

Investigating the Antibacterial Effect of Zinc Oxide / Banana Peel Bionanoparticles on Multidrug-resistant Uropathogenic Bacteria Isolated from Children Under Two Years of Age

Maryam Bagheri Mohammad Gholipour¹, Monir Doudi^{1*}, Ali Mohammad Ahadi²,

Gholam Reza Amiri³

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Isfahan, Iran

2. Department of Genetics, Shahrekord University, Shahrekord, Chaharmahal and Bakhtiari, Iran

3. Department of Basic Sciences, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Isfahan, Iran

Abstract

Aim and Background: Urinary tract infections have significant complications and high costs and can lead to death. Appropriate treatment has been challenged due to high drug resistance. The aim of the present study was the biosynthesis of zinc oxide nanoparticles/banana peel on multi-drug resistant uropathogenic bacteria in children under two years of age.

Material and methods: In this study, bionanoparticles of zinc oxide/banana peel were synthesized and the structural, optical, morphological, and particle size characteristics were investigated using X-ray diffraction, ultraviolet absorption spectrum, and scanning electron microscopy. Biochemical tests and Colony-PCR technique were used to identify bacteria. The antibacterial properties of the synthesized nanoparticles were evaluated by the Agar dilution method on isolated bacteria.

Results: According to the XRD, SEM, and UV-Vis results, the synthesized zinc oxide had a hexagonal structure with a size of 100 nm and absorption at a wavelength of 258 nm. Bacterial strains of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* multidrug-resistant Uropathogenic bacteria were identified using morphological, biochemical, and molecular characteristics. The results of antibacterial tests showed that bionanoparticles of zinc oxide/banana peel at a concentration of 0.6 g/L were effective against all bacteria.

Conclusion: The findings of this research showed that zinc oxide/banana peel bio-nanoparticles had an effective antibacterial effect against multi-drug resistant UTI bacteria in children under two years of age.

Keywords: Urinary Tract Infections, Drug Resistance, Biosynthesis, Zinc Oxide, Iau Science.

۹۹

Corresponding author:

Department of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Isfahan, Iran

Email: Doudi@iaufala.ac.ir

بررسی اثر ضد باکتریایی بیونانوذرات اکسیدروی / پوست موز بر باکتری‌های مسبب عفونت ادراری مقاوم به چند داروی جدا شده از کودکان زیر دو سال مریم باقری محمدقلی پور^۱، منیر دودی^{۱*}، علی محمد احدی^۲، غلامرضا امیری^۳

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران
۲. گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، چهارمحال و بختیاری، ایران
۳. گروه علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: عفونت‌های ادراری عوارض قابل توجه و هزینه‌های بالایی دارند و می‌توانند منجر به مرگ و میر شوند. درمان مناسب به دلیل مقاومت دارویی بالا، با چالش مواجه شده است. هدف از پژوهش حاضر بیوسنتز نانوذرات اکسیدروی / پوست موز و بررسی اثر ضدباکتریایی آن بر باکتری‌های اوروپاتوژنیک مقاوم به چند دارو در کودکان زیر دو سال می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بیونانوذرات اکسیدروی / پوست موز به روش شیمیایی مرطوب سنتز شد و مشخصات ساختاری، اپتیکی، مورفولوژیکی و اندازه ذرات با استفاده از پراش اشعه ایکس، طیف جذبی فرابنفش و میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. جهت شناسایی باکتری‌های مقاوم به چند داروی مسبب عفونت ادراری در کودکان از آزمون‌های بیوشیمیایی و روش Colony-PCR استفاده شد. خواص ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده با روش آگار دایلوژن مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: با توجه به نتایج SEM، XRD و UV-Vis، اکسیدروی سنتز شده دارای ساختار شش وجهی با اندازه ۱۰۰ نانومتر و دارای جذب در طول موج ۲۵۸ نانومتر بود. سویه‌های باکتریایی *اشریشیا کلی*، *پروتئوس میرابیلیس* و *کلبسیلا پنومونیه* اوروپاتوژنیک مقاوم به چند دارو با استفاده از خصوصیات مرفولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. نتایج آزمون‌های ضدباکتریایی نشان داد که بیونانوذرات اکسیدروی / پوست موز در غلظت ۰/۶ گرم بر لیتر بر همه باکتری‌ها موثر بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان داد که بیو نانوذرات اکسیدروی / پوست موز دارای اثر ضد باکتری موثری بر علیه باکتری‌های مسبب عفونت ادراری مقاوم به چند دارو در کودکان زیر دو سال بود.

واژگان کلیدی: عفونت دستگاه ادراری، مقاومت دارویی، بیوسنتز، اکسیدروی، Iau Science.

مقدمه

برخی از میکروبهای بیماری‌زا که از سد دفاعی میزبان فرار کرده و در مجرای ادراری کلونیزه شده‌اند، آلوده می‌شود (۱). این عفونت، شایع‌ترین بیماری اورولوژیکی و کلیوی است که میزان قابل توجهی از عوارض و هزینه‌های بالای پزشکی را به همراه دارد و همچنین می‌تواند منجر به مرگ و میر فراوانی شود (۲،۳). اعضای خانواده انتروباکتریاسه، شایع‌ترین پاتوژن‌های عفونت دستگاه ادراری هستند که در طبیعت، در حیوانات (به ویژه پستانداران)، دستگاه گوارش انسان و محصولات غذایی و سبزیجات آلوده وجود دارند

عفونت دستگاه ادراری^۱ وضعیتی است که در آن هر قسمت از دستگاه ادراری (مجرای ادرار، مثانه، حالب و کلیه) با

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران.

پست الکترونیکی: Doudi@iaufala.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۳

(۴،۵). ۷۰-۹۵ موارد عفونت ادراری، ناشی از /شریشیا کلی و ۲۰-۵٪ موارد توسط کلبسیلا پنومونیه و تعدادی از موارد نیز توسط پروتئوس میرابیلیس ایجاد می‌شود (۶). امروزه مقاومت ضد میکروبی به یک نگرانی بزرگ تبدیل شده است که بسیاری از پیشرفت‌های پزشکی را در قرن بیست و یکم تهدید می‌کند. میکروارگانیسم‌های اوروپاتوژنیک نیز از این امر مستثنی نیستند. نرخ مقاومت ضد میکروبی در بین انتروباکتریاسه‌ها در سطح جهانی در حال افزایش است (۷) و درمان مناسب در برابر عفونت‌های ادراری به دلیل مقاومت بالا به آنتی بیوتیک‌های معمول تجویز شده و شیوع روزافزون جهانی میکروارگانیسم‌های مقاوم به چند دارو که باعث عفونت ادراری می‌شوند، چالش برانگیز شده است (۸). فناوری نانو یک دامنه علمی چند رشته‌ای است که به بررسی مواد در محدوده ی نانو، عموماً بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر پرداخته و در زمینه‌های مختلف علمی از جمله شیمی، فیزیک، زیست، دندان پزشکی، داروسازی و علم مواد مورد استفاده قرار گرفته است (۹،۱۰). برای سنتز نانوذرات، چندین روش فیزیکی و شیمیایی گزارش شده است، اما امروزه نیاز به توسعه روش‌های سنتز سازگار با محیط زیست که در طی فرایند از مواد سمی استفاده نمی‌کنند و انرژی کمی مصرف می‌کنند، افزایش یافته است (۱۱). روش‌های فیزیکی دارای مشکلاتی همچون؛ استفاده از تجهیزات گران قیمت، دما و فشار بالا و فضای وسیع برای راه اندازی ماشین آلات می‌باشند و روش‌های شیمیایی نیز دارای معایب استفاده از مواد شیمیایی سمی است که می‌تواند برای محیط زیست و کاربر خطرناک باشد (۱۲،۱۳). اخیراً برای سنتز نانوذرات، روش‌های جدید و پایدار تحت عنوان "نانوبیوتکنولوژی" توسعه یافته‌اند (۱۴). نانوتکنولوژی سبز راه حل مناسبی برای کاهش اثرات منفی تولید و کاربردهای نانو مواد و کاهش خطرات نانوتکنولوژی می‌باشد (۱۵،۱۶). بیشترین تولید جهانی در میان اکسیدهای فلزی نانو، برای TiO_2 ، SiO_2 و ZnO تخمین زده شده است. نانوذرات اکسیدروی (ZnO)^۲ علیه میکروارگانیسم‌ها مؤثر هستند و مکانیسم عمل آن‌ها به فعال شدن توسط نور و توانایی تجزیه غشای سلولی و تجمع در سیتوپلاسم که باعث مرگ سلولی می‌شود، نسبت داده شده است. نانوذرات ZnO به دلیل زیست سازگاری عالی و سمیت کم، به ویژه به عنوان ضد سرطان و ضد باکتری، به دلیل توانایی بالا در تحریک تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن^۳، آزاد کردن یون‌های روی و القای آپوپتوز

سلولی، در زیست پزشکی استفاده می‌شوند (۱۷،۱۸). علاوه بر این، ZnO به دلیل خواص غیر سمی، توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده ایمن شناخته شده است. در نتیجه، استفاده از آن برای انسان و حیوانات بی‌خطر می‌باشد (۱۹). سنتز نانوذرات اکسیدروی از طریق روش بیولوژیکی با استفاده از آنزیم‌ها، میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و عصاره آن‌ها به عنوان روشی بدون هزینه مطرح شده است. این روش سازگار با محیط زیست به دلیل عدم استفاده از مواد شیمیایی سمی و ترکیبات با انرژی بالا در فرایند سنتز، توجه زیادی را به خود جلب می‌کند و جایگزینی برای روش‌های شیمیایی و فیزیکی است (۲۰). گیاهان دارویی از دیرباز مورد استفاده مردم برای درمان بوده‌اند. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که گیاهان کاندید بسیار مناسب برای بیوسنتز نانوذرات در مقیاس بزرگ هستند و سرعت سنتز آن‌ها در مقایسه با سایر موجودات سریع‌تر است (۱۶). به همین دلیل، از عصاره‌های گیاهان می‌توان برای توسعه ترکیبات ضد میکروبی جدید با ساختارهای شیمیایی مختلف و مکانیسم‌های عمل جدید، برای ایجاد مانع در برابر گونه‌های مقاوم به چند دارو از میکروارگانیسم‌ها استفاده کرد (۲۱). بر اساس معیارهای تعیین شده توسط موسسه ملی استاندارد سرطان^۴، عصاره پوست موز برای سلول‌های طبیعی انسان غیر سمی می‌باشد بنابراین، آن را می‌توان به عنوان منبع طبیعی آنتی‌اکسیدان‌ها برای افزایش ارزش مواد غذایی استفاده کرد. موز به عنوان یک گیاه گرمسیری با تولید مقادیر زیادی آنتی‌اکسیدان از خود در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از نور خورشید و درجه حرارت بالا محافظت می‌کند (۲۲). موز علاوه بر نسبت بالای مشتقات قند، اسیدهای چرب اشباع نشده، استرول‌ها و مواد معدنی (مانند پتاسیم) و ویتامین‌های مختلف (به عنوان مثال، پروویتامین A، B₁، B₂، C)، دارای غلظت بالایی از مواد شیمیایی فعال زیستی مانند گلیکوزیدها، و اسیدهای مانند اسید اگزالیک و اسید مالیک است (۲۳). سالانه بیش از ۱۱۴ میلیون تن موز تولید می‌شود. پوست میوه تقریباً یک سوم وزن میوه را تشکیل می‌دهد، با توجه به اینکه معمولاً به عنوان دورریز در صنایع غذایی دور ریخته می‌شود، ارزان، در دسترس، غیر سمی و دوستدار محیط زیست بوده و همچنین طبق بررسی‌های محققین، دارای خواص ضد میکروبی مؤثری در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌باشد، در نتیجه، ثابت می‌شود که می‌توان

⁴ National Cancer Standard Institute

² Zinc oxide- ZnO

³ Reactive Oxygen Species- ROS

از عصاره پوست موز به عنوان منبع مناسبی برای سنتز آنتی بیوتیک‌های جدید استفاده نمود (۲۴،۲۵).

از میان روش‌های سنتز نانوذرات، روش شیمیایی مرطوب دارای مزایایی همچون؛ سنتز در دمای پایین، تولید محصولاتی با خلوص بالا، راندمان نسبتاً بالای تولید و مقرون به صرفه می باشد (۲۶). از روش رقت سازی آگار یا آگار دایلوژن^۵ برای بررسی مناطق عدم رشد میکروارگانیسم‌ها در یک نمونه مخلوط استفاده می‌شود، که قبل از انجماد به یک محیط آگار مذاب اضافه می‌شود. این روش به دلیل پخش یکنواخت نانوذرات در تمامی قسمت‌های پلیت و ارتباط موثر نانوذرات با باکتری‌ها می‌تواند به عنوان یک جهت ارزیابی قدرت ضد میکروبی نانوذرات مورد استفاده قرار بگیرد که در برخی از فرانس‌ها محققین به استفاده از این روش اشاره کرده اند (۲۷،۲۸). هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضد میکروبی بیونانوذرات اکسیدروی / پوست موز سنتز شده با روش شیمیایی مرطوب بر باکتری‌های شایع مسبب عفونت‌های ادراری و مقاوم به چند آنتی بیوتیک شامل : / شریشیا کلی، پروتئوس میرابیلیس و کلبسیلا پنومونیه بود.

مواد و روش‌ها

سنتز سبز نانوذرات اکسیدروی (ZnO)

جهت سنتز سبز نانو ذرات اکسیدروی، ابتدا پوست‌های موزهای خریداری شده از سیستان و بلوچستان ایران با آب مقطر استریل شستشو داده شد و سپس درون آون ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و پس از خشک شدن آسیاب گردید. در مرحله بعد، ۵ گرم از پودر پوست‌های خشک شده به همراه ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس جوشانده شد و در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) سرد شد، جهت جداسازی عصاره از سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ rpm استفاده شد (۲۹). مواد شیمیایی مصرف شده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان تهیه شده است. در مسیر سنتز، یک گرم نیترات روی ۶ آبه $(Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O)$ در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد. سپس محلول نیترات روی در ظرف واکنش (که یک بالون تک دهانه بود) ریخته شد و در حین هم خوردن یکنواخت با همزن مغناطیسی، ۵۰ میلی لیتر عصاره پوست موز قطره قطره (هر ۳ ثانیه یک قطره) از طریق سوکسله وارد بالن شد. در این آزمایش، تنظیم جریان

به گونه ای بود که در هر ۳ ثانیه یک قطره عصاره به بالن وارد می شد. براساس تجربه، در این نرخ، توزیع اندازه ذرات باریک تر است. در این مرحله و پس از گذشت چند دقیقه، آثار تشکیل نانوذرات در بالن قابل مشاهده بود. نرخ ورود محلول‌ها، سرعت چرخش مگنت و دیگر پارامترها تا پایان آزمایش بدون تغییر باقی ماندند تا همه ی نانوذرات در شرایط یکسان تولید گردند، سپس نانوذرات ZnO شروع به رسوب درون ظرف نمود. محصول به دست آمده ۴ بار با آب مقطر شست و شو داده شد و جهت خشک شدن، به مدت ۲۴ ساعت در آون ۵۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. سرانجام رسوب بدست آمده به مدت یک ساعت در کوره ۵۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. محصول بدست آمده توسط XRD ، UV-Vis و SEM مورد بررسی قرار گرفت. سپس جهت بررسی خاصیت ضد باکتریایی از روش کیفی آگار دایلوژن که در برخی از فرانس‌ها جهت ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات به آن اشاره شده است، استفاده شد (۲۷،۲۸).

مشخصه یابی نانوذره اکسید روی

پراش پرتو اشعه ایکس - (X-ray Diffraction - XRD)

برای بررسی ساختار بلوری بیونانوذرات سنتز شده، پودر به دست آمده، تحت آزمون پراش اشعه ایکس (XRD) قرار گرفت

(Bruker D8 ADVANCE $\lambda = 0.154 \text{ nm Cu K}\alpha$ radiation)

و داده‌های به دست آمده توسط نرم افزار Xpert High Score مورد بررسی قرار گرفت (۹).

طیف سنجی جذبی (Ultraviolet-visible spectroscopy - UV-Visible)

جهت مطالعه خاصیت اپتیکی نانو ذرات سنتز شده از طیف سنجی جذبی (UV-Visible) استفاده شد. دستگاه طیف سنجی جذب، ضریب جذب ماده را به ازای تابش طول موج‌های مرئی و فرابنفش (از ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر) اندازه گیری و رسم می نماید. از نانو ذرات تولید شده در حالت کلوییدی در حالتی طیف جذبی گرفته شد که دستگاه نسبت به آب مقطر کالیبره شده بود، تا اطمینان حاصل شود که طیف جذب حاصله تنها مربوط به نانوذرات نیمه رساناست. آنچه به عنوان ورودی به دستگاه داده می‌شود

⁵ Agar dilution method.

محلولی بسیار رقیق است که درون ظرفی از جنس کوارتز که در ناحیه طیفی فوق، جذبی ندارد ریخته شد. دستگاه مورد استفاده طیف سنجی مدل SPECORD S ۶۰۰ شرکت Analytik Jena بود (۱۰).

میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy -SEM)

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از مناسب‌ترین وسایل برای آزمایش و آنالیز مورفولوژی نانو ساختارها و شناسایی ترکیبات شیمیایی است و همچنین دارای توانایی بی‌نظیر برای بررسی سطح مواد بوده و حائز برتری‌های فراوانی نسبت به میکروسکوپ‌های نوری است. به همین علت، از میکروسکوپ الکترونی روبشی برای تعیین مورفولوژی و اندازه بیونانوذرات سنتز شده استفاده شد (۲۰). بیونانوذرات سنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی ساخت شرکت LEO آلمان مدل VP۱۴۵۵ مورد بررسی قرار گرفت.

جمع آوری نمونه

نمونه‌های کشت ادرار مثبت کودکان ۲-۱ سال مبتلا به عفونت ادراری از دو آزمایشگاه تشخیص طبی در اصفهان طی یکسال از ۱۵ فروردین ۱۳۹۹ تا ۱۵ فروردین ۱۴۰۰ جمع‌آوری شد. جمع‌آوری نمونه در این پژوهش با محدودیت‌هایی از قبیل؛ همکاری فقط دو آزمایشگاه تشخیص طبی و محدودیت سنی بیماران مواجه بود. نمونه‌های ادرار به‌صورت سوپراپوبیک یا کاتتریزاسیون از طریق پیشابراه از کودکان کمتر از ۲ سال و با استفاده از نمونه ادرار میانی در بیماران ۲ ساله در ظروف استریل جمع‌آوری شد. سپس با استفاده از لوپ کالیبره شده ی استاندارد (۰/۰۱ میلی لیتر) روی محیط‌های بلاد آگار و EMB آگار کشت داده شدند و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. نتیجه برابر یا بیشتر از 10^5 CFU/ml و آنالیز ادرار از طریق تشخیص میکروسکوپی باکتریوری و گرانولوسیت‌ها یا لکوسیت‌های پلی مورفونوکلر (10^2 leukocytes/mm²) به عنوان UTI مثبت در نظر گرفته شد و نتایج کمتر از CFU/ml 10^2 به عنوان UTI منفی تفسیر شد. نتیجه CFU/ml 10^4 - 10^2 تکرار شد (۳۱، ۳۰).

شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌ها و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

ایزوله‌ها با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژی، آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی و تعیین هویت شدند. برای شناسایی بیوشیمیایی از تست‌های افتراقی رنگ آمیزی گرم، اوره آز، تولید اندول، تست حرکت، سترات، تولید H₂S، TSI و متیل رد و وگس- پروسکوئر (MR-VP) مطابق جدول ۱ استفاده شد (۳۲). برای شناسایی مولکولی باکتری‌های مورد مطالعه، با استفاده از تکنیک Colony-PCR، قطعه‌ای از ژن rRNA ۱۶S با استفاده از پرایمرهای یونیورسال AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG و ΔF : GTA TTA CCG CGG CTG CTG G و ΔR : ۵۱۸R تکثیر و جهت تعیین توالی به شرکت پیشگام (تهران، ایران) ارسال شد (۳۳، ۳۴، ۳۵). توالی‌های حاصله به کمک سرور BLAST مورد ارزیابی همولوژی قرار گرفت (۳۶). طول قطعه هدف پرایمر حدود ۵۳۰ bp می‌باشد که در شکل ۱ نشان داده شده است. مواد و مقادیر مورد نیاز برای انجام Colony-PCR در جدول ۲ و برنامه ی PCR در جدول ۳ ارائه شده است. الکتروفورز روی ژل آگارز برای تفکیک و تعیین ماهیت و خالص سازی قطعات DNA استفاده می‌شود و در این مطالعه به منظور تایید وجود و اختصاصی بودن قطعات تکثیرشده با PCR از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سوبه‌های مورد مطالعه با بکارگیری ۱۴ دیسک آنتی بیوتیکی (پادتن طب، ایران) شامل؛ سفنازیدیم، ۳۰ میکروگرم (CAZ)، آمپی سیلین، ۱۰ میکروگرم (AM)، آمیکاسین، ۳۰ میکروگرم (AN)، کلرامفنیکل، ۳۰ میکروگرم (C)، نالیدیکسیک اسید، ۳۰ میکروگرم (NA)، سفیم ۳۰ میکروگرم (FEP)، نیتروفورانتوئین، ۳۰۰ میکروگرم (FM)، آموکسی سیلین، ۲۵ میکروگرم (AMX)، سیپروفلوکساسین، ۵ میکروگرم (CP)، جنتامایسین، ۱۰ میکروگرم (GM)، ایمپینم، ۱۰ میکروگرم (IPM)، سفتریاکسون ۳۰ میکروگرم (CRO)، تتراسیکلین ۳۰ میکروگرم (TE) و تری متوپریم/سولفامتوکسازول ۱،۲۵/۲۳،۷۵ میکروگرم (SXT) پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد مک فارلند (10^8 CFU/mL) × ۱/۵ بر روی محیط مولر-هینتون آگار (MHA) به روش انتشار دیسک در آگار (Kirby-Bauer) انجام شد و میانگین قطر هاله ی عدم رشد (برحسب میلی متر) بعد از سه بار تکرار گزارش شد و نتایج مطابق با دستورالعمل موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI 2020) بررسی گردید. از سوش‌های استاندارد /شریشیا کلی PTCC ۱۳۹۹، کلبسیلا پنومونیه PTCC ۱۲۹۰ و پروتئوس

میرابیلیس ۱۰۷۹ PTCC برای کنترل مثبت و از دیسک-های بلانک آغشته به سرم فیزیولوژی جهت کنترل منفی استفاده شد (۸،۳۷،۳۸).

بررسی فعالیت ضد باکتریایی بیونانوذرات

جهت بررسی اثرات ضدباکتریایی بیونانوذرات سنتز شده بر باکتری‌های شایع مسبب عفونت ادراری در کودکان زیر دو سال شامل: *اشریشیا کلی*، *پروتئوس میرابیلیس* و *کلبسیلا پنومونیه* ی مقاوم به چند داروی جدا شده از ادرار کودکان از روش آگار دایلوژن، بر اساس چند فرانس استفاده شد (۲۷). ابتدا ۶ غلظت مختلف از بیونانوذرات سنتز شده شامل (۰/۰۷۵ گرم بر لیتر، ۰/۱۵ گرم بر لیتر، ۰/۳ گرم بر لیتر، ۰/۶ گرم بر لیتر، ۱/۲ گرم بر لیتر، ۲/۴ گرم بر لیتر) در حلال آب مقطر استریل تهیه، ورتکس و اتوکلاو شد. پس از ورتکس مجدد، هرکدام در پتری دیش استریل (۱۰ سانتی متری) ریخته و ۱۹ میلی لیتر محیط کشت مذاب مولر هینتون آگار استریل که حرارت آن به حدود ۴۵ درجه سلسیوس رسیده بود، به هر کدام از پتری دیش‌ها اضافه و با حرکات دورانی محیط با رقت‌های مختلف بیونانوذرات کاملاً مخلوط گردید. پلیت کنترل منفی فاقد نانوذره بود. جهت کنترل مثبت از پودر تجاری جنتامایسین تهیه شده از شرکت سیگما با رقت ۰/۰۷۵ گرم بر لیتر استفاده شد. در مرحله بعد، پس از بسته شدن محیط‌های کشت با غلظت‌های مختلف نانوذرات، سوسپانسیون باکتری‌های مورد نظر، معادل نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ CFU/mL) تهیه و به صورت کشت چمنی در کنار شعله زیر هود لامینار کلاس دو بر روی پلیت‌ها کشت داده شد و در نهایت به مدت ۲۴ ساعت در دمای انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد.

تحلیل آماری

جهت آنالیز آماری داده‌ها از آزمون One-way ANOVA، آزمون Tukey's post hoc و آزمون مربع کای استفاده شد و سپس نتایج با استفاده از نرم افزار Graphpad prism ۸ تجزیه و تحلیل شد. مرز معنی داری روی $P < 0.05$ قرار داده شد.

یافته‌ها

در این پژوهش، در مجموع ۲۵ کشت ادرار مثبت مربوط به کودکان زیر دو سال و مقاوم به چند دارو، مورد بررسی قرار

گرفت، که ۱۶ (۶۴٪) مورد مربوط به *اشریشیا کلی*، ۶ (۲۴٪) مورد مربوط به *کلبسیلا پنومونیه* و ۳ (۱۲٪) مورد مربوط به *پروتئوس میرابیلیس* بود و پس از شناسایی بیوشیمیائی، با تست‌های افتراقی، بر اساس نتایج Colony-PCR ایزوله‌ها که با تکثیر ژن ۱۶S rRNA در ژل آگارز ۱٪ به دست آمد، مورد ارزیابی و شناسایی دقیق قرار گرفتند. نتایج شناسایی بیوشیمیائی و مولکولی باکتری‌های شایع مسبب عفونت‌های ادراری در کودکان در جدول ۱، شکل ۱ و تست آنتی بیوگرام ایزوله‌ها در جدول ۴ ارائه شده است. مطابق با نتایج جدول ۴، بیشترین موارد مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین (۱۰۰٪)، آموکسی سیلین (۱۰۰٪)، تتراسایکلین (۱۰۰٪) و بیشترین حساسیت مربوط به آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل، جنتامایسین، تری متوپریم/ سولفامتوکسازول بود. اختلاف معنی دار آماری ($P < 0.05$) بین میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، آموکسی سیلین، تتراسایکلین و آنتی بیوتیک‌های کلرامفنیکل، جنتامایسین، تری متوپریم/ سولفامتوکسازول مشاهده شد. طبق آنالیز آماری نتایج آنتی بیوگرام، خطای استاندارد میانگین^۶ باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *پروتئوس میرابیلیس* و *کلبسیلا پنومونیه* به ترتیب، ۱/۱۴۵، ۱/۵۷۵ و ۱/۵۴۴ بود. در این تحقیق نانوذرات اکسیدروی به روش شیمیایی مرطوب با استفاده از عصاره پوست موز سنتز شد. نتایج XRD در شکل ۲ بر اساس مرجع (۲۲۰۵-۷۹-ZnO JCPDS) نشان داد که، الگوی پراش اشعه X مربوط به بیونانوذرات اکسیدروی بوده و بیشینه‌های ناشی از صفحات (۱۱۱)، (۱۰۰)، (۰۰۲)، (۱۰۱)، (۱۰۲)، (۱۱۰)، (۱۰۳) و (۲۰۱) به وضوح در آن مشاهده شد. همچنین بر اساس نتایج طیف‌سنجی جذبی و میکروسکوپ الکترونی روبشی، بیونانوذرات اکسیدروی سنتز شده دارای جذب در طول موج ۲۵۸ نانومتر و دارای ساختار شش وجهی با اندازه ۱۰۰ نانومتر بود (شکل‌های ۳ و ۴). خواص ضدباکتریایی بیونانوذرات اکسیدروی/ پوست موز سنتز شده بر علیه تمامی باکتری‌ها با روش آگار دایلوژن ارزیابی شد به طوری که غلظت ۰/۶ گرم بر لیتر بیونانوذرات اولین و مناسب ترین غلظت موثر بود که منجر به مهار رشد تمامی باکتری‌ها شده بود ($P < 0.05$) و غلظت ۲/۴ گرم بر لیتر، بیشترین مهار رشد باکتری‌ها را به صورت معنی دار نشان داد ($p < 0.001$).

جدول ۱. نتایج تست های بیوشیمیایی باکتری های اوروپاتوژن جدا شده از عفونت های ادراری کودکان زیر دو سال در دو آزمایشگاه تشخیص طبی اصفهان.

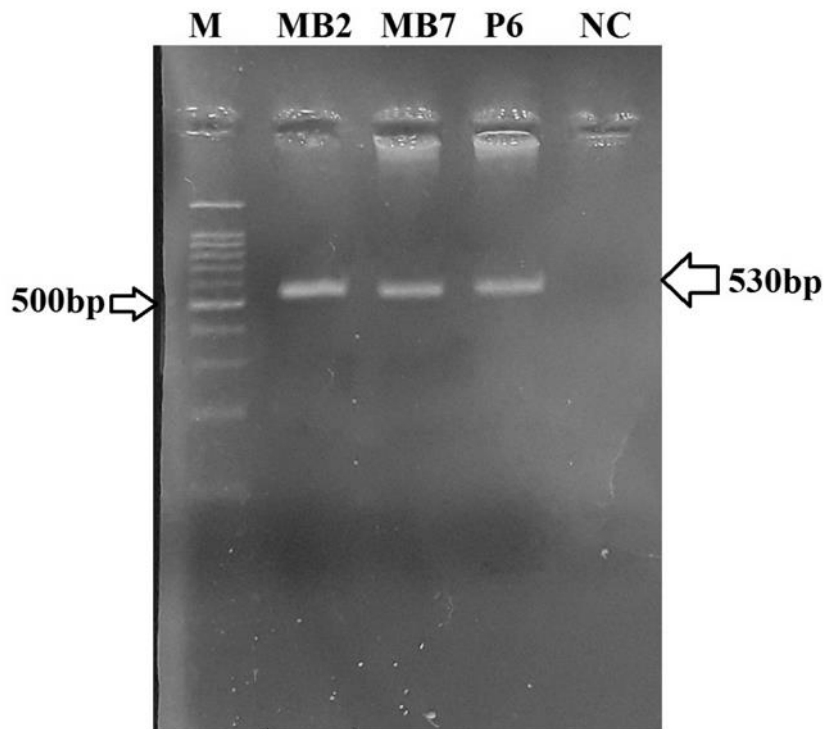
تست	جدایه		
	اشریشیا کلی	کلبسیلا پنومونیه	پروتئوس میرابیلیس
واکنش گرم	-	-	-
اوره آز	-	+	+
تولید اندول	+	-	-
تست حرکت	+	-	+
سیترات	-	+	+/-
تولید H ₂ S	-	-	+
TSI	-	-	+
متیل رد	+	-	+
ووگس - پروسکوئر	-	+	+/-

جدول ۲. مواد و مقادیر مورد نیاز برای انجام Colony-PCR.

ماده	غلظت استوک	PCR غلظت برای واکنش	حجم نهایی در ۲۵ میکرولیتر
آب مقطر تزریقی استریل	-	-	۱۸/۰۵ میکرولیتر
بافر PCR	۱۰ X	۱ X	۲/۵ میکرولیتر
کلرید منیزیم	۵۰ میلی مولار	۱/۵ میلی مولار	۰/۷۵ میکرولیتر
dNTP	۱۰ میلی مولار	۲۰۰ میکرومولار	۰/۵ میکرولیتر
پرایمر پیشرو	۱۰ میکرومولار	۰/۴ میکرومولار	۱ میکرولیتر
پرایمر معکوس	۱۰ میکرومولار	۰/۴ میکرومولار	۱ میکرولیتر
مقداری از یک کلنی باکتری مورد نظر	متغیر	۱	۱ میکرولیتر
Taq پلیمرز	۵ یونیت پرمیکرولیتر	۱ یونیت	۰/۲ میکرولیتر
حجم نهایی			۲۵ میکرولیتر

جدول ۳. برنامه دمایی PCR.

تعداد سیکل	زمان	دما
۱ Cycle	۵ min	۹۴ °C
۳۵ Cycle	۳۰ sec	۹۴ °C
	۳۰ sec	۵۵ °C
	۳۰ sec	۷۲ °C
۱ Cycle	۵ min	۷۲ °C
۱ Cycle	۱ min	۱۰ °C



شکل ۱. Colony-PCR: تکثیر ژن rRNA ۱۶S در ژل آگارز ۱٪. M: مارکر وزنی (۱۰۰bp)، MB2، MB7 و P6 ایزوله‌های مورد بررسی اشریشیا کلی، پروتئوس میرابیلیس و کلبسیلا پنومونیه. NC: کنترل منفی

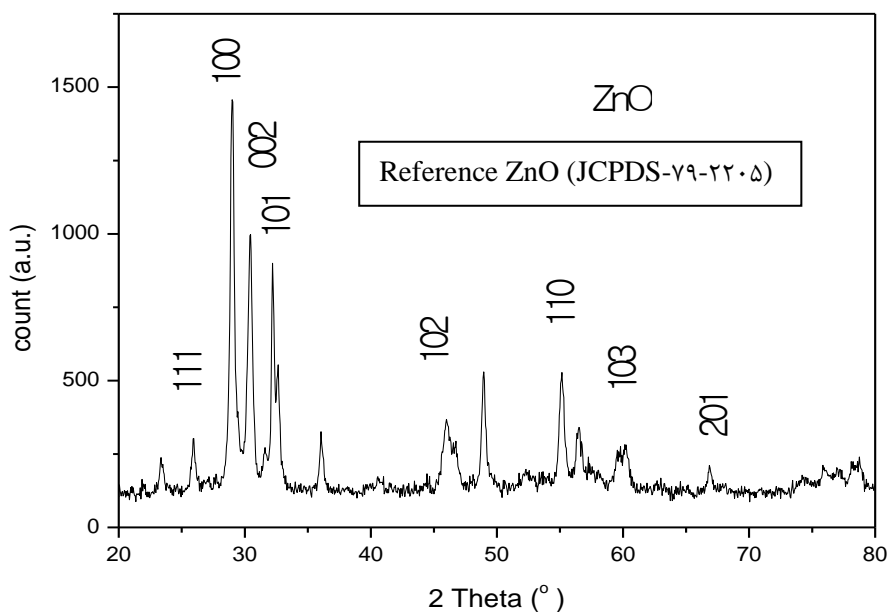
جدول ۴. میانگین نتایج آنتی بیوگرام باکتری‌های اوروپاتوزن جدا شده از عفونت‌های ادراری کودکان زیر دو سال در دو آزمایشگاه تشخیص طبی اصفهان.

۱۰۶

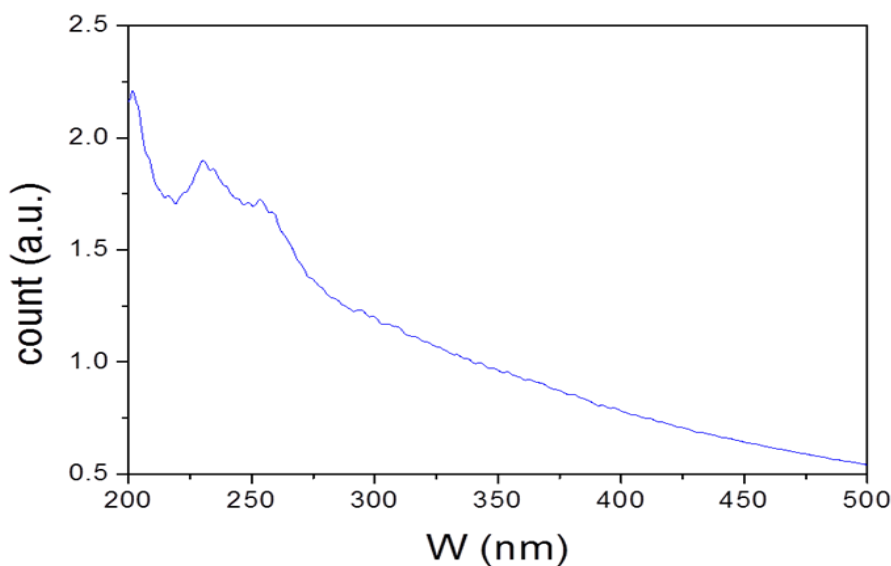
SE= ۱/۵۴۴			SE= ۱/۵۷۵			SE= ۱/۱۴۵			
کلبسیلا پنومونیه			پروتئوس میرابیلیس			اشریشیا کلی			
مقاوم	نیمه حساس	حساس	مقاوم	نیمه حساس	حساس	مقاوم	نیمه حساس	حساس	آنتی بیوتیک
*					*	*			سفتازیدیم (CAZ ۳۰ µg)
*			*			*			آمپی سیلین (AM ۱۰ µg)
		*			*	*			آمیکاسین (AN ۳۰ µg)
		*			*			*	کلرامفنیکل (C ۳۰ µg)
			*			*			نالیدیکسیک اسید (NA ۳۰ µg)
	(۱۵mm)*		*			*			سفیپیم (FEP ۳۰ µg)
*					*			*	نیتروفورانتوئین (FM ۳۰۰ µg)
		*	*					*	

*			*		*			آموکسی سیلین (۲۵ μg) (AMX)	
		(۲۸mm)*		*	*			سیپروفلوکساسین (۵ μg) (CP)	
		*			*		*	جنتامایسین (۱۰ μg) (GM)	
	*			*	*			ایمپنم (۱۰ μg) (IPM)	
*					*	*			سفتریاکسون (۳۰ μg) (CRO)
*			*			*			تتراسیکلین (۳۰ μg) (TE)
		mm)* (۱۷)						*	تری متوپریم/سولفامتوکسازول (۱/۲۵ μg / ۲۳/۷۵ μg) (SXT)

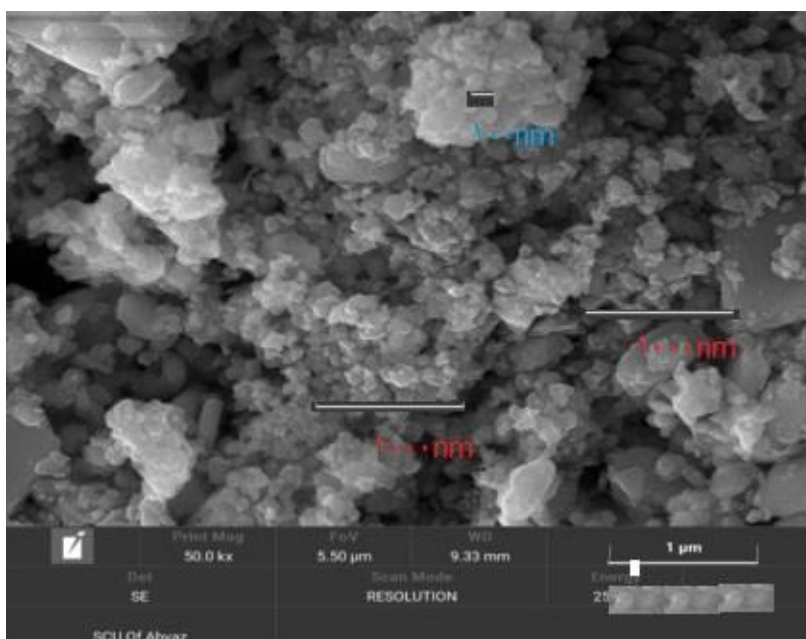
۱۰۷



شکل ۲. الگو پراش اشعه ایکس (XRD): پیک ها مربوط به بیونانوذرات اکسیدروی/ پست موز.



شکل ۳. طیف جذبی فرابنفش (Uv.Vis): بیونانوذرات اکسیدروی/پوست موز.



شکل ۴. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی بیونانوذرات اکسیدروی / پوست موز: سایز نانوذرات ۱۰۰ نانومتر.

بحث

از سیستم ادراری رخ دهد و عوارض قابل توجه مانند نارسایی کلیوی، باکتری می و شوک سپتیک و هزینه های پزشکی بالایی به خصوص برای بچه های زیر دو سال در بر دارد و همچنین می تواند منجر به مرگ و میر فراوانی شود (۳۹،۴۰). عفونت مجاری ادراری در نوزادان دختر و نوزادان پسر ختنه نشده، به علت غلظت فلور باکتریایی پوست در زیر پوشک در نوزادی،

بیماری های عفونی به دلیل افزایش مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی، به عنوان یک مشکل بهداشت عمومی در سراسر جهان باقی مانده اند. این مشکلات نیاز به دوزهای بالای آنتی بیوتیک را افزایش می دهد که اغلب منجر به سمیت غیرقابل تحمل می شود. عفونت دستگاه ادراری یکی از شایع ترین عفونت ها در انسان به خصوص در کودکان است که می تواند در هر قسمتی

نزدیکی مقعد و دهانه مجاری ادراری در دختران، سطح پوست ختنه‌گاه در پسران ختنه نشده شایع تر است. از این رو تشخیص و درمان این عفونت در کودکان زیر دو سال اهمیت بسزایی دارد (۴۱). درمان مناسب عفونت‌های دستگاه ادراری به دلیل مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک‌های معمول تجویز شده و افزایش شیوع جهانی میکروارگانسیم‌های مقاوم به چند دارو که باعث عفونت‌های دستگاه ادراری می‌شوند، با چالش مواجه شده است (۸). از این رو، استراتژی‌های جایگزین برای درمان عفونت‌های باکتریایی جستجو شد. نانوبیوتکنولوژی راهکارهای جدیدی برای مبارزه با باکتری‌های مقاوم به انواع داروها از طریق تولید ذرات سبز در مقیاس نانو به عنوان عوامل ضد میکروبی جدید معرفی کرده است. این بیونانوذرات با اتصال مناسب و مؤثر به سطح سلول‌های باکتری‌ها از راه دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی با باکتری‌ها مقابله می‌کنند. نانوذرات سبز علاوه بر خاصیت ضد میکروبی مناسب، دارای مزیت‌هایی مانند اندازه یا سایز بسیار کوچک و عدم ایجاد مقاومت و مقرون به صرفه بودن جهت تولید داخلی نیز هستند. مهمترین مزیت این نانوذرات عدم ایجاد مقاومت در باکتری‌ها است. زیرا این ذرات بر روی قسمت‌های مختلف باکتری‌ها و آنزیم‌های متعددی مؤثر هستند و عوارض جانبی ندارند و دارای ماندگاری زیاد می‌باشند (۴۲،۴۳،۴۴). پوست موز زیست تخریب پذیر، زیست سازگار، غیر توکسیک و دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی بدون عارضه است همچنین، تحقیقات محققان نشان داده است که عصاره پوست موز بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مسبب عفونت ادراری مؤثر بوده است، به همین دلیل استفاده از عصاره پوست موز برای سنتز نانوذرات مناسب می‌باشد (۲۴،۲۵). نانوذرات اکسیدروی به عنوان سمی‌ترین و مؤثرترین نانوذرات در برابر باکتری‌های مسبب عفونت‌های دستگاه ادراری به‌ویژه /شیریشیا کلی معرفی شده‌اند (۴۵). مشابه با یافته‌های این پژوهش، Brosh-Nissimov و همکاران در سال ۲۰۱۹، /شیریشیا کلی را با فراوانی ۶۴ درصد شایع‌ترین میکروارگانسیم جدا شده از عفونت ادراری کودکان و سپس کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس میرابیلیس را به ترتیب با فراوانی ۲۴ درصد و ۱۲ درصد اعلام کردند (۴۶). نتایج تحقیق اکرمی و همکاران در سال ۱۴۰۰ در اهواز (مشابه نتایج تحقیق حاضر) نشان داد که، بیشترین سویه جدا شده از ادرار کودکان، مربوط به /شیریشیا کلی با فراوانی ۵۷ درصد بود و بالاترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آمپی سیلین بود (۴۷). نتایج این پژوهش تقریباً مشابه با مطالعه Duicu و همکاران طی سال‌های ۲۰۱۶-۲۰۱۸ در رومانی بر روی گونه‌های جدا شده از کشت ادرار کودکان زیر ۵

سال بود که بالاترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین و آموکسی سیلین نشان داده بودند (۴۸). مقاومت بالای باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج زنگ خطری می‌باشد جهت مداوای بیماران و خطراتی به پژوهشگران جهت سنتز و ساخت آنتی‌بیوتیک‌های نو ترکیب با ارزیابی خواص توکسی‌سیتی آنها در شرایط درون تنی بر روی حیوانات آزمایشگاهی جهت استفاده انسان‌ها می‌باشد. ZnO یک ماده چند منظوره با کاربردهای فراوان است که در کرم‌های ضد آفتاب، لوازم آرایشی، تصفیه آب و فاضلاب، تجهیزات پزشکی، دندانپزشکی و صنایع دارویی بسیار مورد استفاده قرار گرفته است (۴۹). همچنین دارای اثرات ضد باکتریایی علیه طیف وسیعی از باکتری‌های بیماری‌زای انسانی و حیوانی با سمیت کم برای سلول‌های پستانداران می‌باشد (۵۰). نتایج مطالعه Pantidos و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مورد سنتز بیولوژیکی نانوذرات فلزی نشان داد که روش‌های سنتز سبز به انرژی و هزینه کمتری نیاز دارد و دارای سمیت بسیار پایین یا فاقد اثرات سمی است (۵۱). در سال ۲۰۱۵، Varghese & George با استفاده از عصاره برگ /آلوئه ورا، نانوذرات اکسیدروی را به شکل شش وجهی با اندازه ۲۲/۱۸ نانومتر سنتز کردند که اگر چه از نظر اندازه با مطالعه‌ی حاضر متفاوت بود، اما از نظر شکل نانوذرات و طریقه سنتز سبز و تاثیرات ضدباکتریایی مناسب، با این مطالعه مطابقت داشت (۵۲). در سال ۲۰۱۶، Dobrucka & Dugaszewska، نانوذرات اکسیدروی را با استفاده از عصاره گل شبدر قرمز (*Trifolium pratense*) بیوسنتز کردند، اندازه نانوذرات سنتز شده در این مطالعه بین ۱۰۰ تا ۱۹۰ نانومتر بود و این نانوذرات فعالیت ضد باکتریایی موثری را در برابر سویه‌های بالینی *Staphylococcus aureus*، *Sodomonas آئروجینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) و /شیریشیا کلی نشان داده بودند، نتایج این محققین از نظر سنتز سبز نانوذرات و اندازه و شکل نانوذرات و خواص ضدباکتریایی بسیار شبیه پژوهش حاضر بود (۵۳). بر اساس مطالعه رفیعی و همکاران در سال ۲۰۱۸، نشان داده شد که عصاره آبی برگ /کالیپتوس قادر به تولید نانوذرات اکسیدروی از سولفات روی با خواص ضد باکتریایی مناسب بود (۵۴). Faisal و همکاران در سال ۲۰۲۱، با استفاده از عصاره آبی میوه جوز هندی (*Myristica fragrans*)، نانوذرات اکسیدروی را سنتز کردند. نانوذرات سنتز شده توسط پراش اشعه ایکس، طیف سنجی جذب عبوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که نانوذرات، خالص، دارای اندازه ۴۱/۲۳ نانومتر، به شکل کروی و دارای خواص ضد باکتریایی مناسبی

سیاسگزاری

این پژوهش حاصل قسمتی از پایان نامه دکتری رشته میکروبیولوژی با کد ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۸۱۰۰۱ و شناسه اخلاق IR.IAU.FALA.REC.1399.013 از دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان می‌باشد. نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به منظور حمایت‌های اجرایی و از پرسنل دو آزمایشگاه تشخیص طبی در اصفهان جهت جمع آوری نمونه‌ها کمال تشکر و امتنان را دارند.

بودند که از نظر شکل نانوذرات با این مطالعه، تفاوت و از نظر دارا بودن خواص ضدباکتریایی، مطابقت داشت (۵۵). زینی وند و همکاران در سال ۱۴۰۱، مطابق با مطالعه ی حاضر، سنتز نانوذرات را با روش زیستی انجام دادند و برای ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده از روش آگار دایلووشن استفاده کردند (۵۶). در مطالعه حاضر نیز از عصاره آبی پوست موز، نانوذرات اکسیدروی از نیترات روی، سنتز شد که این بیونانوذرات دارای فعالیت ضد باکتریایی مناسبی بودند، ولی به نظر می‌رسد جهت تکمیل نمودن مطالعه حاضر و تعمیم آن برای مصارف انسانی نیاز به ارزیابی بیونانوذرات سنتز شده در شرایط درون‌تنی بر روی حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، در مجموع ۲۵ ایزوله باکتری مقاوم به چند دارو از نمونه ادرار کودکان زیر ۲ سال مبتلا به عفونت ادراری از دو آزمایشگاه تشخیص طبی در اصفهان جمع‌آوری و با تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند و همچنین با روش مولکولی Colony-PCR و استفاده از ژن ۱۶S rRNA نیز مورد تأیید قرار گرفتند. /شیریشیا کلی با فراوانی ۶۴٪ شایع‌ترین علت عفونت ادراری در کودکان زیر دو سال معرفی شد. با توجه به نتایج این مطالعه و مقایسه با مطالعات قبلی، کلرامفنیکل، جنتامایسین و تری متوپریم/سولفامتوکسازول همچنان داروهای موثری برای درمان تجربی عفونت‌های ادراری در کودکان هستند. در این تحقیق مشخص شد که عصاره آبی پوست موز توانایی تولید نانوذرات اکسیدروی از نیترات روی را به روش شیمیایی مرطوب دارد. با توجه به نتایج XRD، SEM و UV-Vis، ثابت شد که اکسیدروی سنتز شده دارای ساختار شش وجهی با اندازه ۱۰۰ نانومتر و دارای جذب در طول موج ۲۵۸ نانومتر بود. سپس با استفاده از روش آگار دایلووشن مشخص شد که تاثیر ضد باکتریایی این بیونانوذرات وابسته به غلظت می‌باشد و غلظت حداقل ۰/۶ گرم بر لیتر، فعالیت ضد باکتریایی مناسبی بر علیه تمامی باکتریها (شیریشیا کلی، پروتئوس میرابیلیس و کلبسیلا پنومونیه) که به چندین آنتی بیوتیک مقاوم بودند، داشت و موثر شناخته شد. بنابراین، انتظار می‌رود که بیونانوذرات سنتز شده در این مطالعه، به عنوان یک عامل ضد باکتریایی در کاربردهای پزشکی در آینده پس از آزمایشات *In vivo* و پردازش و عمل آوری توسط داروسازان جهت درمان باکتری‌هایی که به چند آنتی بیوتیک مقاوم شده‌اند و از عفونت‌های مختلف جداسازی و شناسایی شده‌اند مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Das S. Natural therapeutics for urinary tract infections—a review. *FJPS*. 2020 Dec;6(1):1-13.
2. Raeispour M, Ranjbar R. Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*. 2018 Dec;7(1):1-9.
3. Shah C, Baral R, Bartaula B, Shrestha LB. Virulence factors of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiology*. 2019 Dec;19(1):1-6.
4. Petty LA, Henig O, Patel TS, Pogue JM, Kaye KS. Overview of meropenem-vaborbactam and newer antimicrobial agents for the treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Infect Drug Resist*. 2018 Sep; 11:1461.
5. Mohseni Afshar Z, Miladi R, Janbakhsh A, Mansouri F, Sayad B, Vaziri S, Afsharian M, Zamanian MH, Shirvani M, Yavari S, Tarlan M. The Prevalence and Pattern of *Enterobacter* Antibiotic Resistance in the Patients Admitted to Imam Reza Hospital in Kermanshah, Iran (2016-2018). *J Kermanshah Univ Med Sci*. 2021 Mar;25(1):1-6.
6. Rafalskiy V, Pushkar D, Yakovlev S, Epstein O, Putilovskiy M, Tarasov S, Glazunov A, Korenev S, Moiseeva E, Gorelysheva N. Distribution and antibiotic resistance profile of key Gram-negative bacteria that cause community-onset urinary tract infections in the Russian Federation: RESOURCE multicentre surveillance 2017 study. *JGAR*. 2020 Jun; 21:188-194.
7. Hrbacek J, Cermak P, Zachoval R. Current antibiotic resistance patterns of rare uropathogens: survey from Central European Urology Department 2011–2019. *BMC Urology*. 2021 Dec;21(1):1-8.
8. Vazouras K, Velali K, Tassiou I, Anastasiou-Katsiardani A, Athanasopoulou K, Barbouni A, Jackson C, Folgari L, Zaoutis T, Basmaci R, Hsia Y. Antibiotic treatment and antimicrobial resistance in children with urinary tract infections. *JGAR*. 2020 Mar; 20:4-10.
9. Gour A, Jain NK. Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol*. 2019 Dec;47(1):844-851. doi.org/10.1080/21691401.2019.1577878.
10. Umavathi S, Mahboob S, Govindarajan M, Al-Ghanim KA, Ahmed Z, Virik P, Al-Mulhm N, Subash M, Gopinath K, Kavitha C. Green synthesis of ZnO nanoparticles for antimicrobial and vegetative growth applications: A novel approach for advancing efficient highquality health care to human wellbeing. *SJBS*. 2021 Mar;28(3):1808-1815.
11. Modi S, Fulekar MH. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using garlic skin extract and its characterization. *J Nanostruct*. 2020 Jan;10(1):20-27.
12. Jan H, Shah M, Usman H, Khan A, Muhammad Z, Hano C, Abbasi BH. Biogenic synthesis and characterization of antimicrobial and anti-parasitic zinc oxide (ZnO) nanoparticles using aqueous extracts of the Himalayan columbine (*Aquilegia pubiflora*). *Frontiers in Materials*. 2020 Aug; 7:249.
13. Agarwal H, Kumar SV, Rajeshkumar S. A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles—An eco-friendly approach. *Resource-Efficient Technologies*. 2017 Dec;3(4):406-413.
14. Naikoo GA, Mustaqeem M, Hassan IU, Awan T, Arshad F, Salim H, Qurashi A. Bioinspired and green synthesis of nanoparticles from plant extracts with antiviral and antimicrobial properties: A critical review. *J. Saudi Chem. Soc*. 2021 Sep;25(9):1-17.

15. El Shafey AM. Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles from plant leaf extracts and their applications: A review. GREENPS. 2020 Jun;9(1):304-339.
16. Selim YA, Azb MA, Ragab I, Abd El-Azim MH. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using aqueous extract of *Deverra tortuosa* and their cytotoxic activities. Sci. Rep. 2020 Feb;10(1):1-9.
17. Jiang J, Pi J, Cai J. The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. Bioinorg Chem Appl. 2018 Oct; 2018:1-18.
18. Vimercati L, Cavone D, Caputi A, De Maria L, Tria M, Prato E, Ferri GM. Nanoparticles: An experimental study of zinc nanoparticles toxicity on marine crustaceans. General overview on the health implications in humans. Front. Public Health. 2020 May; 8:192.
19. Yusof HM, Mohamad R, Zaidan UH. Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review. J. Anim. Sci. 2019 Dec;10(1):1-22.
20. Surendra TV, Roopan SM, Al-Dhabi NA, Arasu MV, Sarkar G, Suthindhiran K. Vegetable peel waste for the production of ZnO nanoparticles and its toxicological efficiency, antifungal, hemolytic, and antibacterial activities. NRL. 2016 Dec;11(1):1-10.
21. Saleem M, Saeed MT. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. J. King Saud Univ. Sci. 2020 Jan;32(1):805-810.
22. Chakraborty C, Bandyopadhyay K. Banana Peel Wastes: Potential Source of Antioxidant in Banana Chips. IJASR. 2017 Apr;7(2):73-80.
23. Mostafa HS. Banana plant as a source of valuable antimicrobial compounds and its current applications in the food sector. JFS. 2021 Sep;86(9):3778-3797.
24. Putra NR, Aziz AHA, Faizal ANM, Che Yunus MA. Methods and Potential in Valorization of Banana Peels Waste by Various Extraction Processes: In Review. Sustainability. 2022 Aug;14(17):1-18.
25. Saleem M, Saeed MT. Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. J. King Saud Univ. Sci. 2020 Jan;32(1):805-810.
26. Dien ND. Preparation of various morphologies of ZnO nanostructure through wet chemical methods. Adv Mater Sci. 2019; 4:1-5. doi: 10.15761/AMS.1000147.
27. Sanders ER. Aseptic laboratory techniques: plating methods. JoVE. 2012 May; 63: e3064.
28. Kumar A, Murthy LN, Jeyakumari A. Plating methods used in microbiology. Mumbai Research Centre of ICAR-Central Institute of Fisheries Technology, Vashi, India. 2019 ;8-12.
29. Ananthalakshmi R, Xavier Rajarathinam SR, Lavanya A, Mohammed Sadiq A, Gomathi AC. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using aqueous extract of Banana Peel (*Musa acuminata L.*). IJBASR. 2017 ;7(12):98-107.
30. Benhadj M, Touaitia R, Ouanadi Y. Frequency and Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae Isolated in Community Urinary Tract Infections at Tebessa Region. BJSTR. 2019 Dec;12(2): 9098-9101. doi: 10.26717/ BJSTR.2018.12.002223.
31. Goudarzi M, Sabzehali F, Tayebi Z, Azad M, Boromandi S, Hashemi A, Seyedjavadi SS. Prevalence of blaCTX-M gene in multi-resistant *Escherichia coli* isolated from Urinary Tract Infections, Tehran, Iran. NBM. 2014 Jan;2(4): 107-113. doi:10.22037/nbm.v2i4.6776.

32. Mousavi MM, Tazari F. Evaluating the prevalence antibiotic resistance pattern of bacteria isolated from urinary tract infection in Savadkuh city from the beginning of April 2020 to the end of September 2020. NCMBJ. 2022 Mar;12(46):55-64. [In Persian].
33. Eden PA, Schmidt TM, Blakemore RP, Pace NR. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. Int. J. Syst. Evol. 1991 Apr;41(2):324-325.
34. James G. Universal bacterial identification by PCR and DNA sequencing of 16S rRNA gene. In PCR for clinical microbiology. Springer, Dordrecht. 2010 Jan;209-214.
35. Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR, Fields MW. "Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China". Appl. Environ. Microbiol. 2006 Jun;72(6):3832-3845.
36. Najafi M, Nakhaei Moghaddam M. and Yousefi E. The effect of silver nanoparticles on pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. AJMB. 2021 Apr;13(2):98-103.
37. Pourakbari B, Mamishi S, Shokrollahi M, Heydari H, Mahmoudi S, Banar M, Sadeghi RH, Movahedi Z. Molecular characteristics and antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in children admitted to children's referral hospital of Qom, Iran. Ann Ig. 2019 Apr;31(3):252-62. doi:10.7416/ai.2019.2288.
38. Pirouzi A, Foruozandeh H, Farahani A, Shamseddin J, Mohseni H, Abdollahi A, Rezaee E, Forouzandeh Z, Mohseni P, Fariyabi F. Investigation of Antimicrobial Resistance Pattern Among *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients Referred to Amir Al-Momenin Hospital, Gerash, Iran. Gene, Cell and Tissue. 2020 Jan;7(1):1-6. doi:10.5812/gct.97554.
39. Doern CD, Richardson SE. Diagnosis of Urinary Tract Infections in Children. JCM. 2016 Sep;54(9):2233-2242.
40. Okarska-Napierała M, Wasilewska A, Kuchar E. Urinary tract infection in children: Diagnosis, treatment, imaging-Comparison of current guidelines. J. Pediatr. Urol. 2017 Dec;13(6):567-573.
41. Kaufman J, Temple-Smith M, Sanci L. Urinary tract infections in children: an overview of diagnosis and management. BMJ paediatrics open. 2019 Sep;3(1):1-9.
42. Naikoo GA, Mustaqeem M, Hassan IU, Awan T, Arshad F, Salim H, Qurashi A. Bioinspired and green synthesis of nanoparticles from plant extracts with antiviral and antimicrobial properties: A critical review. J. Saudi Chem. Soc. 2021 Sep;25(9):1-17.
43. Vimercati L, Cavone D, Caputi A, De Maria L, Tria M, Prato E, Ferri GM. Nanoparticles: An experimental study of zinc nanoparticles toxicity on marine crustaceans. General overview on the health implications in humans. Frontiers in Public Health. 2020 May; 8:1-19.
44. Jiang J, Pi J, Cai J. The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. Bioinorg Chem Appl. 2018 Oct; 2018:1-18.
45. Shakerimoghaddam A, Ghaemi E.A, Jamalli A. Zinc oxide nanoparticle reduced biofilm formation and antigen 43 expressions in uropathogenic *Escherichia coli*. IJBMS. 2017 Apr;20(4):451-456.
46. Brosh-Nissimov T, Navon-Venezia S, Keller N, Amit S. Risk analysis of antimicrobial resistance in outpatient urinary tract infections of young healthy adults. JAC. 2019 Feb;74(2):499-502.
47. Akrami S, Mavalizade SM, Ghandali MV, Dezfuli AAZ, Farshadzadeh Z, Avarvand AY. Prevalence and antibiotic resistance of uropathogens in children with urinary tract infections referring to Abuzar hospital in Ahvaz. J Curr Biomed Rep. 2021 Sep;2(3):136-141.

48. Duicu C, Cozea I, Delean D, Aldea AA, Aldea C. Antibiotic resistance patterns of urinary tract pathogens in children from Central Romania. ETM. 2021 Jul;22(1):1-7.
49. Spoială A, Ilie CI, Trușcă RD, Oprea OC, Surdu VA, Vasile BȘ, Fikai A, Fikai D, Andronescu E, Dițu LM. Zinc Oxide Nanoparticles for Water Purification. Materials. 2021 Aug;14(16):1-15.
50. Alekish M, Ismail ZB, Albiss B, Nawasrah S. In vitro antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: An alternative approach for antibacterial therapy of mastitis in sheep. WVJ. 2018 Nov;11(10):1428-1432. doi: 10.14202/vetworld.2018.1428-1432.
51. Pantidos N, Horsfall LE. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. JNN. 2014 Sep;5(5):1-10.
52. Varghese E, George M. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles. IJARSE. 2015 ;4(1):307-314.
53. Dobrucka R, Długaszewska J. Biosynthesis and antibacterial activity of ZnO nanoparticles using *Trifolium pratense* flower extract. SJBS. 2016 Jul;23(4):517-523.
54. Rafiee B, Ghani S, Sadeghi D, Ahsani M. Green synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Eucalyptus mellidora* Leaf Extract and Evaluation of its Antimicrobial Effects. JBUMS. 2018 Oct;20(10):28-35. [In Persian].
55. Faisal S, Jan H, Shah SA, Shah S, Khan A, Akbar MT, Rizwan M, Jan F, Wajidullah Akhtar N, Khattak A. Green synthesis of zinc oxide (ZnO) nanoparticles using aqueous fruit extracts of *Myristica fragrans*: their characterizations and biological and environmental applications. ACS omega. 2021 Mar;6(14):9709-9722.
56. Zeinivand M, Aghaei SS, Zargar M, Ghasemzadeh MA. Synthesis of Gold Nanoparticles Using Exopolysaccharide from *Lactobacillus Paracasei* and Evaluation of their Antibacterial, Anti-biofilm, and Antioxidant Properties. BJM. 2022 Jun;11(42):67-83. [In Persian].