

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

Hilda Parastar<sup>1</sup>, Mohammad Reza Farahpour<sup>2\*</sup>, Rasoul Shokri<sup>1</sup>, Saeed Jafarirad<sup>3</sup>, Mohsen Kalantari<sup>1</sup>

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 exacellular 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 نانو کامپوزیت‌های بوهمیت - طلا - کیتوزان

## بر باکتری‌های ایجاد‌کننده زخم‌های عفونی در پوست

هیلدا پرستار<sup>۱</sup>، محمدرضا فرهیور<sup>۲\*</sup>، رسول شکری<sup>۱</sup>، سعید جعفری راد<sup>۳</sup>، محسن کلانتری<sup>۱</sup>

۱. مرکز تحقیقات زیست شناسی 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 کشنندگی و سنجش زمان مرگ باکتری‌ها با روش کلاسیک تهیه رقت‌های متوالی کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاهی تعیین و گزارش گردید.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج به دست آمده، حداقل غلظت‌های بازدارندگی و کشنندگی برای گروه بوهمیت به ترتیب ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. بر اساس نتایج، حداقل غلظت‌های بازدارندگی و کشنندگی برای گروه‌های بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوزان علیه باکتری اسینتوباکتر بومانی و به ترتیب ۰/۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری اشربیشیا کلی به ترتیب ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. بیشترین فعالیت ضد باکتریایی نانو کامپوزیت بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوزان برای دوره ۵ 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 کننده‌ی زخم هستند.

**واژگان کلیدی:** نانو کامپوزیت، کیتوزان، بوهمیت، طلا، اسینتوباکتر بومانی، اشربیشیا 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 ۱-۱۰۰ 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 بیماری زا 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 هر کدام از نانو ذرات طلا و بوهمیت علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی به صورت جداگانه و در تحقیقات موردن 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 (۷،۸). فعالیت آنتی باکتریایی بوهمیت مربوط به اثرات آن در نفوذ به سلول باکتری، تولید گونه‌های فعل اکسیژن و آزاد سازی یون آلومنیوم 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 (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 ۱۹۰۰۰ تا ۳۱۰۰۰ 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 عصاره گیاه، گیاه نعناع فلفلی از مناطق اطراف شهر تبریز جمع آوری و جهت شناسایی و تعیین گونه به دانشکده علوم پایه دانشگاه ارومیه تحويل داده شد. برای استخراج متabolیت‌های مهم گیاه، از روش ماسرسایون 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 میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر 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 قبل توجهی بر استخراج ترکیبات زیست فعل از گیاه دارد. سپس با استفاده از تکنیک ریزموج مخلوط مرحله قبل به مدت ۵ دقیقه تحت دستگاه ریزموج آزمایشگاهی باقدرت ۳۲۰ وات قرار گرفت. به منظور جداسازی بقایای گیاه از عصاره، مخلوط مذکور توسط گاز استریل ۴ لایه و قیف صاف گردید. نمونه پس از سانتریفیوژ توسط فیلتر میکروبی ۰/۴۵ میکرونی استریل شد و در ظروف استریل درسته 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/شیریشیا کلی (ATCC 13706) و /سینتوباكتریومانی (PTCC 1855) استفاده شد. سویه‌های مورد مطالعه از مرکز کلکسیون باکتری ایران وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تحت ناظر وزارت علوم تهیه گردید، جدول (۱). از کشت ۲۴ ساعته، سوسپانسیون نیم مک فارلن 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).

با عث 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 غشاء 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 زیست ماده رایج در طبیعت، دارای ویژگی‌های آنتی اکسیدانی، کاهش دهنده کلسترول، غیر سمتی بودن، ضد سرطان، چسبندگی زیستی، زیست تخریب پذیری، ضد میکروبی، سازگاری زیستی بالا، منعقد کننده خون و کاهش دهنده درد است (۱۱، ۱۲). از جمله مواردی که نیاز به مراقبت با آنتی بیوتیک‌ها دارد، زخم‌های عفونی است که باکتری‌های اسینتوباكتریومانی (*Acinetobacter baumannii*) و اشیریشیا کلی (*Escherichia coli*) می‌تواند آلوده شود (۴). باکتری اسینتوباكتریومانی، از جمله باسیل و کوکوبسیل‌های گرم منفی و هوایی مطلق از جنس اسینتوباكتری‌ها 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. اسینتوباكتریومانی مقاومت قابل توجهی نسبت به گروه‌های آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان داده است. سویه‌های مقاوم به چند دارو و سویه‌هایی که تولید کننده 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 اشیریشیا کلی، باسیل‌های گرم منفی بی‌هوایی اختیاری از خانواده انتروباكتریا سه‌ها است (۱۵، ۱۶). بر اساس تحقیقات انجام یافته، گزارشات مبنی بر عفونت‌های گزارش شده از بیماران بستری شده در بیمارستان‌ها به دنبال شیوع عفونت‌های اشیریشیا کلی افزایش یافته است. این باکتری نیز مقاومت‌های متعددی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بر علیه شان 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 ایجاد کننده عفونت در زخم‌های پوستی استمداد و روش‌ها جهت حصول اطمینان از نتایج، تمام مواد شیمیایی به کاربرده شده در این مطالعه دارای گرید تحلیلی بودند و از آب

جدول ۱. انواع میکروارگانیسم‌ها و آنتیبیوتیک استاندارد انتخابی

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

## 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 میلی لیتر عصاره گیاهی تهیه شده مخلوط شد. بر اساس مطالعات قبلی مخلوط در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت روی همزن حرارتی بهشتد به هم زده شد (۲۱). سپس، با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV-VIS در محدوده طول موج ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر و با استفاده از تابش‌های ریزموچ 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 نانوذرات اطمینان حاصل گردد. برای جداسازی محصول خام، پس از سانتریفیوژ، رسوب به دست آمده با آب مقطر و الكل اتیلیک شسته شد تا یون‌های باقی‌مانده و سایر ناخالصی‌های موجود در محصول به دست آمده، حذف شود. بهاین ترتیب، فاز جامد آمده، جدا و شسته شد و در آون در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت خشک گردید. مشخصه یابی نانوکامپوزیت 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. بهاین ترتیب که ابتدا یک گرم از پودر نانو کامپوزیت بوهمیت/طلا به تدریج به ۱/۵ میلی لیتر محلول کیتوزان پرتوانه شده (استیک اسید ۱% w/w) ۲ میلی لیتر اسید غلیظ در ۱۹۸ میلی لیتر آب دیونیزه) در دمای اتاق اضافه شد و مخلوط به دست آمده توسط همزن به مدت ۱۴ ساعت هم زده شد. به منظور جداسازی مشتق

به منظور تهیه سویه‌های باکتریایی، ابتدا بخش خارجی ویال سوش‌های لیوفیلیزه باکتری‌های تهیه شده به طور کامل با پنبه الكل، ضدغ Fonu شده و سپس بخش میانی پنبه‌ی داخل ویال در داخل هود با تیغ برش داده شد. سپس میزان نیم میلی لیتر 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 سوسپانسیونی به کدورت نیم مک فارلن دهی 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 (۱۹۰-۳۱۰ هزار دالتون) خریداری شده از شرکت سیگما استفاده گردید. ابتدا یک گرم از کیتوزان خریداری شده در ۲۰۰ میلی لیتر از محلول اسید استیک w/w ۱٪ حل گردیده، PH محلول روی ۵ تنظیم شد، سپس محلول حاصل مدت یک ساعت به شیکر منتقل شد تا محتويات محلول مخلوط موردنظر به خوبی مخلوط گردد. سپس کیتوزان حل شده در محلول اسید استیک از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۳ صاف گردید تا از هر گونه ناخالصی عاری گردد (۲۴).

چهارم منتقل و این عمل تا چاهک دهم تکرار شد و درنهایت از چاهک دهم ۱۰۰ میکرو لیتر برداشته و از پروسه خارج شد. با این روش رقت‌های سریالی از نانو ذرات بوهمیت، بوهمیت/طلا و نانو کامپوزیت بوهمیت/طلا/کیتوزان تهیه گردید. چاهک یازدهم به عنوان 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 فارلنده تهیه شده بود، به همه‌ی چاهک‌های مربوط بهردیف نانوذره به جز 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 به صورت چشمی مشاهده گردید. چاهک‌هایی با حداقل کدورت به عنوان 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 کشنندگی نانو ذرات موردنظر بر روی باکتری‌ها و قارچ تمام چاهک‌ها از چاهک اول تا چاهک یازدهم موردببرسی قرار گرفت. بدین منظور مقدار ۵۰ میکرو لیتر از هر رقت محلول موردنظر در پلیت‌های حاوی محیط کشت موردنظر، به وسیله‌ی 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) موردببرسی قرار گرفتند و آخرین رقتی که در کشت از آن هیچ‌گونه رشد باکتری دیده نشده بود به عنوان رقت MBC ثبت و گزارش شد (۳۵). در مورد آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده نیز جهت تعیین MIC و MBC از روش موردنظر استفاده در مورد نانوذره و نانوکامپوزیت‌ها استفاده گردید. در این مطالعه برای باکتری‌های اشریشیا کلی و اسینوباکتر بومانی به ترتیب آنتی بیوتیک‌های کاناماکسین و ایمی‌پنم در نظر گرفته شدند. (۲۶، ۲۵).

### روش اندازه گیری زمان مرگ (Time-kill) و سنجش تعداد میکروارگانیسم‌ها در روش اندازه گیری 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/طلا و یوهیت/طلا کیتوزان استفاده شد. به این ترتیب که هر سویه با غلظت‌های متفاوتی مواجه گردید (۱ MIC و ۲ MIC). به منظور بررسی مدت زمان اثر نانوذره و نانو کامپوزیت‌ها روی سلول‌های زنده باکتری و مدت زمان مرگ، باکتری‌ها پس از کشت در محیط کشت اختصاصی به انکوباتور منتقل گردید و

خام نانو کامپوزیت بوهمیت/طلا/کیتوزان پس از سانتریفیوژ، رسوب به دست آمده با آب مقطر شسته شد. این کار برای حذف مازاد کیتوزان در محصول نهایی انجام شد و در انتهای محصول به دست آمده 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 فارلنده

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 ساعته‌ی 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 فارلنده و معادل  $1/5 \times 10^8$  باکتری در هر میلی لیتر باشد (۱۸).

### حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشنندگی (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 (Standards) استفاده شد. میزان غلظت نانوذره و نانو کامپوزیت‌ها در محدوده ۲/۵ تا ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید. برای تعیین حداقل غلظت مهاری نانو ذرات مورد آزمایش (بوهمیت، بوهمیت/طلا، بوهمیت/طلا/کیتوزان) از روش میکرودایلوشن استفاده گردید. برای این منظور از میکروپلیت ته گرد ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. آنتی بیوتیک‌های استاندارد بر مبنای راهنمای CLSI برای هر باکتری انتخاب گردید (۳۷). در مورد هر نانوذره به روش یکسانی عمل شد. به طور خلاصه، در ابتدا به غیراز چاهک اول (کنترل منفی) هر ردیف، به هر چاهک موجود در هر ردیف به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط کشت مولر هینتون براث اضافه گردید. سپس به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از نانوذره موردنظر به چاهک اول و دوم اضافه شد. به این ترتیب در چاهک اول غلظت نانوذره خالص بود. پس از آنکه چاهک دوم به خوبی هم زده شد، ۱۰۰ میکرو لیتر از آن برداشته و به چاهک سوم سوم انتقال داده شد. به همین ترتیب به صورت متوالی از چاهک سوم به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر به چاهک

## یافته‌ها

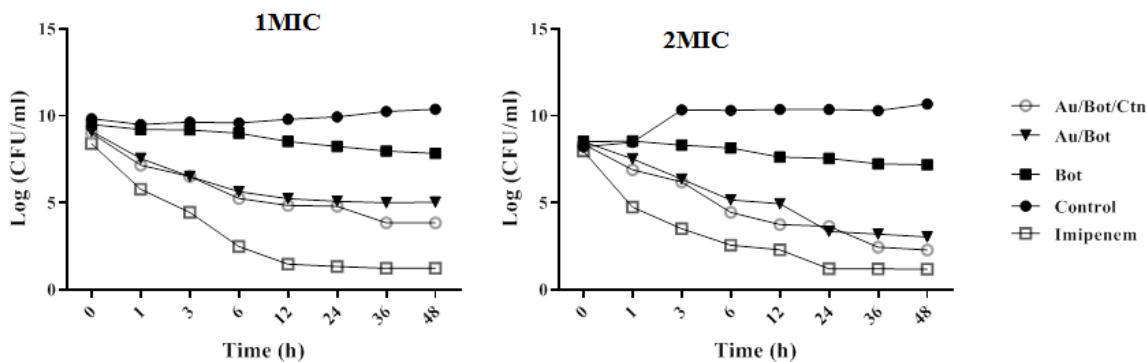
### فعالیت ضد باکتری در شرایط آزمایشگاهی

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  $20 \mu\text{g/mL}$  و برای مقایسه با دیگر گروه‌ها، بیشترین غلظتها برای نشان دادن فعالیت‌های ضد باکتریایی بود. در حالی که برای گروه‌های بوهمیت/طلاء و بوهمیت/طلاء-کیتوزان برای باکتری اسینتو باکتر بومانی مقادیر MIC و MBC به ترتیب  $2/50 \mu\text{g/mL}$  و  $5 \mu\text{g/mL}$  و برای باکتری اشريشيا کلی به ترتیب  $5 \mu\text{g/mL}$  و  $10 \mu\text{g/mL}$  بود. تفاوت معنی‌داری میان فعالیت‌های ضد باکتریایی نانو کامپوزیت‌های بوهمیت-طلاء و بوهمیت-طلاء-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 ایمی پنم در مقابل باکتری‌های اسینتو باکتر بومانی و اشريشيا کلی به ترتیب غلظت  $1/25 \mu\text{g/mL}$  و  $2/50 \mu\text{g/mL}$  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).

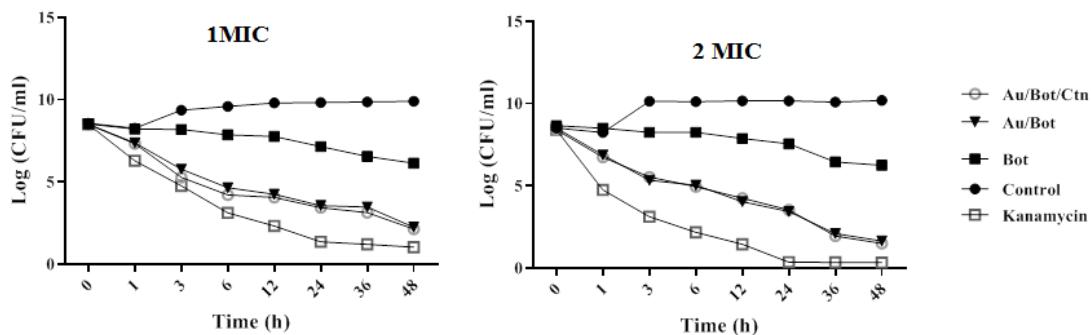
کلونی‌ها در زمان‌های مختلف (صفر، ۱، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۳۶) مورد بررسی قرار گرفت. کلونی‌های شکل گرفته برای هر زمان و هر باکتری و هر نانوذره و نانو کامپوزیت شمارش و بر اساس CFU/ml گزارش گردید (۲۷). داده‌ها با استفاده از آزمون آماری رگرسیون تجزیه و تحلیل شدند. همچنین در تطبیق داده‌های آزمایش با مدل کینتیک مرگ، 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 هریک از آزمایشات در هر گروه، 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, Bot/Ctn, Au/Bot و Au/Bot.Ctn بر روی میکروگانیسم‌ها و مقایسه آنها با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد (واحدها بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد)

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	۲۵/۱۱ اشريشيا
۵	۱/۵	۵	۱/۵	۲	۲۰	۱۰	۲/۵	۲۵	۱/۱	---	---	---	---	---	---	کلی
۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	اسينتوپا
																کتر
																بومانی



شکل ۱. منحنی مرگ باکتری برای باکتری/اسینتوپاکتر بومانی



شکل ۲. منحنی مرگ باکتری برای باکتری اشريشيا کلائي

بهتری در مقایسه با نانو کامپوزیت‌های مورد مطالعه از خود نشان داده‌اند.

## بحث

نانو کامپوزیت بوهمیت-طلا-کیتوzan دارای اثرات ضد باکتریایی است. بر اساس نتایج حاصل از MIC و MBC در ارتباط با دو گروه بوهمیت-طلا و بوهمیت-طلا-کیتوzan این نانو کامپوزیت‌ها دارای اثرات ضد باکتریایی مطلوبی علیه باکتری‌های اسینتوپاکتر بومانی و اشريشيا کلائي هستند. بوهمیت در مقایسه با دیگر نانو کامپوزیت‌ها، فعالیت آنتی‌باکتریایی ضعیفی از خود نشان داد، با این حال در مقایسه با گروه کنترل، دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی مناسبی بود. قرارگیری طلا در کنار بوهمیت باعث افزایش فعالیت آنتی‌باکتریایی آن شد. این نتایج همسو با نتایج گزارش شده توسط مطالعات قبلی است

## نتایج زمان مرگ باکتری

نتایج مربوط به منحنی time-kill برای نانو کامپوزیت‌های مورد مطالعه در مقابل باکتری‌های اسینتوپاکتر بومانی و اشريشيا کلائي در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین فعالیت ضد باکتریایی نانو کامپوزیت‌ها از ساعت ۶ تا ۲۴ مشاهده شده و تعداد باکتری‌ها در هر دو گروه بوهمیت/طلا و بوهمیت/طلا/کیتوzan پس از ۲۴ ساعت کاهش می‌یابد. بر اساس نتایج در ارتباط با گروه بوهمیت، در مقایسه با گروه‌های بوهمیت/طلا و بوهمیت/طلا/کیتوzan، تعداد باکتری‌ها به طور چشمگیری بالاتر بوده و دارای فعالیت ضد باکتریایی کمتری می‌باشد. با وجود اینکه گروه‌های بوهمیت/طلا و بوهمیت/طلا/کیتوzan دارای فعالیت‌های ضد باکتریایی می‌باشند اما آنتی‌بیوتیک‌های فعالیت ضد باکتریایی

بوده است و کیتوزان از طریق بر هم زدن یکپارچگی غشای سلولی و انتشار اسیدونوکلئیک باعث از بین رفتن باکتری‌ها شده است؛ به طور 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- $\gamma$ -Au در AIOOH/Ctn که مشتمل از بوهیمت، طلا و کیتوزان می‌باشد موردنرسی قرار گرفت و بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش MBC و MIC باکتری اشرشیا کلی (به ترتیب  $5\text{ }\mu\text{g/mL}$  و  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) نانو کامپوزیت بیوسنتر شده دارای اثرات ضد باکتریایی متوسطی می‌باشد که با نتایج اعلام شده در مطالعه انجام گرفته توسط Divya و همکاران هم جهت می‌باشد.

در مطالعه دیگری که بر روی ارزیابی اثرات کیتوزان محلول بر روی سویه‌های باکتریایی انجام گرفته بود. شش غلظت مختلف کیتوزان در اسید استیک یک درصد حل گردیده و دو روش کربی بائز و زنده ماندن سلول باکتری مورداستفاده قرار گرفت. در این مطالعه باکتری اشرشیا کلی در مقابل گروه اول و دوم کیتوزان سنتز شده حساسیت قابل توجهی نشان داده است ( $MIC: 21 \pm 7,5\text{ mm}$ ). 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- $\gamma$ -Au برای باکتری اشرشیا کلی (به ترتیب  $5\text{ }\mu\text{g/mL}$  و  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) می‌باشد این موضوع نشان می‌دهد که حضور یا عدم حضور کیتوزان در نانو کامپوزیت بیوسنتر شده تفاوت معنی‌داری ایجاد نمی‌کند. در مطالعه‌ای که بر روی فعالیت ضد باکتریایی نانو ذرات بوهیمت (AIOOH) سنتز شده در مقابل باکتری اشرشیا کلی انجام گرفت، این باکتری در مقابل نانوذره بوهیمت حساسیتی با میانگین قطر هاله عدم رشد:  $11/66$  نشان داد که عملکرد نسیتا ضعیف به شمار می‌آید (۶).

نتایج حاصل از MIC و MBC باکتری اشرشیا کلی در مقابل نانوذره بوهیمت در تحقیق حاضر به ترتیب  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$  و  $20\text{ }\mu\text{g/mL}$  می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی عملکرد نسبتاً ضعیف این نانو ذرات بهنهایی در مقابل این باکتری می‌باشد. نتایج MIC و MBC باکتری اشرشیا کلی در مقابل نانو کامپوزیت Au/ $\gamma$ -AIOOH و AIOOH/Ctn که مشتمل از بوهیمت، طلا و کیتوزان می‌باشد می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی اثر هم‌افزایی بوهیمت 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 به دست آمده، اتیل استات موجود در عصاره‌ی نعناع فلفلی دارای اثرات بازدارنده‌ی

(۲۷،۲۸). بر اساس نتایج بوهیمت-طلا دارای قوی‌ترین فعالیت ضد باکتریایی بوده و پوشش کیتوزان خواص ضد باکتریایی آن را بهبود نبخشیده است از این رو تفاوت قابل توجهی میان فعالیت‌های ضد باکتریایی بوهیمت-طلا و بوهیمت-کیتوزان دیده نشد. بوهیمت 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 بوهیمت 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 بوهیمت 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 می-گیرد نشان می‌دهند. باز 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. بوهیمت 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 بازدارنده‌ی (MIC) موردنرسی قرار گرفت در این بررسی انجام گرفته کیتوزان دارای اثر آنتی‌بیوتیکی بالا بر روی اشرشیا کلی (۸۵ درصد در غلظت  $40\text{ }\mu\text{l/l}$  لیتر)

دادند. اگرچه مطالعه حاضر بیان کننده اثرات ضد میکروبی نانو کامپوزیت‌های بوهمیت/طلاء و بوهمیت/طلاء/کیتوزان است با این حال نمی‌توان با قاطعیت در رابطه با نتایج کاربردی صحبت نمود. از این‌رو لازم است تا مطالعات گسترده‌تر 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.

رشد قوی بر روی پاتوژن‌های مورد بررسی در این مطالعه بوده و به دنبال آن کلروفرم، اتانول و متانول دارای اثرگذاری می‌باشدند (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 Shalayel و همکاران را تائید می‌نماید.

## نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی، نانو ذرات بوهمیت و نانو کامپوزیت‌های بوهمیت/طلاء و بوهمیت/طلاء/کیتوزان با استفاده از عصاره گیاه نعناع فلفلی به روش سنتز فیتوکمیکال 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

## سپاسگزاری

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

## تعارض منافع

نویسنده‌گان هیچگونه تعارض منافعی ندارند.

## 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  $\gamma$ -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, Ganeshan AR, Muralisankar T, Jayakumar R, Sathishkumar P, Uthayakumar V, Chandrasekar 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. Daghian 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 TiO<sub>2</sub> 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, Sintean 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 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 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, Andremont 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, Bobenik 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.