسط همزن به مدت ۱۴ ساعت هم زده شد. به‌منظور جداسازی مشتق

به منظور تهیه سوپه‌های باکتریایی، ابتدا بخش خارجی ویال سوش‌های لیوفیلیزه باکتری‌های تهیه شده به طور کامل با پنبه الکل، ضد عفونی شده و سپس بخش میانی پنبه‌ی داخل ویال در داخل هود با تیغ برش داده شد. سپس میزان نیم میلی‌لیتر از محیط کشت مغذی از قبل آماده شد و به وسیله سرنگ استریل به داخل ویال تزریق شد و اجازه داده شد تا جرم لیوفیلیزه شده در آن حل گردد. محلول حاصل به محیط حاوی (BHIB محیط کشت مغذی عمومی آگار دار) منتقل شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت انکوبه گردید تا باکتری‌ها به طور کامل رشد کنند. سپس به منظور احیای کامل باکتری‌ها و مهیا شدن شرایط رشد آن‌ها، سه بار تجدید کشت (ساب کالچر) انجام گردید (به علاوه یک کشت ذخیره نیز از کشت مادر تهیه گردید). به منظور استفاده در مراحل بعدی از آخرین کشت ۲۴ ساعته سوسپانسیون به کدورت نیم مک فارلند تهیه گردید (۱۹). برای انجام هر آزمون جهت بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی، کشت تازه ۲۴ ساعته تهیه گردید (۲۰، ۲۱، ۲۲).

تهیه محلول کیتوزان

در تهیه محلول کیتوزان، از کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (۳۱۰-۱۹۰ هزار دالتون) خریداری شده از شرکت سیگما استفاده گردید. ابتدا یک گرم از کیتوزان خریداری شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول اسید استیک 1% w/w حل گردیده، PH محلول روی ۵ تنظیم شد، سپس محلول حاصل مدت یک ساعت به شیکر منتقل شد تا محتویات محلول مخلوط مورد نظر به خوبی مخلوط گردد. سپس کیتوزان حل شده در محلول اسید استیک از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۳ صاف گردید تا از هرگونه ناخالصی عاری گردد (۲۴).

چهارم منتقل و این عمل تا چاهک دهم تکرار شد و در نهایت از چاهک دهم ۱۰۰ میکرو لیتر برداشته و از پروسه خارج شد. با این روش رقت‌های سریالی از نانو ذرات بوهمیت، بوهمیت/اطلا و نانو کامپوزیت بوهمیت/اطلا/کیتوزان تهیه گردید. چاهک یازدهم به‌عنوان شاهد باکتری‌ها در نظر گرفته شد. به چاهک دوازدهم (شاهد نانوذره) برای بررسی نانوذره از نظر آلودگی نیز ۱۰۰ میکرو لیتر نانوذره اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری‌های مورد آزمایش که در مرحله‌ی پیشین مطابق کدورت نیم مک فارلند تهیه‌شده بود، به هم‌هی چاهک‌های مربوط به‌ردیف نانوذره به‌جز چاهک دوازدهم اضافه شد و به انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس در محیط تاریک به مدت ۲۴ ساعت منتقل شد. بعد از اتمام انکوباسیون کدورت یا عدم کدورت چاهک‌ها به‌صورت چشمی مشاهده گردید. چاهک‌هایی با حداقل کدورت به‌عنوان مقدار MIC در نظر گرفته شد. تمام مراحل با ۳ بار تکرار انجام گردید (۳۵). جهت بررسی MBC برای بالا بردن اطمینان در مورد فعالیت کشندگی نانو ذرات موردنظر بر روی باکتری‌ها و قارچ تمام چاهک‌ها از چاهک اول تا چاهک یازدهم موردبررسی قرار گرفت. بدین منظور مقدار ۵۰ میکرو لیتر از هر رقت محلول موردنظر در پلیت‌های حاوی محیط کشت موردنظر، به‌وسیله‌ی اسپریدر استریل گسترش داده شد و به مدت ۲۴ ساعت به انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس منتقل گردید و پس از گذشت ۲۴ ساعت پلیت‌ها از نظر رشد باکتری در محیط کشت (BHI (Brain heart infusion) موردبررسی قرار گرفتند و آخرین رقتی که در کشت از آن هیچ‌گونه رشد باکتری دیده نشده بود به‌عنوان رقت MBC ثبت و گزارش شد (۳۵). در مورد آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده نیز جهت تعیین MIC و MBC از روش مورد استفاده در مورد نانوذره و نانو کامپوزیت‌ها استفاده گردید. در این مطالعه برای باکتری‌های اش‌ریشیا کلی و اسینوباکتر بومانی به ترتیب آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ایمپنم در نظر گرفته شدند. (۲۶، ۲۵).

روش اندازه‌گیری زمان مرگ (Time-kill) و سنجش تعداد میکروارگانیسم‌ها در روش اندازه‌گیری زمان مرگ

پس از تعیین MIC مربوط به باکتری‌ها، از داده‌های حاصل برای انجام سنجش زمان مرگ، جهت ارزیابی شاخص فعالیت ضد باکتریایی نانوذره بوهمیت و نانو کامپوزیت‌های بوهمیت/اطلا و بوهمیت/اطلا/کیتوزان استفاده شد. به‌این ترتیب که هر سویه با غلظت‌های متفاوتی مواجه گردید (MIC ۱ و MIC ۲). به‌منظور بررسی مدت‌زمان اثر نانوذره و نانو کامپوزیت‌ها روی سلول‌های زنده باکتری و مدت‌زمان مرگ، باکتری‌ها پس از کشت در محیط کشت اختصاصی به انکوباتور منتقل گردید و

خام نانو کامپوزیت بوهمیت/اطلا/کیتوزان پس از سانتریفیوژ، رسوب به‌دست‌آمده با آب مقطر شسته شد. این کار برای حذف مازاد کیتوزان در محصول نهایی انجام شد و در انتها محصول به‌دست‌آمده در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ دقیقه خشک شد مشخصه یابی مشتق کیتوزان دار نانو کامپوزیت سنتز شده از طریق روش‌های معمول مورد ارزیابی قرار گرفت و مورد تایید قرار گرفت (۲۱).

تهیه سوسپانسیون بر اساس کدورت نیم مک فارلند

نظر به اینکه تعداد باکتری‌های تلقیح شده یکی از متغیرهای مهم در مطالعه‌ی حاضر بود، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی به صورت استاندارد تهیه گردید. بدین منظور جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی، از کشت تازه و جوان باکتری، حاصل از کشت‌های ۲۴ ساعته ی باکتری‌های اش‌ریشیا کلی و اسینوباکتر بومانی استفاده شد. در این حالت باکتری‌ها در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند. بدین ترتیب، به کمک فیلدوپلاتین چند کلونی از باکتری مورد مطالعه از قسمت فوقانی کشت برداشت شد و به محلول نرمال سالین منتقل گردید این کار تا زمانی ادامه پیدا کرد که کدورت سوسپانسیون حاوی نمونه باکتری مورد نظر مطابق کدورت محلول نیم مک فارلند و معادل $1/5 \times 10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر باشند (۱۸).

حداقل غلظت مهارتی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای تعیین حداقل غلظت مهارکننده از رشد از روش کلاسیک تهیه رقت‌های متوالی کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاهی (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000) استفاده شد. میزان غلظت نانوذره و نانو کامپوزیت‌ها در محدوده ۲/۵ تا ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. برای تعیین حداقل غلظت مهارتی نانو ذرات مورد آزمایش (بوهمیت، بوهمیت/اطلا، بوهمیت/اطلا/کیتوزان) از روش میکرودیالوشن استفاده گردید. برای این منظور از میکروپلیت ته گرد ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد بر مبنای راهنمای CLSI برای هر باکتری انتخاب گردید (۳۷). در مورد هر نانوذره به روش یکسانی عمل شد. به‌طور خلاصه، در ابتدا به‌غیر از چاهک اول (کنترل منفی) هر ردیف، به هر چاهک موجود در هر ردیف به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت مولر هینتون برات اضافه گردید. سپس به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از نانوذره موردنظر به چاهک اول و دوم اضافه شد. به‌این ترتیب در چاهک اول غلظت نانوذره خالص بود. پس از آنکه چاهک دوم به‌خوبی هم زده شد، ۱۰۰ میکرو لیتر از آن برداشته و به چاهک سوم انتقال داده شد. به همین ترتیب به‌صورت متوالی از چاهک سوم به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر به چاهک

یافته‌ها

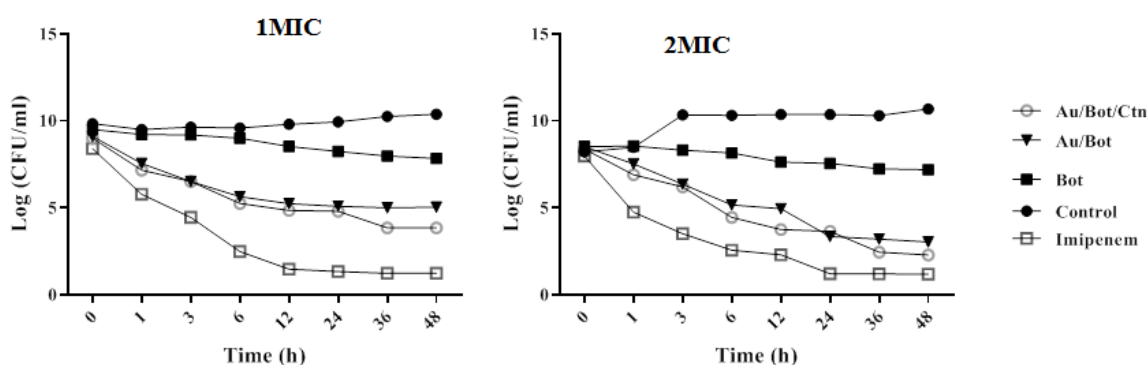
فعالیت ضد باکتری در شرایط آزمایشگاهی

نتایج MIC و MBC در جدول (۲) نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، مقادیر MIC و MBC در گروه بوهمیت به ترتیب $10 \mu\text{g/mL}$ و 20 به دست آمد که در مقایسه با دیگر گروه‌ها، بیشترین غلظت‌ها برای نشان دادن فعالیت‌های ضد باکتریایی بود. در حالی که برای گروه‌های بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا/کیتوزان برای باکتری /سینتو باکتر بومانی مقادیر MIC و MBC به ترتیب $2/50 \mu\text{g/mL}$ و 5 و برای باکتری /شریشیا کلی به ترتیب $5 \mu\text{g/mL}$ و 10 بود. تفاوت معنی‌داری میان فعالیت‌های ضد باکتریایی نانو کامپوزیت‌های بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوزان مشاهده نشد. آنتی‌بیوتیک‌ها، فعالیت‌های ضد باکتریایی بالاتری نشان دادند بدین ترتیب که مقادیر MIC و MBC به کار گرفته شده برای آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ایمپنم در مقابل باکتری‌های /سینتو باکتر بومانی و /شریشیا کلی به ترتیب غلظت $1/25 \mu\text{g/mL}$ و $2/50$ گزارش گردید. بر اساس نتایج حاصل میتوان گفت آنتی‌بیوتیک‌ها فعالیت ضد باکتریایی بالاتری در مقایسه با نانو کامپوزیت‌ها نشان دادند، ولی نانو کامپوزیت‌ها به شکل وسیع الطیف عمل کردند و روی هر دو باکتری مورد بررسی تأثیر داشتند. جدول (۲).

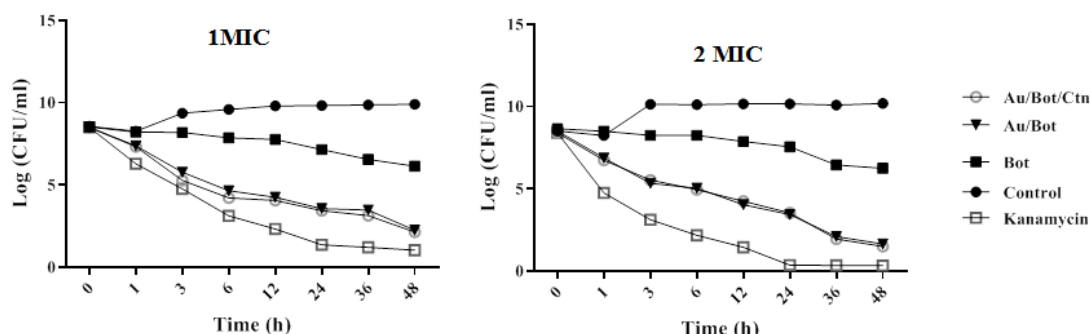
کلونی‌ها در زمان‌های مختلف (صفر، ۱، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸) مورد بررسی قرار گرفت. کلنی‌های شکل گرفته برای هر زمان و هر باکتری و هر نانوذره و نانو کامپوزیت شمارش و بر اساس CFU/ml گزارش گردید (۲۷). داده‌ها با استفاده از آزمون آماری رگرسیون تجزیه و تحلیل شدند. همچنین در تطابق داده‌های آزمایش با مدل کینتیک مرگ، از رگرسیون ساده با متغیر مستقل از زمان و ضریب تعیین (جذر آن برابر با ضریب همبستگی است) استفاده شد و $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد (۲۷، ۳۶). برای هر یک از آزمایشات در هر گروه، آزمایش ۵ بار تکرار شد. برای مقایسات بین گروهی داده‌ها از آزمون کروسکال-والیس و من-ویتنی برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. سطح معنیداری کمتر از $0/05$ به عنوان معنی‌داری در نظر گرفته شد (۲۷، ۳۶).

جدول ۲. نتایج MIC و MBC نانو ذرات Au/Bot/Ctn و Au/Bot.Bot بر روی میکروارگانیزم ها و مقایسه آنها با آنتی بیوتیک های استاندارد (واحدها بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر می باشد)

Au/Bot/Ctn		Au/Bot		Bot		Imipenem		Vancomycin		Fluconazole		Mupirocin		Kanamycin		باکتری	
MB	MI	MB	MI	MB	MI	MB	MI	MB	MI	MB	MI	MB	MI	MB	MI		
C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
۱۰	۵	۱۰	۵	۲۰	۱۰	---	---	---	---	---	---	---	---	۲/۵	۲۵	اشریشیا	
																کلی	
	۱/۵		۱/۵				۲/۵	۲۵	---	---	---	---	---	---	---	اسینتوبا	
۵	۲	۵	۲	۲۰	۱۰	۲/۵	۱/									کتر	
																	بومانی



شکل ۱. منحنی مرگ باکتری برای باکتری اسینتوبا کتر بومانی



شکل ۲. منحنی مرگ باکتری برای باکتری اشریشیا کلای

بهتری در مقایسه با نانو کامپوزیت های مورد مطالعه از خود نشان داده اند.

نتایج زمان مرگ باکتری

نتایج مربوط به منحنی time-kill برای نانو کامپوزیت های مورد مطالعه در مقابل باکتری های اسینتوبا کتر بومانی و اشریشیا کلی در شکل های ۱ و ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین فعالیت ضد باکتریایی نانو کامپوزیت ها از ساعت ۶ تا ۲۴ مشاهده شده و تعداد باکتری ها در هر دو گروه بوهمیت/اطلا و بوهمیت/اطلا/کیتوزان پس از ۲۴ ساعت کاهش می یابد. بر اساس نتایج در ارتباط با گروه بوهمیت، در مقایسه با گروه های بوهمیت/اطلا و بوهمیت/اطلا/کیتوزان، تعداد باکتری ها به طور چشمگیری بالاتر بوده و دارای فعالیت ضد باکتریایی کمتری می باشد. با وجود اینکه گروه های بوهمیت/اطلا و بوهمیت/اطلا/کیتوزان دارای فعالیت های ضد باکتریایی می باشند اما آنتی بیوتیک های فعالیت ضد باکتریایی

بحث

نانو کامپوزیت بوهمیت-طلا-کیتوزان دارای اثرات ضد باکتریایی است. بر اساس نتایج حاصل از MIC و MBC در ارتباط با دو گروه بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوزان این نانو کامپوزیت ها دارای اثرات ضد باکتریایی مطلوبی علیه باکتری های اسینتوبا کتر بومانی و اشریشیا کلی هستند. بوهمیت در مقایسه با دیگر نانو کامپوزیت ها، فعالیت آنتی باکتریایی ضعیفی از خود نشان داد، با این حال در مقایسه با گروه کنترل، دارای فعالیت آنتی باکتریایی مناسبی بود. قرارگیری طلا در کنار بوهمیت باعث افزایش فعالیت آنتی باکتریایی آن شد. این نتایج همسو با نتایج گزارش شده توسط مطالعات قبلی است

(۲۷،۲۸). بر اساس نتایج بوهمیت-طلا دارای قوی‌ترین فعالیت ضد باکتریایی بوده و پوشش کیتوزان خواص ضد باکتریایی آن را بهبود بخشیده است از این رو تفاوت قابل توجهی میان فعالیت‌های ضد باکتریایی بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوزان دیده نشد. بوهمیت در مقایسه با دیگر نانو کامپوزیت‌ها، فعالیت آنتی-باکتریایی ضعیفی از خود نشان داد، با این حال در مقایسه با گروه کنترل، دارای فعالیت آنتی باکتریایی مناسبی بود. فعالیت آنتی باکتریایی بوهمیت را می‌توان به تأثیرات آن در نفوذ به سلول باکتری، آزادسازی یون آلومینیوم اکسید با سمیت بالا و تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نهایت ایجاد برهمکنش الکترواستاتیکی میان باکتری و یون‌های آلومینیوم اکسید و آسیب به DNA از طریق اعمال فشار اکسیداتیو و در نهایت مرگ سلولی نسبت داد (۹،۶). قرارگیری طلا در کنار بوهمیت باعث افزایش فعالیت آنتی باکتریایی آن شد. این نتایج همسو با نتایج گزارش شده توسط مطالعات قبلی است (۲۸،۲۷). مکانیسم‌های مختلفی برای اثرات نانو ذرات طلا روی باکتری‌ها گزارش شده است. نانو ذرات طلا باردار؛ با غشای سلولی باکتری برهمکنش نشان می‌دهند و تجمع نانو ذرات طلا بر روی غشا سبب لیز سلول باکتری می‌شود (۱۰). نانو ذرات کوچک‌تر دارای فعالیت آنتی باکتریایی بیشتری به علت داشتن سطح بیشتری که روی غشای باکتریایی قرار می‌گیرد نشان می‌دهند. بار مثبت یون طلا با بار منفی دیواره سلولی باکتری‌ها تعامل می‌کنند و باعث می‌شوند که در شکل دیواره سلولی باکتریایی تغییراتی را ایجاد می‌کنند و باعث می‌شود که از این طریق در داخل سلول باکتریایی، فضایی ایجاد شود و از این طریق باعث مرگ سلولی می‌شود (۲۸). سازوکار دیگر نانو ذرات طلا از طریق عمل اندوسیتوز است (۲۹). نانو ذرات طلا فعالیت آنتی باکتریایی از طریق تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن و تخریب DNA و فعال‌سازی آبشار کاسپاز مرگ سلولی برنامه ریزی شده، فعالیت آنتی باکتریایی خود را نشان می‌دهند (۳۰). نتایج نشان داد که نانو کامپوزیت اثرات کمتری روی اشرشیا داشت که ممکن است مربوط به ساختار کلی باکتری‌ها باشد. نتایج برای منحنی Time-kill نشان داد که نانو کامپوزیت از زمان ۶ تا ۲۴ ساعت اثرات خود را نشان داد. این نتیجه نشان می‌دهد که نانو کامپوزیت برای تأثیرگذاری نیاز به زمان بیشتری نیاز دارد. بوهمیت تقریباً روال ثابتی را طی کرد ولی دیگر نانو کامپوزیت‌های حاوی طلا، با گذشت زمان خاصیت آنتی باکتریایی بیشتری را از خود نشان دادند. در مطالعه‌ای که بر روی خواص ضد میکروبی نانو ذرات کیتوزان، نحوه عمل و عوامل مؤثر بر فعالیت آن انجام گرفته بود. فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات کیتوزان در برابر اشرشیا کلی از طریق محاسبه حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) موردبررسی قرار گرفت در این بررسی انجام گرفته کیتوزان دارای اثر آنتی‌بیوتیکی بالا بر روی اشرشیا کلی (۸۵ درصد در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

بوده است و کیتوزان از طریق بر هم زدن یکپارچگی غشای سلولی و انتشار اسیدنوکلئیک باعث از بین رفتن باکتری‌ها شده است؛ به‌طور کلی اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات کیتوزان نسبت به کیتوزان و کیتین اولیه بیشتر بوده و نانو ذرات کیتوزان عاملی ضد باکتریایی کارآمدی در مقابل عوامل بیماری‌زا بودند (۳۱). در مطالعه حاضر، اثرات ضد باکتریایی نانو کامپوزیت-Au/γ-AIOOH/Ctn که متشکل از بوهمیت، طلا و کیتوزان می‌باشد موردبررسی قرار گرفت و بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش MIC و MBC باکتری اشرشیا کلی (به ترتیب ۵ μg/mL و ۱۰) نانو کامپوزیت بیوسنتز شده دارای اثرات ضد باکتریایی متوسطی می‌باشد که با نتایج اعلام شده در مطالعه انجام‌گرفته توسط Divya و همکاران هم جهت می‌باشد.

در مطالعه دیگری که بر روی ارزیابی اثرات کیتوزان محلول بر روی سوبه‌های باکتریایی انجام گرفته بود. شش غلظت مختلف کیتوزان در اسید استیک یک درصد حل گردیده و دو روش کربی بائر و زنده ماندن سلول باکتری مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه باکتری اشرشیا کلی در مقابل گروه اول و دوم کیتوزان سنتز شده حساسیت قابل توجهی نشان داده است (MIC: ۰,۲۱ ± ۷,۵ mm). این گروه اعلام کردند که کیتوزان می‌تواند در برابر باکتری‌های مختلف، حساسیت متفاوتی نشان دهد و در صورت کارآمد بودن در مقابل باکتری‌ها می‌تواند به عنوان عامل ضد باکتریایی استفاده گردد (۳۲). نتایج حاصل از مطالعه حاضر که اثرات ضد باکتریایی نانو کامپوزیت-Au/γ-AIOOH/Ctn و Au/γ-AIOOH به صورت MIC و MBC برای باکتری اشرشیا کلی (به ترتیب ۵ و ۱۰) می‌باشد این موضوع نشان می‌دهد که حضور یا عدم حضور کیتوزان در نانو کامپوزیت بیوسنتز شده تفاوت معنی‌داری ایجاد نمی‌کند. در مطالعه‌ای که بر روی فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات بوهمیت (AIOOH) سنتز شده در مقابل باکتری اشرشیا کلی انجام گرفت، این باکتری در مقابل نانوذره بوهمیت حساسیتی با میانگین قطر هاله عدم رشد: ۱۱/۶۶ نشان داد که عملکرد نسبتاً ضعیف به شمار می‌آید (۶).

نتایج حاصل از MIC و MBC باکتری اشرشیا کلی در مقابل نانوذره بوهمیت در تحقیق حاضر به ترتیب ۱۰ و ۲۰ μg/MI می‌باشد که نشان‌دهنده عملکرد نسبتاً ضعیف این نانو ذره به‌تنهایی در مقابل این باکتری می‌باشد. نتایج MIC و MBC باکتری اشرشیا کلی در مقابل نانو کامپوزیت Au/γ-AIOOH/Ctn که متشکل از بوهمیت، طلا و کیتوزان می‌باشد ۱۰/۵ μg/MI می‌باشد که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی بوهمیت و طلا و کیتوزان می‌باشد. مطالعه‌ای بر روی فعالیت‌های ضد باکتریایی عصاره گیاه نعناع فلفلی در مقابل برخی از باکتری‌های پاتوژن انسانی مقاوم به چند داروی در حال ظهور انجام گرفته است که بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، اتیل استات موجود در عصاره‌ی نعناع فلفلی دارای اثرات بازدارنده‌ی

دادند. اگرچه مطالعه حاضر بیان‌کننده اثرات ضد میکروبی نانو کامپوزیت‌های بوهمیت/طلا و بوهمیت/طلا/کیتوزان است باین حال نمی‌توان با قاطعیت در رابطه با نتایج کاربردی صحبت نمود. از این رو لازم است تا مطالعات گسترده بر روی تأثیرات نانو ذرات فلزی به‌ویژه نانو ذرات طلا که با عصاره‌های گیاهی همراه شده‌اند بر روی عوامل عفونی و مهار عفونت در مدل‌های تجربی انجام گیرد و با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد مقایسه گردد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه دکتری تخصصی رشته میکروبیولوژی نویسنده اول تحت کد پژوهشی اخذ شده از دانشگاه آزاد اسلامی زنجان به شماره ۱۸۴۷۰۶ می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافی ندارند.

رشد قوی بر روی پاتوژن‌های مورد بررسی در این مطالعه بوده و به دنبال آن کلروفرم، اتانول و متانول دارای اثرگذاری می‌باشند (۳۴). اثرات ضد باکتریایی نانو کامپوزیت‌های Au/Bot و Au/Bot/Ctn بیوسنتز شده به کمک عصاره گیاه نعناع فلفلی نتایج حاصل از مطالعه انجام گرفته Shalayer و همکاران را تأیید می‌نماید.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی، نانو ذرات بوهمیت و نانو کامپوزیت‌های بوهمیت/ طلا و بوهمیت/طلا/کیتوزان با استفاده از عصاره گیاه نعناع فلفلی به روش سنتز فیتوکیماکال تهیه گردید. نتایج نشان داد که نانو کامپوزیت‌های تهیه شده فعالیت ضد میکروبی خوبی در برابر باکتری‌های گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی از خود نشان دادند، ولی نانوذره بوهمیت فعالیت ضد باکتریایی پایینی از خود نشان داد. در تمام مراحل آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در مقایسه با نانوذره و نانو کامپوزیت‌ها فعالیت بهتری از خود نشان

منابع

1. Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*. 2007;7(11):6-145.
2. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020; 10:107.
3. Byun SM, No HK, Hong JH, Lee SI, Prinyawiwatkul W. Comparison of physicochemical, binding, antioxidant and antibacterial properties of chitosans prepared from ground and entire crab leg shells. *International Journal of Food Science & Technology*. 2013;48(1):136-42.
4. Liu Y, Yi S, Sameen DE, Hossen MA, Dai J, Li S, Qin W, Lee K. Designing and utilizing 3D printed chitosan/halloysite nanotubes/tea polyphenol composites to maintain the quality of fresh blueberries. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2021; 74:102808.
5. Li X, Robinson SM, Gupta A, Saha K, Jiang Z, Moyano DF, Sahar A, Riley MA, Rotello VM. Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. *ACS nano*. 2014;8(10):10682-6.
6. Rashed HH. Antibacterial Activity of Boehmite Nanoparticles Synthesized by Arc Discharge in Deionized Water Technique. *Al-Nahrain Journal of Science*. 2017;20(1):58-65.
7. Mahmoud NN, Hikmat S, Ghith DA, Hajeer M, Hamadneh L, Qattan D, Khalil EA. Gold nanoparticles loaded into polymeric hydrogel for wound healing in rats: Effect of nanoparticles' shape and surface modification. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019; 565:174-86.
8. Paglia G. Determination of the structure of γ -alumina using empirical and first principle calculations combined with supporting experiments (Doctoral dissertation, Curtin University). 2004.
9. Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of nanobiotechnology*. 2017;15(1):1-20.
10. Joshi AS, Singh P, Mijakovic I. Interactions of gold and silver nanoparticles with bacterial biofilms: Molecular interactions behind inhibition and resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(20):7658.
11. Khan MA, Mujahid M. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. *International journal of biological macromolecules*. 2019; 124:138-47.
12. Mohan K, Ganesan AR, Muralisankar T, Jayakumar R, Sathishkumar P, Uthayakumar V, Chandirasekar R, Revathi N. Recent insights into the extraction, characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects. *Trends in food science & technology*. 2020; 105:17-42.
13. Babapour E, Haddadi A, Mirnejad R, Angaji SA, Amirmozafari N. Study of drug resistance and *ompA* gene existence in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Iranian journal of medical microbiology*. 2017;11(1):30-8.
14. Martín-Aspas A, Guerrero-Sánchez FM, García-Colchero F, Rodríguez-Roca S, Girón-González JA. Differential characteristics of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: risk factors, clinical picture, and mortality. *Infection and drug resistance*. 2018; 11:861
15. Martinez-Medina M. Pathogenic *Escherichia coli*: Infections and Therapies. *Antibiotics*. 2021;10(2):112.
16. Nwankwo IU, Edward KC, Nwoba CN, Okwudiri CV. Evaluation of Bacterial Species in Patients with Skin Infection and their Antibiogram. *South Asian Journal of Research in Microbiology*. 2021:10-6.
17. Alharbi NS, Khaled JM, Kadaikunnan S, Alobaidi AS, Sharafaddin AH, Alyahya SA, Almanaa TN, Alsughayier MA, Shehu MR. Prevalence of *Escherichia coli* strains resistance to antibiotics in wound infections and raw milk. *Saudi journal of biological sciences*. 2019;26(7):1557-62.
18. Ehsani P, Farahpour MR, Mohammadi M, Mahmazi S, Jafarirad S. Green fabrication of ZnO/magnetite-based nanocomposite-using *Salvia officinalis* extract with antibacterial properties enhanced infected full-thickness wound. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2021; 628:127362.



19. Shan Y, Xu C, Wang M, Zhu Z, Wu FG, Shi Z, Cui Q, Arumugam GM. Bilinear *Staphylococcus aureus* detection based on suspension immunoassay. *Talanta*. 2019; 192:154-9.
20. Daghighan SG, Farahpour MR, Jafarirad S. Biological fabrication and electrostatic attractions of new layered silver/talc nanocomposite using *Lawsonia inermis* L. and its chitosan-capped inorganic/organic hybrid: Investigation on acceleration of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* infected wound healing. *Materials Science and Engineering: C*. 2021; 128:112294.
21. Gharehpapagh AC, Farahpour MR, Jafarirad S. The biological synthesis of gold/perlite nanocomposite using *Urtica dioica* extract and its chitosan-capped derivative for healing wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International journal of biological macromolecules*. 2021; 183:447-56.
22. Hajilou H, Farahpour MR, Hamishehkar H. Polycaprolactone nanofiber coated with chitosan and Gamma oryzanol functionalized as a novel wound dressing for healing infected wounds. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020; 164:2358-69.
23. Shariatzadeh Bami S, Khavari-Nejad RA, Ahadi AM, Rezayatmand Z. Evaluation of foliar application of TiO₂ nanoparticles and NaCl salinity on physiological traits of wormwood. *Plant Physiology Reports*. 2021;26(3):466-77.
24. Sadeghi Seyed A., Asareh M., Tavakoli M. Oak gall wasps.1388. *Research Institute of Forests and Rangelands*. 1388: 1-197.
25. Parvekar P, Palaskar J, Metgud S, Maria R, Dutta S. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Biomaterial investigations in dentistry*. 2020;7(1):105-9.
26. Tang H, Zhang P, Kieft TL, Ryan SJ, Baker SM, Wiesmann WP, Rogelj S. Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(7):2562-71.
27. Arshi N, Ahmed F, Kumar S, Anwar MS, Lu J, Koo BH, Lee CG. Microwave assisted synthesis of gold nanoparticles and their antibacterial activity against *Escherichia coli* (E. coli). *Current Applied Physics*. 2011;11(1): S360-3.
28. Patil MP, Kim GD. Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. *Applied microbiology and biotechnology*. 2017;101(1):79-92.
29. Cui W, Li J, Zhang Y, Rong H, Lu W, Jiang L. Effects of aggregation and the surface properties of gold nanoparticles on cytotoxicity and cell growth. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2012;8(1):46-53.
30. Tiloke C, Phulukdaree A, Anand K, Gengan RM, Chuturgoon AA. *Moringa oleifera* gold nanoparticles modulate oncogenes, tumor suppressor genes, and caspase-9 splice variants in a549 cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2016;117(10):2302-14.
31. Divya, K. Vijayan, S. George, T. K. and Jisha, M. S. Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: Mode of action and factors affecting activity. *Fibers and polymers*. 2017; 18(2):221-230.
32. Filimon MN, Popescu R, Sinitean A, Dumitrescu G. The Assessment of Chitosan Solutions Effects on Bacterial Strains. *Rev. Chim*. 2018;1(69):1485-1488.
33. Ansari, M. A. Khan, H. M. Khan, A. A. Pal, R. and Cameotra, S. S. Antibacterial potential of Al₂O₃ nanoparticles against multidrug resistance strains of *Staphylococcus aureus* isolated from skin exudates. *Journal of nanoparticle research*. 2013;15(10):1-12.
34. Shalayel, M. H. F. Asaad, A. M. Qureshi, M. A. and Elhussein, A. B. Anti-bacterial activity of peppermint (*Mentha piperita*) extracts against some emerging multi-drug resistant human bacterial pathogens. *Journal of Herbal Medicine*. 2017; 7: 27-30.
35. Khezri K, Farahpour MR, Rad SM. Efficacy of *Mentha pulegium* essential oil encapsulated into nanostructured lipid carriers as an in vitro antibacterial and infected wound healing agent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2020 Feb 20; 589:124414.
36. Nguyen TT, Guedj J, Chachaty E, de Gunzburg J, Andreumont A, Mentré F. Mathematical modeling of bacterial kinetics to predict the impact of antibiotic colonic exposure and treatment duration on the amount of resistant enterobacteria excreted. *PLoS Computational Biology*. 2014 Sep 11;10(9): e1003840.
37. Weinstein M, Lewis J, Bobenchik A, Compeau SH, Cullen SH, Galas M, Gold H, Humphries R, Kiru TH, Limbago B, Mathers A, Mazzalli T, Richter S, Satlin M, Schuetz A, Simner p, Suggested

groupings of antimicrobial agents approved by the US food and drug administration for clinical use that should be considered for testing and reporting on nonfastidious organisms by microbiology laboratories in the united states, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (CLSI standards), Laboratory standards institute, 2021, 20-22.