نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هفدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۰،
پیاپی ۴۳ : ۱۴۳-۱۲۷

مقاله پژوهشی

اثر ضد باکتریایی نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان بر روی برخی از باکتری‌ها و قارچ‌های ایجادکننده عفونت در زخم های پوستی

نازیلا فرهنگی قلعه جوقی[۱]، محمد رضا فرهپور[۲*]، مجتبی محمدی[۳]، سعید جعفری راد[۴،۵]، ساناز مهمازی[۶]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

۴- دانشیار، دانشگاه تبریز، مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی، تبریز، ایران

۵ - دانشیار، دانشگاه تبریز، دانشکده شیمی، گروه شیمی آلی و بیوشیمی.

۶ - استادیار، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۳

چکیده

افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از جمله گونه های مقاوم *اشریشیا کلی*، *استنتوباکتر بومانی* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* در زخم‌ها، تلاش‌ها را در جهت سنتز ترکیبات ضد باکتریایی نانو ساختار برای غلبه بر میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک افزایش داده است. این مطالعه باهدف بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی نانوذره لاتریت و نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان از طریق بررسی حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظت کشندگی و سنجش زمان مرگ باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *پروتئوس میرابیلیس*، *استنتوباکتر بومانی* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* انجام شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان در غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی *اشریشیا کلی* و *پروتئوس میرابیلیس* و در غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی *استنتوباکتر بومانی* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* دارای اثرات مهارکنندگی بودند. اختلاف معنی‌داری بین تأثیر ضد باکتریایی نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان مشاهده نگردید ($p=1.00$). همچنین نانوذره لاتریت در مقایسه با نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان اثر ضد باکتری ضعیفتری نشان داد. هیچ‌کدام از ترکیبات استفاده شده در این مطالعه اثر ضد قارچی از خود نشان ندادند. بیشترین فعالیت ضد باکتریایی نانو کامپوزیت‌ها در فواصل بین ۶ تا ۲۴ ساعت مشاهده شد. درمجموع، نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی روی برخی از باکتری‌های ایجادکننده عفونت در زخم های پوستی بودند.

کلمات کلیدی: باکتری‌های بیماری‌زا، حداقل غلظت بازدارندگی، فعالیت ضد باکتریایی، نانو کامپوزیت

*نویسنده مسئول: محمد رضا فرهپور

آدرس: دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

پست الکترونیک: mrf78s@gmail.com

مقدمه

عفونت‌های ناشی از عوامل میکروبی، دومین عامل مهم مرگ‌ومیر انسان‌ها در سراسر جهان است و میکروارگانیسم‌های مقاوم، یک تهدید روزافزون برای سلامت عمومی هستند (۵, ۱۵). شمار سالانه مرگ‌ومیر ناشی از پاتوژن های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به بیش از ۷۰۰ هزار نفر در سال می‌رسد که در این میان مرگ در حدود ۲۳۰ هزار نفر به دلیل مشکلات مربوط به مقاومت‌های چند دارویی (Multiple drug resistance) است و پیش‌بینی‌شده است که بیماری‌های ناشی از مقاومت‌های دارویی عامل مرگ سالیانه ۱۰ میلیون نفر تا سال ۲۰۵۰ باشد (۵). بررسی‌ها نشان داده است که شایع‌ترین باکتری‌های قابل‌شناسایی در زخم‌های عفونی شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *سودوموناس آئروجینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*)، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، استرپتوکوکوس پیوژنز (*Streptococcus pyogenes*)، گونه‌های اسینتوباکتر مانند *اسینتوباکتر بومانی* (*Acinetobacter baumannii*)، گونه‌های کلبسیلا مانند *کلبسیلا پنومونی* (*Klebsiella pneumonia*)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* (*Staphylococcus epidermidis*)، گونه‌های انتروباکتر، گونه‌های انتروکوکوس و گونه‌های پروتئوس مانند *پروتئوس میرابیلیس* (*Proteus mirabilis*) هستند (۳۲). این باکتری‌های خطرات زیادی برای انسان و حیوانات می‌توانند داشته باشند و بنابراین نیاز است که از داروهای کارا و مؤثر علیه آن‌ها استفاده شود. عدم استفاده از داروهای مؤثر باعث افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شود. برای مثال، طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) حدود ۸۰ درصد از مردم جهان به‌ویژه در کشورهای درحال‌توسعه برای مشکلات معمول خود، از داروهای سنتی استفاده می‌کنند (۲). بنابراین تولید داروهای جدید و راهبردهای نوین برای مبارزه با مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌شدت موردنیاز است (۱۶, ۲۱, ۳۱). سازمان بهداشت جهانی نیز بر کشف داروهای ضد میکروبی جدید علیه عوامل بیماری‌زای مقاوم تأکید دارد (۳۴).

کانی‌ها از دیرباز تاکنون برای درمان عفونت‌ها مورداستفاده قرارگرفته‌اند و به‌عنوان ترکیبات رایج در این زمینه شناخته‌شده‌اند. لاتریت نوعی خاک هوازده است و دارای خواص رسانایی هیدرولیکی زیادی است (۱۹). خصوصیات این نوع خاک به ساختار کانی‌شناسی و توزیع اندازه ذرات خاک بستگی دارد (۲۶). لاتریت حاوی مقادیر زیادی یون آهن است که عامل فعالیت ضد باکتریایی آن است (۳۷). برخی مواد معدنی مانند لاتریت، همانند نقره، مس، کبالت و روی دارای فعالیت آنتی باکتریایی هستند (۳, ۳۰).

به دلیل افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های مقاوم به داروها، تلاش‌ها در جهت به‌کارگیری نانوتکنولوژی در سنتز ترکیبات ضد باکتریایی بسیار موردتوجه قرارگرفته است. یکی از نانو ذرات پرکاربرد و شناخته‌شده به‌عنوان ساختار آنتی‌باکتریال، نانو ذرات نقره می‌باشند. مطالعات به تأثیر نانو ذرات به‌ویژه نانو ذرات نقره بر مهار رشد عوامل بیماری‌زا و نیز تسریع در التیام زخم اشاره‌کرده‌اند (۲۵). نانو ذرات نقره از طریق مهار فعالیت رونویسی باکتری‌ها، دناتوره کردن دئوکسی ریبونوکلئیک‌اسید باکتریایی و القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده در باکتری‌ها، فعالیت آنتی باکتریایی خود را نشان می‌دهند (۸).

جهت بهبود خواص ضد باکتریایی نانو کامپوزیت نقره/لاتریت در مطالعه حاضر، این نانو کامپوزیت با پلیمرهای طبیعی کیتوزان پوشش داده شد. کیتوزان یک

پلیمر زیستی است که با سطوح فلزی برهم‌کنش دارد و نانو ذرات را تثبیت می‌کند (۱۲). برهم‌کنش بین گروه‌های آمین کیتوزان و یون‌های فلزی می‌تواند کمپلکس فلز/بیوپلیمر را ایجاد کند (۶) که خواص ضد باکتریایی را افزایش می‌دهد (۱). لاتریت، نقره و کیتوزان ترکیبات آنتی باکتریایی هستند که می‌توانند اثرات هم‌افزایی باهم داشته باشند، بااین‌حال نیاز است که این ترکیبات در کنار هم قرار گیرند و سنتز شوند. سنتز سبز، یکی از بهترین راهکارها برای قرارگیری این اجزاء کنار هم است.

از سوی دیگر به نظر می‌رسد که سنتز سبز نانو ذرات با استفاده از عصاره گیاهان می‌تواند به افزایش اثر ضد باکتریایی آن‌ها کمک کند. به‌علاوه ترکیب عصاره گیاهی با نانو ذرات می‌تواند سمیت سلولی نانوذره را کم کرده یا به‌طور کامل از بین ببرد. روش‌های سنتز سبز (Green synthesis) بیولوژیکی با استفاده از عصاره‌های گیاهی ایمن‌تر، سازگار با محیط زیست و کم‌هزینه‌تر هستند و تأثیر آن‌ها در داشتن خواص ذاتی ضد میکروبی به اثبات رسیده است (۱۳). در این مطالعه برای سنتز سبز، از گیاه استبرق استفاده شد. گیاه استبرق (*Calotropis procera*) متعلق به خانواده Asclepiadaecae است و عمدتاً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری یافت می‌شود. گیاه استبرق معمولاً برای درمان زخم‌ها، زخم‌های عفونی، خارش پوست و بیماری‌ها استفاده می‌گردد و دارای خواص ضد میکروبی است (۲۲). ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی غالب‌ترین ترکیبات موجود در عصاره گیاه استبرق هستند (۳۶). از ترکیبات گیاهی شیمیایی استبرق می‌توان برای بیوسنتز خارج سلولی نانو کامپوزیت نقره/لاتریت استفاده کرد.

طبق جست‌وجوی انجام‌شده، تا کنون هیچ مطالعه‌ای اثرات ضد باکتریایی نانوذره لاتریت و نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان را بررسی نکرده است. برای اولین بار، پژوهش حاضر به معرفی و توسعه یک راهکار نوین جهت بیوسنتز نانو کامپوزیت لاتریت/نقره/کیتوزان با استفاده از عصاره گیاه استبرق و همچنین بررسی فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی نانوذره لاتریت و نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان سنتز شده می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

جهت اطمینان از نتایج، تمام مواد شیمیایی به‌کاربرده شده در این مطالعه دارای گرید تحلیلی بودند و از آب دیونیزه برای تهیه همه محلول‌ها استفاده شد. کیتوزان با وزن ۱۹۰۰۰۰ تا ۳۱۰۰۰۰ دالتون از شرکت سیگما و گرید دارویی پودر لاتریت از شرکت پارسکائولین تهران تهیه شد. نمک نیترات نقره از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد.

تهیه عصاره گیاهی

برای تهیه عصاره‌ی گیاه، گیاه استبرق از بندر جاسک در استان هرمزگان تهیه و جهت شناسایی و تعیین گونه به دانشکده علوم پایه دانشگاه ارومیه تحویل داده شد. برای استخراج متابولیت های مهم گیاه، از روش ماسراسیون استفاده گردید به‌طوری‌که 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 ۱۲۰وات قرار گرفت. این

روش اثر قابل‌توجهی بر استخراج ترکیبات زیست فعال 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. به‌منظور 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 دربسته‌ی مات قرار گرفت و برای مطالعات و مراحل بعدی در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۷, ۱۴).

بیوسنتز خارج سلولی نانو کامپوزیت نقره/لاتریت

برای سنتز نانو کامپوزیت نقره/لاتریت یک گرم نقره نیترات (تهیه‌شده از شرکت Merck) با ۰/۸ گرم لاتریت آسیاب شده و ۹۰ میلی‌لیتر عصاره گیاهی تهیه شده مخلوط شد. بر اساس مطالعات قبلی مخلوط در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت روی همزن حرارتی به‌شدت به هم زده شد (۱۸). سپس، با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV-VIS در محدوده طول‌موج ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر و با استفاده از تابش‌های ریزموج و گرمادهی کاهش یون نقره 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 سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت خشک گردید. مشخصه یابی نانوکامپوزیت سنتز شده از طریق روشهای معمول مورد ارزیابی و تایید قرار گرفت (۱۸).

تهیه مشتقات کیتوزان (نانو کامپوزیت نقره/لاتریت/کیتوزان)

جهت عامل دار کردن نانو کامپوزیت نقره/لاتریت با کیتوزان از روش اصلاح فیزیکی (Physical modification) استفاده شد. به‌این‌ترتیب که ابتدا یک گرم از پودر نانو کامپوزیت نقره/لاتریت به‌تدریج به ۱۵ میلی‌لیتر محلول کیتوزان پروتونه شده (استیک اسید ۱٪w/w، ۲ 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 خام نانو کامپوزیت نقره/لاتریت/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 سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه خشک شد مشخصه یابی مشتق کیتوزان دار نانوکامپوزیت سنتز شده از طریق روشهای معمول مورد ارزیابی قرار گرفت و مورد تایید قرار گرفت (۱۸).

بررسی فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی در شرایط برون تنی

در این تحقیق پنج سویه‌ی استاندارد *اشریشیا کلی* (ATCC 25922)، *استرپتوکوکوس پیوژنز* (ATCC 19615)، *اسینتوباکتر بومانی* (ATCC 17978)، *پروتئوس میرابیلیس* (ATCC 12453) و *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC 10231) از مرکز کلکسیون باکتری و قارچ‌های ایران وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران زیر نظر وزارت علوم تهیه گردید (جدول ۱). از کشت ۲۴ ساعته، سوسپانسیون نیم مک فارلند از باکتری‌ها و قارچ جهت استفاده در مراحل بعدی تهیه

شـد. برای انجام هر آزمون جهت بررسـی اثرات ضـد باکتریایی و ضـد قارچی، کشـت تازه ۲۴ سـاعته تهیه گردید (۷, ۹, ۱۴).

جدول ۱: انواع میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ) و آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد انتخابی جهت کنترل مثبت برای هرکدام از آن‌ها بر مبنای CLSI.

باکتری	ATCC/PTCC	کنترل مثبت
اشریشیا کلی	ATCC 25922	**کانامایسین**
استرپتوکوکوس پیوژنز	ATCC 19615	**مروپنم**
استنوباکتر بومانی	ATCC 17978	**ایمی پنم**
پروتئوس میرابیلیس	ATCC 12453	**فلوروکوینولون**
کاندیدا آلبیکنس	ATCC 10231	**فلوکونازول**

تعیین حداقل غلظت مهارکننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (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 مهاری نانو ذرات مورد آزمایش (لاتریت، لاتریت/نقره، لاتریت/نقره/کیتوزان) از روش میکرودایلوشن استفاده گردید. برای این منظور از میکروپلیت ته گرد ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد بر مبنای راهنمای CLSI برای هر باکتری و قارچ انتخاب گردید. در مورد هر نانوذره به روش یکسانی عمل شد. به‌طور خلاصه، در ابتدا به‌غیراز 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. به‌این‌ترتیب در چاهک اول غلظت نانوذره خالص بود. پس‌ازآنکه 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 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

لاتریت، لاتریت/نقره و نانو کامپوزیت لاتریت/نقره/کیتوزان تهیه گردید. چاهک یازدهم به‌عنوان شاهد باکتری ها و قارچ 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 قارچ و 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 سانتی گراد در مورد باکتری ها و انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد در مورد قارچ 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 (۲۳). 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 پلیت های حاوی محیط کشت موردنظر، به‌وسیله‌ی اسپریدر استریل گسترش داده شد و به مدت ۲۴ ساعت به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد در مورد باکتری ها و انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد در مورد قارچ منتقل گردید و پس از گذشت ۲۴ ساعت پلیت ها ازنظر رشد باکتری در محیط کشت BHI (Brain heart infusion) و قارچ در محیط کشت سابرود دکستروز آگار موردبررسی قرار گرفتند و آخرین رقتی که در کشت از آن هیچ‌گونه رشد باکتری و قارچ دیده نشده بود به‌عنوان رقت MBC ثبت و گزارش شد (۱۴, ۱۷, ۳۹).

در مورد آنتی بیوتیک های مورد استفاده نیز جهت تعیین MIC و MBC از روش مورد استفاده در مورد نانوذره و نانوکامپوزیت‌ها استفاده گردید. دراین مطالعه برای باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *اسینوباکتر بومانی*، *پروتئوس میرابیلیس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بترتیب آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، مروپنم (شرکت داروسازی آفاشیمی)، ایمی‌پنم (شرکت داروسازی آفاشیمی)، فلوروکوینولون (شرکت داروسازی اکسیر) و فلوکونازول (شرکت داروسازی جالینوس) در نظر گرفته شدند.

روش اندازه گیری 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 لاتریت و نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان استفاده شد. به‌این‌ترتیب که هر سویه با غلظت‌های متفاوتی مواجه گردید (MIC 1 و MIC 2). به‌منظور بررسی مدت‌زمان اثر نانوذره و نانو کامپوزیت‌ها روی سلول‌های زنده باکتری و مدت‌زمان مرگ، باکتری ها و قارچ پس از کشت در محیط کشت اختصاصی به انکوباتور تحت شرایط ویژه هر میکروارگانیسم منتقل گردید و کلونی‌ها در زمان‌های مختلف (صفر، ۱، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸) موردبررسی قرار گرفت. کلنی‌های شکل‌گرفته برای هر زمان و هر باکتری و هر نانوذره و نانو کامپوزیت شمارش و بر اساس CFU/ml گزارش گردید (۲۸). داده‌ها با استفاده از آزمون آماری رگرسیون تجزیه‌وتحلیل 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 $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد (۳۳). برای هریک از آزمایشات در هر گروه، آزمایش ۵ بار تکرار شد. برای مقایسات بین گروهی ابتدا داده‌ها برای نرمال بودن مورد بررسی قرار گرفتند و چون داده‌ها نرمال نبودند، از آزمون کروسکال-والیس و من-ویتنی برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ بعنوان معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

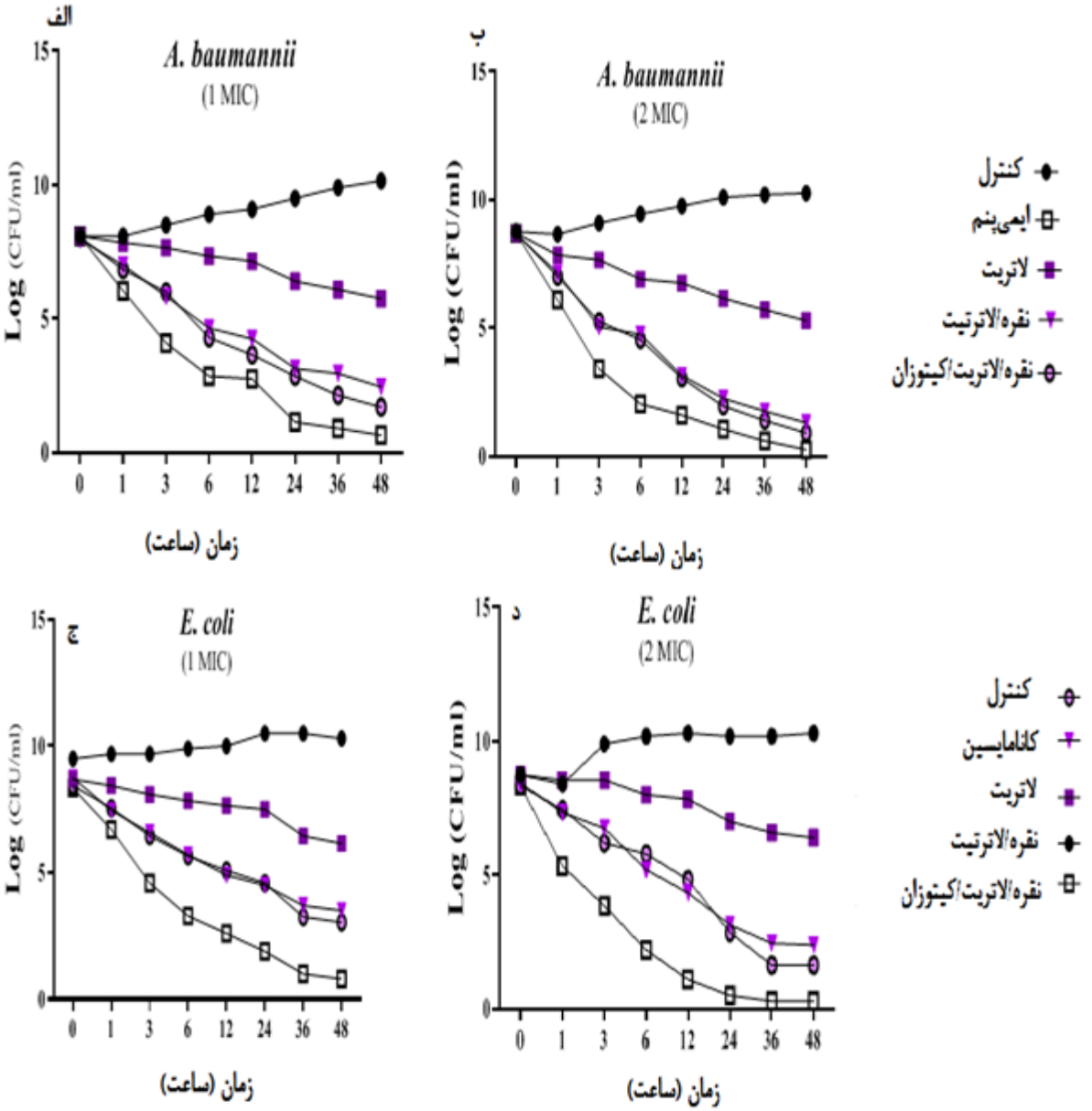
نتایج برای حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی در گروه لاتریت غلظت‌های µg/ml ۱۰ و غلظت‌های µg/ml۲۰ به ترتیب برای تمام باکتری‌ها بود. نتایج نشان داد که نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان در آزمایش MIC دارای فعالیت ضد باکتری قوی در مقایسه با لاتریت علیه *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *پروتئوس میرابیلیس*، *اسینتوباکتر بومانی* و *اشریشیای کلی* بودند. بااین‌حال هیچ‌یک از نانوذره و نانو کامپوزیت‌ها فعالیت ضد قارچی علیه *کاندیدا آلبیکنس* از خود نشان ندادند. از سوی دیگر، نتایج نشان داد که غلظت‌های µg/ml ۱/۲۵ و ۲/۵ µg/ml کانامایسین، مروپنم، فلوروکوینولون، ایمی پنم و فلوکونازول به ترتیب علیه باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *پروتئوس میرابیلیس*، *اسینتوباکتر بومانی* و *کاندیدا آلبیکنس* دارای فعالیت مهارکنندگی و کشندگی بودند. بنابراین نتایج آزمایش نشان داد که لاتریت دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی ضعیف‌تری است (p=0.001). نتایج حاصل نشان داد که آنتی‌بیوتیک‌ها فعالیت ضد باکتریایی بالاتری در مقایسه با نانو کامپوزیت‌ها نشان دادند، ولی نانو کامپوزیت‌ها به شکل وسیع الطیف عمل کردند و روی تمام باکتری‌ها تأثیر داشتند. در مورد *کاندیدا آلبیکنس* نیز تأثیر فلوکونازول در غلظت‌های ۱/۵ و ۲/۵ فعالیت ضد قارچی بالایی نشان داد، درحالی‌که نانو ذرات و نانو کامپوزیت‌ها تأثیر ضد قارچی از خود نشان ندادند (p=0.001). (جدول ۲).

جدول ۲ نتایج MIC و MBC نانوذره لاتریت و نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان و آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد بر روی میکروارگانیسم‌ها به روش کلاسیک تهیه رقت‌های متوالی کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاهی و مقایسه آن‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد (واحدها بر اساس میکروگرم بر میلی‌لیتر است).

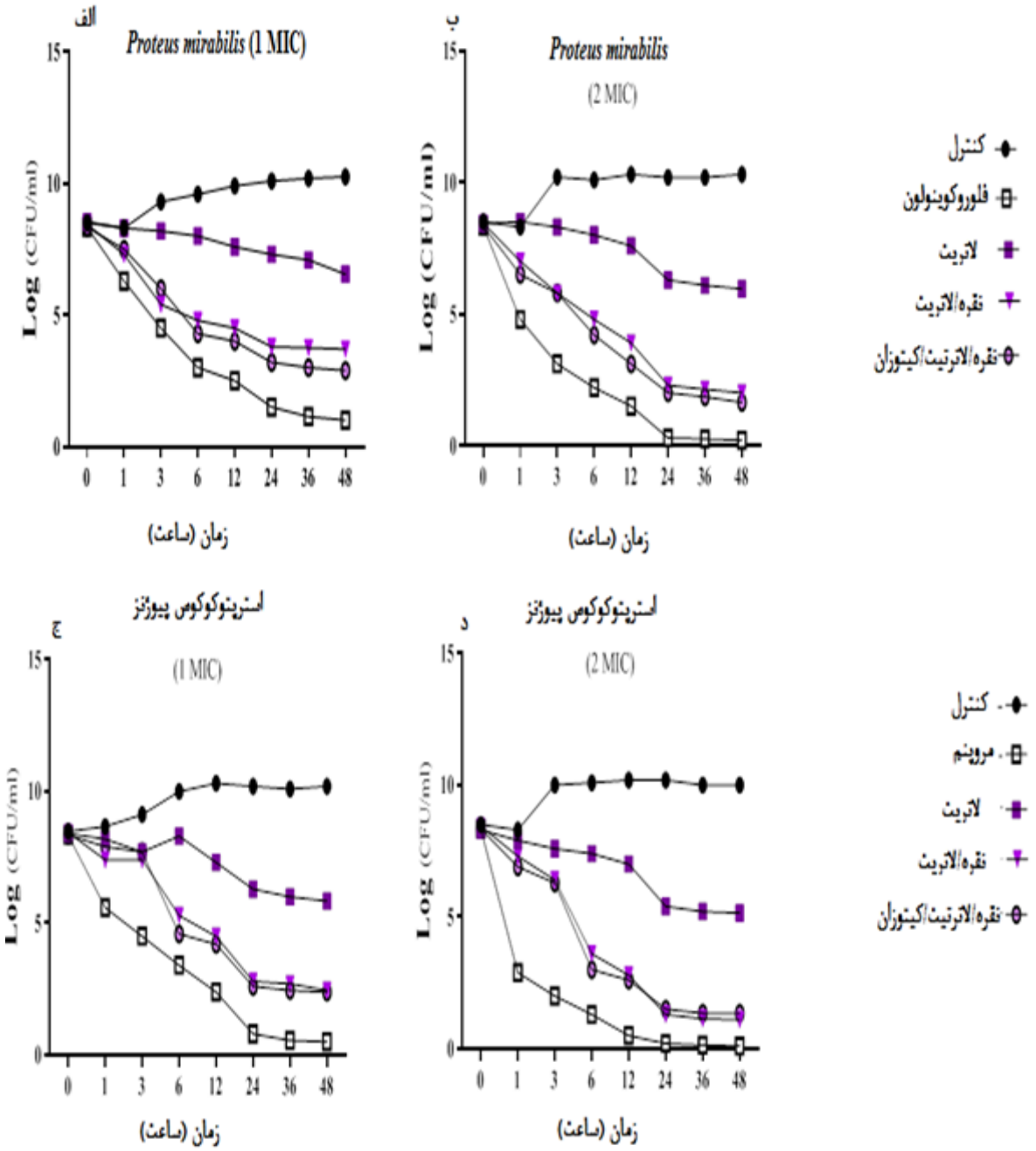
	کاناماسین		مروپنم		فلوروکوینولون		ایمی‌پنم		فلوکونازول		لاتریت		نقره/لاتریت		نقره/لاتریت/کیتوزان	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
اشریشیا کلی	۱/۲۵	۲/۵	---	---	---	---	---	---	---	---	۱۰	۲۰	۵	۱۰	۵	۱۰
استرپتوکوکوس پیوژنز	---	---	۱/۲۵	۲/۵	---	---	---	---	---	---	۱۰	۲۰	۲/۵	۵	۲/۵	۵
پروتئوس میرابیلیس	---	---	---	---	۱/۲۵	۲/۵	---	---	---	---	۱۰	۲۰	۵	۱۰	۵	۱۰
اسینتوباکتر بومانی	---	---	---	---	---	---	۱/۲۵	۲/۵	---	---	۱۰	۲۰	۲/۵	۵	۲/۵	۵
کاندیدا آلبیکنس	---	---	---	---	---	---	---	---	۱/۲۵	۲/۵	>۸۰	>۸۰	>۸۰	>۸۰	>۸۰	>۸۰

نتایج زمان مرگ باکتری

شکل ۱ و ۲ نتایج زمان مرگ باکتری را در قالب نمودار برای نانوذره و نانو کامپوزیت‌ها علیه *استرپتوکوکوس پیوژنز*، *پروتئوس میرابیلیس*، *اسینتوباکتر بومانی* و *اشریشیا کلی* نشان می‌دهند. نتایج نشان داد که نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان تعداد باکتری‌ها را در ۲۴ ساعت کاهش دادند و نانوذره‌های لاتریت نسبت به نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان فعالیت کمتری داشتند ($p=0.001$). بیشترین کاهش طی ۶ تا ۲۴ ساعت مشاهده شد. نتایج نشان داد که آنتی‌بیوتیک‌ها فعالیت ضد باکتریایی بهتری در آزمایش زمان مرگ داشتند. بر اساس نتایج داده‌شده، تعداد باکتری‌ها، در گروه کنترل در مقایسه با دیگر گروه‌ها بیشتر بود ($p=0.001$)، بااین حال لاتریت اثرات قابل توجهی روی تعداد باکتری‌ها در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p=0.013$). بر اساس نتایج حاصله، اگرچه آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی روی باکتری‌ها، فعالیت‌های بیشتری نشان دادند ولی باگذشت زمان، نانو کامپوزیت‌های تهیه‌شده، روی تمام باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت اثر داشتند.



شکل ۱: نتایج زمان مرگ باکتری برای نانوذره لاتریت و نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان علیه *باکتری های اسینتوباکتر بومانی* و *اشریشیا کلی*



شکل ۲: نتایج زمان مرگ باکتری برای نانوذره لاتریت و نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان علیه باکتری های *پروتئوس میرابیلیس* و *استرپتوکوکوس پیوژنز*

بحث

نتایج آزمایش‌های حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی حاکی از آن بود که لاتریت فعالیت آنتی‌باکتریایی ضعیفی داشت و بارگذاری نانو ذرات نقره، فعالیت آنتی باکتریایی را به‌طور چشمگیری بهبود بخشید. افزودن کیتوزان تأثیر قابل‌توجهی روی فعالیت آنتی باکتریایی نداشت. نتایج برای فعالیت آنتی باکتریایی نقره همسو با نتایج گزارش‌شده توسط

مطالعات قبلی است (۴, ۲۰, ۲۷, ۳۸). عکس‌های TEM و تحقیقات پروتئومیک نشان داده است که نانو ذرات فلزی به دلیل برهم‌کنش با غشای باکتری و ایجاد تغییرات ساختاری با از بین بردن نیرومحرکه پروتون، درنهایت منجر به مرگ باکتری می‌گردند (۲۷). خواص ضد میکروبی ترکیبات نقره، سال‌های مدیدی است که شناخته‌شده است. اما اخیراً به دلیل ساخته‌شدن آن به‌صورت نانو ذرات، سطح تماس نقره افزایش‌یافته و خاصیت ضد میکروبی آن تا بیش از ۹۹٪ افزایش پیداکرده است. در مطالعات متعددی نیز مشخص‌شده که اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره به‌اندازه و شکل آن‌ها بستگی دارد. در پژوهشی که توسط اپینوسا-کریستوبال و همکارانش انجام شد، نانو ذرات نقره خاصیت ضد باکتریایی قوی در مقابل باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* از خود نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که با کاهش اندازه نانو ذرات نقره از ۱۰۰ نانومتر به ۱۶ نانومتر، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نصف می‌گردد و این به معنای افزایش خاصیت ضد باکتریایی نانو ذرات نقره با اندازه کوچک‌تر است (۱۱). سازوکار اصلی خاصیت ضد باکتریایی نانو ذرات نقره، رهایش یون‌های نقره است. درهرحال سازوکار فعالیت یون‌های نقره از دیدگاه میکروبیولوژی مولکولی هنوز به‌طور کامل شناخته‌نشده است. برخی از سازوکارهای اصلی عبارت است از: آسیب به غشاء سلولی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و حمله سلولی یون‌های نقره (یا حتی نانو ذرات نقره به دلیل وجود حفرات غشایی) و در ادامه آسیب به محصولات ATP و بازدارندگی تکثیر DNA است (۸). در پژوهش‌های بسیاری، آسیب به غشاء سلولی به‌وسیله یون‌های نقره گزارش‌شده است. این گزارش‌ها عمدتاً بر پایه مشاهده حفره‌ها یا سوراخ‌های بزرگ در غشا باکتریایی با آنالیز TEM است. بر اساس نتایج این مطالعات، ممکن است یون‌های نقره با پروتئین‌های غشایی حاوی سولفور (به‌عنوان‌مثال با گروه تیول پروتئین زنجیره تنفسی) برهم‌کنش داده و باعث آسیب فیزیکی به غشا شوند (۱۰, ۲۹). در یک مطالعه که به بررسی اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره علیه *شرشیا کلی* پرداخته‌شده بود، نشان داده شد که نانو ذرات نقره، فعالیت آنتی‌باکتریایی قابل‌توجهی دارند. آن‌ها بر این نظریه تأکید کردند که در مواجهه با نانو ذرات نقره، میکروارگانیسم‌ها توانایی همانندسازی خود را ازدست‌داده و پروتئین‌های سلولی غیرفعال می‌شوند (۳۵). از مهم‌ترین دلایل کاربرد نانو ذرات نقره اثر ضد میکروبی آن در برابر میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. مطالعات نشان داده که مقاومت بالینی نسبت به نقره کم است (۳۶). نتایج این مطالعه نشان داد که قرارگیری کیتوزان، تأثیر قابل‌توجهی روی فعالیت آنتی باکتریایی نداشت و به عبارتی، فعالیت آنتی باکتریایی مربوط به نانو ذرات نقره بود. در مطالعه‌ای که به بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره/کیتوزان بر روی دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* پرداخته بود، نشان داد که عملکرد جمعی یون‌های نقره/کیتوزان افزایش‌یافته و فعالیت ضد باکتریایی را افزایش می‌دهد. این محققین همچنین نشان دادند که فعالیت ضد باکتریایی نانو کامپوزیت نقره/کیتوزان با افزایش غلظت نقره افزایش می‌یابد (۲۴). با توجه به فعالیت ضد باکتریایی کیتوزان، انتظار می‌رفت که نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت/کیتوزان بتوانند در مقایسه با نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت فعالیت ضد باکتریایی بهتری داشته باشند. بااین‌حال، یافته‌های ما تفاوت معنی‌داری بین نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان نشان نداد. این امر ممکن است به

دلیل نیاز به زمان بیشتر جهت تأثیرگذاری کیتوزان در شرایط آزمایشگاهی باشد. دلیل دیگر این است که فعالیت آنتی باکتریایی کیتوزان در ساختار نقره/لاتریت/کیتوزان در مقایسه با نقره/لاتریت مشابه است و احتمالا در حضور نانو ذرات نقره، کیتوزان نمی‌تواند اثر خود را نشان دهد. تمامی نانو کامپوزیت‌های تهیه‌شده با افزایش زمان اثرات خود را نشان دادند که این نشان می‌دهد این نانو کامپوزیت‌ها نیاز به زمان بیشتری برای تأثیرگذاری دارند و خیلی زود تجزیه نمی‌شوند. اگرچه آنتی‌بیوتیک‌ها اختصاصی بودند و فعالیت بیشتری (قابل ملاحظه ای) در مقایسه با نانو کامپوزیت‌ها داشتند. بااین‌حال، نانو کامپوزیت‌ها روی تمامی باکتری ها اثر داشتند و این نشان‌دهنده‌ی فعالیت گسترده‌ی نانو کامپوزیت‌ها است. با توجه به نتایج حاصله، نانو کامپوزیت‌ها روی باکتری‌های گرم مثبت، بیشتر اثرگذار بودند که این مربوط به ساختار ساده‌تر دیواره سلولی آن‌ها است. همچنین نانو کامپوزیت‌ها روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* اثر نداشتند که این امر بیشتر مربوط به ساختار قارچ‌ها است که با باکتری‌ها متفاوت است. قارچ‌ها دارای دیواره‌ی سلولی کیتینی هستند که احتمالا نانوکامپوزیت‌های تهیه شده، نمی‌توانند در داخل آن نفوذ یابند و بنابراین نمی‌توانند باعث از بین رفتن قارچ‌ها شوند. با این‌حال، در باکتری‌ها، نانوکامپوزیت‌ها بدلیل داشتن یون نقره که توانایی نفوذ در داخل باکتری را دارد توانسته‌اند باعث مرگ باکتری‌ها شوند. اگرچه، این استدلال‌ها نیاز به مطالعات آزمایشگاهی دارد و نیاز است که سازوکارها بصورت دقیق و با آزمون‌های اختصاصی بررسی شوند.

ذکر این نکته ضروری است که لاتریت دارای فعالیت آنتی باکتریایی ضعیفی بود. بااین‌حال، لایه سطحی خارجی آن توانست نقش یک بستر برای نانو ذرات نقره باشد. لاتریت ممکن است هنگام اتصال به نانو ذرات نقره، فعالیت ضد باکتریایی را در قالب نانو کامپوزیت نشان دهد، که نیاز به بررسی‌های دقیق و بیشتر دارد.

نتیجه گیری نهایی

در مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی، نانو ذرات لاتریت و نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان با استفاده از عصاره گیاه استبرق به روش سنتز فیتوکمیکال تهیه گردید. نتایج نشان داد که نانو کامپوزیت‌های تهیه‌شده فعالیت ضد میکروبی بالایی در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در شرایط آزمایشگاهی از خود نشان دادند، ولی نانوذره لاتریت فعالیت ضد باکتریایی پایینی از خود نشان داد. همچنین هیچ‌یک از نانوذره و نانو کامپوزیت‌ها خاصیت ضد قارچی از خود نشان ندادند. در تمام مراحل آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده در مقایسه با نانوذره و نانو کامپوزیت‌ها فعالیت بهتری از خود نشان دادند. اگرچه فعالیت ضد میکروبی نانو کامپوزیت‌های تهیه‌شده در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی هر باکتری پایین‌تر بود، بااین‌حال نانو کامپوزیت‌ها فعالیت ضد میکروبی روی طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها داشتند. اگرچه مطالعه حاضر بیان‌کننده‌ی اثرات ضد میکروبی نانو کامپوزیت‌های نقره/لاتریت و نقره/لاتریت/کیتوزان است بااین‌حال نمی‌توان با قاطعیت در رابطه با نتایج کاربردی صحبت نمود. ازاین‌رو لازم است تا مطالعات گسترده بر روی تأثیرات نانو ذرات فلزی به‌ویژه نانو ذرات نقره که با عصاره‌های گیاهی همراه شده‌اند بر روی عوامل عفونی و مهار عفونت در مدل‌های تجربی انجام گیرد و با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد مقایسه گردد.

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه دکتری تخصصی رشته میکروبیولوژی نویسنده اول تحت کد پژوهشی اخذشده

از دانشگاه آزاد اسلامی زنجان به شماره ۱۸۴۵۸۶ می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع

1. Alavi. M..Rai. M. (2019).Recent progress in nanoformulations of silver nanoparticles with cellulose, chitosan, and alginic acid biopolymers for antibacterial applications. *Applied microbiology and biotechnology*. **103**: 8669-8676.
2. Amini. M.H..Ahmady. A..Zhakfar. A.M..Sediqi. M.N..Babak. G. (2019).Preliminary Phytochemical Profile, in vitro Antioxidant and Sun Protective Activities of Alhagi pseudalhagi and Elaeagnus angustifolia L. *Journal of Pharmaceutical Research International*. **31**: 1-13.
3. Behroozian. S. (2019).Antimicrobial properties of Kisameet clay, a natural clay mineral from British Columbia, *Canada. Journal*.
4. Bharti. S..Mukherji. S..Mukherji. S. (2021).Enhanced antibacterial activity of decahedral silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*. **23**: 1-18.
5. Biharee. A..Sharma. A..Kumar. A..Jaitak. V. (2020).Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia*. **146**: 104720.
6. Chowdhury. P..Roy. B..Mukherjee. N..Mukherjee. S..Joardar. N..Mondal. M.K..Roy. D..Sinha Babu. S.P. (2018).Chitosan biopolymer functionalized gold nanoparticles with controlled cytotoxicity and improved antifilarial efficacy. *Advanced Composites and Hybrid Materials*. **1**: 577-590.
7. Daghian. S.G..Farahpour. M.R..Jafarirad. S. (2021).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*. **128**: 112294.
8. Das. C.A..Kumar. V.G..Dhas. T.S..Karthick. V..Govindaraju. K..Joselin. J.M..Baalamurugan. J. (2020).Antibacterial activity of silver nanoparticles (biosynthesis): A short review on recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **27**: 101593.
9. Ehsani. P..Farahpour. M.R..Mohammadi. M..Mahmazi. S..Jafarirad. S. (2021).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*. **628**: 127362.
10. Espinosa-Cristóbal. L..Martínez-Castañón. G..Martínez-Martínez. R..Loyola-Rodriguez. J..Patino-Marin. N..Reyes-Macias. J..Ruiz. F. (2009).Antibacterial effect of silver nanoparticles against Streptococcus

mutans. *Materials Letters*. **63**: 2603-2606.

11. Espinosa-Cristóbal. L.F..López-Ruiz. N..Cabada-Tarín. D..Reyes-López. S.Y..Zaragoza-Contreras. A..Constandse-Cortéz. D..Donohué-Cornejo. A..Tovar-Carrillo. K..Cuevas-González. J.C..Kobayashi. T. (2018).Antiadherence and antimicrobial properties of silver nanoparticles against Streptococcus mutans on brackets and wires used for orthodontic treatments. *Journal of Nanomaterials*. **2018**:
12. Franconetti. A..Carnerero. J.M..Prado-Gotor. R..Cabrera-Escribano. F..Jaime. C. (2019).Chitosan as a capping agent: Insights on the stabilization of gold nanoparticles. *Carbohydrate polymers*. **207**: 806-814.
13. Garibo. D..Borbón-Nuñez. H.A..de León. J.N.D..García Mendoza. E..Estrada. I..Toledano-Magaña. Y..Tiznado. H..Ovalle-Marroquin. M..Soto-Ramos. A.G..Blanco. A. (2020).Green synthesis of silver nanoparticles using Lysiloma acapulcensis exhibit high-antimicrobial activity. *Scientific reports*, **10**: 1-11.
14. Gharehpapagh. A.C..Farahpour. M.R..Jafarirad. S. (2021).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*. **183**: 447-456.
15. Guo. Y..Song. G..Sun. M..Wang. J..Wang. Y. (2020).Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in Staphylococcus aureus. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. **10**: 107.
16. Gupta. A..Singh. R..Purwar. C..Chauhan. D..Singh. J. (2003).Two pentacycIic triterpenes from the stem of Calotropis procera.
17. Hajilou. H..Farahpour. M.R..Hamishehkar. H. (2020).Polycaprolactone nanofiber coated with chitosan and Gamma oryzanol functionalized as a novel wound dressing for healing infected wounds. *International Journal of Biological Macromolecules*. **164**: 2358-2369.
18. Joughi. N.F.G..Farahpour. M.R..Mohammadi. M..Jafarirad. S..Mahmazi. S. (2022).Investigation on the antibacterial properties and rapid infected wound healing activity of silver/laterite/chitosan nanocomposites. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.
19. Kasim. N.A..Azmi. N.A.C..Mukri. M..Noor. S.N.A.M. Effect on physical properties of laterite soil with difference percentage of sodium bentonite. in AIP Conference Proceedings. 2017. AIP Publishing LLC.
20. Keshari. A.K..Srivastava. R..Singh. P..Yadav. V.B..Nath. G. (2020).Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by Cestrum nocturnum. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*. **11**: 37-44.
21. Khameneh. B..Iranshahy. M..Soheili. V..Bazzaz. B.S.F. (2019).Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **8**: 1-28.

against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa. *International journal of nanomedicine* **14**: 1469.

28. Loo. Y.Y..Rukayadi. Y..Nor-Khaizura. M.-A.-R..Kuan. C.H..Chieng. B.W..Nishibuchi. M..Radu. S. (2018).In vitro antimicrobial activity of green synthesized silver nanoparticles against selected gram-negative foodborne pathogens. *Frontiers in microbiology* **9**: 1555.
29. Maciel. M.V.d.O.B..da Rosa Almeida. A..Machado. M.H..Elias. W.C..da Rosa. C.G..Teixeira. G.L..Noronha. C.M..Bertoldi. F.C..Nunes. M.R..de Armas. R.D. (2020).Green synthesis, characteristics and antimicrobial activity of silver nanoparticles mediated by essential oils as reducing agents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **28**: 101746.
30. Magana. S..Quintana. P..Aguilar. D..Toledo. J..Angeles-Chavez. C..Cortes. M..Leon. L..Freile-Pelegrín. Y..López. T..Sánchez. R.T. (2008).Antibacterial activity of montmorillonites modified with silver. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **281**: 192-199.
31. Mulat. M..Khan. F..Muluneh. G..Pandita. A. (2020).Phytochemical profile and antimicrobial effects of different medicinal plant: current knowledge and future perspectives. *Current Traditional Medicine* **6**: 24-42.
32. Nemati. A..Masoorian. E..Rajabpour. M..Darb Emamie. A..Jafari. M..Pourmand. M.R. (2021).Frequency and antimicrobial susceptibility patterns of bacterial agents isolated
22. Khare. C.P. (2008).Indian medicinal plants: an illustrated dictionary. Journal
23. Khezri, K..Farahpour, M.R..Rad, S.M. (2020).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* **589**: 124414.
24. Kumar-Krishnan. S..Prokhorov. E..Hernández-Iturriaga. M..Mota-Morales. J.D..Vázquez-Lepe. M..Kovalenko. Y..Sanchez. I.C..Luna-Bárcenas. G. (2015).Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. *European Polymer Journal* **67**: 242-251.
25. Kuwabara. M..Sato. Y..Ishihara. M..Takayama. T..Nakamura. S..Fukuda. K..Murakami. K..Yokoe. H..Kiyosawa. T. (2020).Healing of Pseudomonas aeruginosa-infected wounds in diabetic db/db mice by weakly acidic hypochlorous acid cleansing and silver nanoparticle/chitin-nanofiber sheet covering. *Wound Medicine* **28**: 100183.
26. Lemougna. P.N..Melo. U.F.C..Kamseu. E..Tchamba. A.B. (2011).Laterite based stabilized products for sustainable building applications in tropical countries: review and prospects for the case of Cameroon. *Sustainability* **3**: 293-305.
27. Liao. S..Zhang. Y..Pan. X..Zhu. F..Jiang. C..Liu. Q..Cheng. Z..Dai. G..Wu. G..Wang. L. (2019).Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles

from wound infections of inpatients at a university hospital in Tehran. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* **26**: 71-84.

33. Nguyen. T.T..Guedj. J..Chachaty. E..de Gunzburg. J..Andremont. A..Mentré. F. (2014).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* **10**: e1003840.
34. Organization. W.H. (2017).Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis. Journal
35. Sondi. I..Salopek-Sondi. B. (2004).Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science* **275**: 177-182.
36. Usman. A..Onore. R.O..Oforghor. O.A..Mohammed. J..Usman. N.L. (2010).Total Phenolic and Flavonoid Contents, Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Calotropis Procera Stem Bark Extracts. *Communication in Physical Sciences* **5**:
37. Williams. L.B..Metge. D.W..Eberl. D.D..Harvey. R.W..Turner. A.G..Prapaipong. P..Poret-Peterson. A.T. (2011).What makes a natural clay antibacterial? *Environmental science & technology* **45**: 3768-3773.
38. Yoon. K.-Y..Byeon. J.H..Park. J.-H..Hwang. J. (2007).Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment* **373**: 572-575.
39. Zhao. X..Liang. Y..Huang, Y..He. J..Han. Y..Guo. B. (2020).Physical double-network hydrogel adhesives with rapid shape adaptability, fast self-healing, antioxidant and NIR/pH stimulus-responsiveness for multidrug-resistant bacterial infection and removable wound dressing. *Advanced Functional Materials* **30**: 1910748.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 17, Issue 2, Autumn & Winter 2021

The antibacterial effect of silver/laterite and silver/laterite/chitosan nanocomposites on some bacteria and fungi that cause infections in cutaneous wounds

Nazila Farhangi ghaleh joughi [1], Mohammad Reza Farahpour [2]*, Mojtaba Mohammadi [3], Saeed Jafarirad [4,5], Sanaz Mahmazi [6]

[1] Ph.D. student, Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
[2] Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
[4] Department of Organic and Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[5] Research Center of Bioscience and Biotechnology, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[6] Assistant Professor, Department of Genetics, Biology Research Center, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran.

Received: 11 January 2022 *Accepted: 4 September2022*

Abstract

The proliferation of antibiotic-resistant microorganisms in wounds has grown efforts to synthesis the antibacterial nanostructured compounds for overcoming on antibiotic-resistant microorganisms. The aim of the current study is to investigate the antibacterial and anti-fungal activities of laterite nanoparticles (Ltt-NPs), silver/laterite (Ag/Ltt-NCs) and silver/laterite/chitosan nanocomposites (Ag/Ltt/Chn-NCs) by analyzing minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration and killing-time of Candida albicans fungus and Acinetobacter baumannii, Streptococcus pyogenesis, Escherichia coli and Proteus mirabilis bacteria. We found that, where 5.0 µg/ml of Ag/Ltt-NCs are efficient against Acinetobacter baumannii and Streptococcus pyogenesis, 2.5 µg/ml of Ag/Ltt/Chn-NCs has a favorable efficiency against Escherichia coli and Proteus mirabilis. No significant difference was observed between the antibacterial activity of Ag/Ltt-NCs and Ag/Ltt/Chn-NCs (p=1.00). In addition, Ltt-NPs showed a poor antibacterial activity compared to the Ag/Ltt-NCs and Ag/Ltt/Chn-NCs. Moreover, we found that neither nanocomposite do not show antifungal activity. Our results show that the highest antibacterial activity of the nanocomposites occurs between 6-24 hours. In sum, the prepared nanocomposites showed efficient antibacterial activity on some bacteria causing infections in cutaneous wounds.

Keywords: antibacterial activity, minimum inhibitory concentration, pathogenic bacteria, nanocomposite

**Corresponding author: Mohammad-Reza Farahpour*
Address: Assoc. Prof Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia,Iran.
E. mail: mrf78s@gmail.com