فصلنامه مواد و فناوری‌های پیشرفته

Journal Homepage: www.jamt.ir

MERC

مقاله یادداشت پژوهشی

سنتز نانوذرات اکسید روی/گزنه به روش شیمیایی مرطوب و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آن در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*های مقاوم به چند دارو، جداسازی‌شده از زخم‌های دیابتی

سمانه سالمی نجف‌آبادی [۱]، منیر دودی [۲*]، آرزو طهمورث‌پور [۳]، زهرا رضایتمند [٤]، غلامرضا امیری [٥]

[۱] دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران

[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران

[۳] دانشیار، گروه علوم پایه پزشکی، دانشکده دندانپزشکی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، اصفهان، ایران

[٤] استادیار، گروه زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران

[٥] دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۳۹۹/۱۱/۱۹

دریافت نسخهٔ اصلاح‌شده: ۱٤۰۰/۰٤/۰٦

پذیرش قطعی: ۱٤۰۰/۰۹/۲۷

کلیدواژه‌ها:

استافیلوکوکوس اورئوس،

اکسید روی،

روش شیمیایی مرطوب،

گزنه،

مقاومت به چند دارو،

نانوذرات

چکیده با ظهور علوم جدیدی مانند فناوری نانو و هم‌سویی آن با علوم مهندسی، زیست‌شناسی و پزشکی، امید به درمان بیماری‌های عفونی افزایش یافته است. از عفونت‌هایی که دامنه وسیعی از افراد جامعه را گرفتار خود کرده، عفونت زخم‌های دیابتی است که یکی از عوامل آن، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است. در این پژوهش، با بهره‌گیری از علم نانو و تلفیق آن با گیاه درمانگر گزنه که گیاه چندساله علفی و دارای ارزش غذایی و دارویی فراوانی است، نانوذرات اکسید روی/گزنه سنتز شد. سنتز نانوذرات اکسید روی/گزنه به روش شیمیایی مرطوب انجام شد. ارزیابی ساختاری و ریزساختاری نانوذرات اکسید روی/گزنه سنتزشده به‌وسیله پراش پرتو ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) انجام شد. تأثیر ضدباکتریایی این نانوذرات بر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک جدا شده از زخم دیابتی بررسی شد. عملکرد ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی/گزنه در برابر ایزوله‌های مقاوم به چند دارویی (MDR) *استافیلوکوکوس اورئوس*، از طریق آزمون کیفی انتشار چاهک در آگار در غلظت‌های ۰/۰۳۲ تا ۰/۲٥٦ گرم/میلی لیتر نانوذرات سنتزشده انجام شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اندازه نانوذرات سنتز شده، ۱۰۰ نانومتر و ریخت‌شناسی آن‌ها دوکی‌شکل بود و بیشترین خاصیت ضدباکتریایی این نانوذرات، در غلظت ۰/۲٥٦ گرم/میلی‌لیتر، روی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک، با قطر هاله ۲۰ میلی‌متر و کمترین هاله عدم رشد در غلظت ۰/۰۳۲ گرم/میلی‌لیتر مشاهده شد. با توجه به یافته‌های این پژوهش، به‌نظر می‌رسد نانوذرات اکسید روی/گزنه، فعالیت ضدباکتریایی بهتری علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک جداشده از زخم دیابتی داشتند.

https://doi.org/10.30501/jamt.2021.260476.1146 URL: https://www.jamt.ir/article_131673.html

Research Note Article

***عهده دار مکاتبات**

نشانی: ایران، اصفهان، فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی، **تلفن:** ۰۳۱-۳۷٤۲۰۱۳٤، **دورنگار:** -

پیام نگار: doudi@iaufala.ac.ir

Please cite this article as: Salemi Najafabadi, S., Doudi, M., Tahmourespour, A., Rezayatmand, Z., Amiri, Gh. R., "Synthesis of ZnO/urtica dioica nanoparticles by wet chemical procedure and investigation of its antibacterial activity against Multiple Drug Resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* isolates of diabetic ulcers", ***Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)***, Vol. 10, No. 3, (2021), 79-88. (https://doi.org/10.30501/jamt.2021.260476.1146).

2783-0829/© 2021 The Author(s). Published by MERC.
This is an open access article under the CC BY license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT): Vol. 10, No. 3, (Autumn 2021), 79-88

Synthesis of ZnO/Urtica Dioica Nanoparticles by Wet Chemical Procedure and Investigation of Its Antibacterial Activity Against Multiple Drug Resistant (MDR) *Staphylococcus aureus* Isolates of Diabetic Ulcers

Samaneh Salemi Najafabadi [1], Monir Doudi [2*], Arezoo Tahmourespour [3], Zahra Rezayatmand [4], Gholam Reza Amiri [5]

[1] *Ph. D. Student, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran*
[2] *Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran*
[3] *Associate Professor, Department of Basic Medical Sciences, Dental College, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Isfahan, Iran*
[4] *Assistant Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran*
[5] *Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran*

Paper History:
Received: 2021-02-07
Revised in revised form: 2021-06-27
Accepted: 2021-12-18

Keywords:
Staphylococcus aureus,
ZnO,
Wet Chemical Method,
Urtica Diocia,
Multiple Drug Resistant (MDR),
Nanoparticles

Abstract The emergence of new sciences such as nanotechnology and its convergence with engineering, biology and medicine, it is raising hopes for the treatment of infectious diseases. One of the infections that has affected a wide range of people in the community Infection of diabetic wounds, one of the causes of which is the bacterium *Staphylococcus aureus*. In this study, using nanoscience and combining it with the old herbal medicine plant nettle, which is a perennial herb. And ZnO has great nutritional and medicinal value. Zinc oxide (ZnO) nanoparticles were synthesized by nettle coating. Synthesis of ZnO nanoparticles was performed by wetting the nettle plant by chemical method. Structural evaluation of minister nanoparticles of ZnO synthesized by X-Ray Diffraction (XRD), Transmission Electron Microscopy (TEM), and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) was performed. The antibacterial effect of this nanoparticle on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic wounds was investigated. The antibacterial performance of ZnO/Urtica diocia nanoparticles against *Staphylococcus aureus* Multi Drug Resistant (MDR) isolates was evaluated by qualitative agar well diffusion test at concentrations of 0.032 to 0.256 g/ml of synthesized nanoparticles. The results of this study showed that the size of the synthesized nanoparticles was 100 nm and spindle-shaped and the highest antibacterial properties of these nanoparticles at a concentration of 0.256 g/ml on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with a halo diameter of 20 mm and the lowest an inhibition of growth was observed at a concentration of 0.032 g/ml. According to the findings of this study it seems that ZnO/Urtica dioica nanoparticles had good antibacterial activity against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic wounds.

https://doi.org/10.30501/jamt.2021.260476.1146 URL: https://www.jamt.ir/article_131673.html

۱- مقدمه

علم و فناوری نانو و هم‌گرایی آن با علوم مهندسی و زیست‌شناسی مولکولی، موجب توسعه ساختارها، وسایل و سیستم‌هایی در دامنه اتمی، مولکولی یا ریزمولکولی[1] شده است. نانوذرات این توانایی را دارند که به فضای سیتوپلاسمی وارد شوند، از سد غشای سلولی عبور کنند، سازوکارهای انتقالی را فعال کنند و درنهایت، باکتری‌ها را از بین ببرند [۱].

نانوذرات زیستی، در چرخه حیات و اکوسیستم، پایین‌ترین سطح سمّیت را از خود نشان داده‌اند. ازاین‌رو، می‌توان از این مواد برای مبارزه با میکروب‌های بیماری‌زا استفاده کرد. نانوذرات اکسید فلزی، بر اساس نسبت سطح به حجم، خاصیت ضدباکتریایی متفاوتی از خود نشان می‌دهند [۲]. اختلاف بین بار منفی میکروارگانیسم و بار مثبت نانوذرات، شبیه الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذرات عمل می‌کند و باعث اتصال نانوذرات به سطح سلول و درنتیجه، مرگ سلول می‌شود [۳].

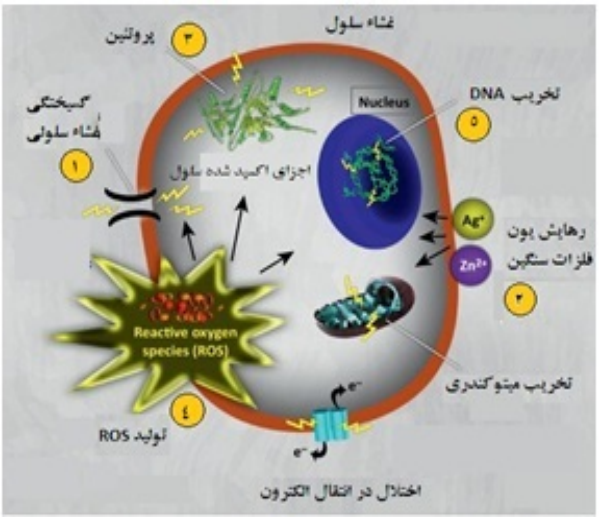
از ٤۰ سال قبل، استفاده از ذرات کوچک در تشخیص آزمایشگاهی آغاز شده است. نانوذراتی که ویژگی‌های مغناطیسی دارند، فرصت‌های نویدبخش جدیدی را فراهم می‌کنند که شامل بهبود کیفیت تصویربرداری رزونانس مغناطیسی[2] (MRI)، درمان گرمایی برای سلول‌های بدخیم، رساندن دارو به محل خاص و دستکاری غشاهای سلولی است [٤].

با استفاده از نانوذرات اکسید روی، این امید وجود دارد که از تجزیه داروها جلوگیری و از دارورسانی مبتنی بر نانوذرات که بهتر از سیستم‌های ذره‌ای در داخل بدن نفوذ می‌کنند، استفاده شود. کاربرد اصلی تولید نانوذرات زیستی، در پزشکی، درمان بیماری دیابت، سرطان، انتقال واکسن و درمان ایدز است. نانوذرات اکسید روی در صنایع الکترونیک، نساجی، لوازم آرایشی، افشانه[3]ها، پلاستیک، رنگ‌ها، فیلم‌های محافظ اشعه فرابنفش، حسگرهای شیمیایی و بسته‌بندی مواد

[1] Micromolecular

[2] Magnetic Resonance Imaging
[3] Spray

غذایی استفاده می‌شوند [٤]. شکل ۱، تأثیر مختلف نانوذرات بر باکتری‌ها را نشان می‌دهد.



شکل ۱. تأثیر مختلف نانوذرات بر باکتری‌ها

نانوذرات اکسید روی، فعالیت ضدمیکروبی شدیدی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند. اثربخشی بیشتر در سویه‌های مقاوم به عوامل بیماری‌زای میکروبی، سمّیت کمتر و مقاومت در برابر حرارت، از ویژگی‌های نانوذرات اکسید روی است که آن را برای ریشه‌کن‌کردن باکتری‌ها مناسب می‌کند. اندازه کوچک نانوذرات اکسید روی باعث افزایش توانایی ضدمیکروبی آن می‌شود. این ویژگی باعث می‌شود آسان‌تر به دیواره سلولی میکروارگانیسم بچسبند و موجب نابودی و مرگ سلول شوند [٥]. اتصال نانوذرات اکسید روی به سطح غشای میکروارگانیسم‌ها و افزایش تعداد تماس‌ها، به اکسیدشدن پروتئین‌های سطحی غشا منجر می‌شود. به‌دلیل نسبت سطح به حجم بالای نانوذرات، میزان چسبندگی به سطح سلول‌ها نیز افزایش می‌یابد و درنتیجه، قابلیت نفوذپذیری و میکروب‌کشی آن بالاتر می‌رود [٦]. اگرچه استفاده از مواد شیمیایی برای تولید نانوذرات از قدیم مرسوم بوده است، به‌تازگی از گیاهان برای تولید نانوذرات استفاده می‌شود. از مزایای این روش سنتز، کاهش سمّیت نانوذرات، افزایش زیست‌سازگاری، ارزانی، خلوص بالای نانوذرات و نیز افزایش گستره کاربردهای نانوذرات است [٧]. روش‌های شیمیایی سنتز معمولاً موجب می‌شوند که مقداری از واکنشگرهای سمّی روی نانوذرات باقی بمانند. به همین دلیل، در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان به‌منزله منابع پایدار و در دسترس، در پوشش‌دهی نانوذرات، توجه بسیاری را به خود معطوف کرده است [٨]. استفاده از عصاره گیاهان برای پوشش‌دهی نانوذرات فلزی به‌عنوان جایگزین آسان و مناسبی از روش‌های شیمیایی و فیزیکی مطرح شده است. در این پژوهش، از گیاه گزنه استفاده شده است. گیاه گزنه از گیاهان علفی چندساله با ارتفاع ۱۰-۸ سانتی‌متر است. بیشتراندام‌های آن با پرز پوشیده شده است [٩].

گزنه خاصیت دارویی فراوانی دارد. در طب سنتی، *اورتیکا دیوئیکا*[1]، از گونه‌هایی است که در ایران به‌عنوان داروی کمکی برای درمان دیابت مطرح شده است. گزنه یکی از گیاهان مفید در کاهش التهاب مفاصل، کاهش قند خون و درمان زخم بوده و ضددرد و مدر است. ترکیبات موجود در این گیاه، قابلیت فراوانی در از بین بردن میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا دارند. ترکیبات فنلیِ فلاونویید[2] و کافئیک اسید[3] موجود در مواد مترشحه برگ گزنه می‌توانند اسید آرشیدونیک[4] را سنتز کنند و موجب مهار لکوترین[5]ها می‌شوند. ترکیبات فنلیِ این گیاه، قدرت ضدباکتریایی بالا و تأثیر چشمگیری بر غشای سیتوپلاسمی و پروتئین‌های غشایی دارند. این ترکیبات با یون‌های فلزی مورد نیاز باکتری‌ها نیز واکنش می‌دهند و درنتیجه، موجب مرگ سلول‌های باکتری می‌شوند [١٠]. در نتیجه این گیاه خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی بالایی دارد [١١].

براساس پیش‌بینی‌های به‌عمل‌آمده، بیماری دیابت و زخم حاصل از آن، در جوامع انسانی رو به افزایش است [١٢]. ایسکمی[6]، نوروپاتی[7] و اختلال در سیستم ایمنی، از عوارض زخم دیابتی هستند. باکتری‌های بیماری‌زا، در پدیدآمدن عفونت زخم دیابتی بسیار اثرگذارند [١٣]. وجود باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک، در زخم‌های دیابتی، از عوامل مرگ‌ومیر و تأخیر در درمان این زخم‌هاست که پزشکی مدرن را در درمان عفونت‌های میکروبی موجود در این زخم‌ها با مشکلات جدی مواجه کرده است. فراوانی و همه‌گیری

[1] *Urtica Dioica*
[2] Flavonoid
[3] Caffeic Acid
[4] Arachidonic Acid
[5] Leukotriene
[6] Ischemia
[7] Neuropathy

باکتری‌های مقاوم به چند دارو (MDR)[1]، در دوران کنونی، یادآور دوران ماقبل آنتی‌بیوتیک است. *استافیلوکوکوس اورئوس*، از مهم‌ترین باکتری‌هایی است که سهم به‌سزایی در عفونت‌های زخم‌های دیابتی و مقاوم به آنتی‌بیوتیک دارد. *استافیلوکوکوس اورئوس*، کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است و مهم‌ترین گونه در جنس استافیلوکوکوس‌ها، از نظر پزشکی، به‌شمار می‌رود [۱۴].

استافیلوکوکوس اورئوس از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زایی است که در تمام نقاط مختلف بدن انسان و حیوانات یافت می‌شود و یکی از پنج عامل شایع ایجادکننده عفونت‌های زخم دیابتی در افراد به‌شمار می‌آید. پژوهش‌های متعدد نشان داده است که *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین عامل عفونت در زخم‌های دیابتی سطحی پوست است [۱۵]. وجود باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در بیماران مبتلا به زخم‌های دیابتی، از عوامل مرگ‌ومیر و تأخیر در درمان این زخم‌هاست [۱۶ و ۱۷]. روش‌های متنوعی نظیر رسوب‌نشانی [۱۸]، هیدروترمال[2] [۱۹]، سل-ژل[3] [۲۰]، خوداحتراقی [۲۱] و شیمیایی مرطوب [۲۲] برای تولید پوشش‌دهی نانوذرات به‌وسیله گیاهان استفاده شده‌اند.

در این پژوهش، *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جداسازی‌شده، با بررسی زخم‌های دیابتی افراد و تأیید آن‌ها در این زخم‌ها و با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی‌ای که این باکتری‌های جداشده از خود نشان می‌دهند، انتخاب و نانوذرات اکسید روی/گزنه روی آن‌ها اثر داده شد. تاکنون، پژوهش‌هایی مبتنی بر استفاده نانوذرات اکسید روی و بررسی خاصیت ضدباکتریایی آن انجام شده است، اما در خصوص نانوذرات اکسید روی/گزنه پژوهشی انجام نشده است. امید است با این پژوهش، پیشنهاد ساخت داروهای جدید بر پایه نانوذرات اکسید روی با پوشش گیاه گزنه ارائه شود.

۲- روش تحقیق

۲-۱- مواد اولیه

برای تهیه نانوذرات اکسید روی، از پیش‌ماده هیدروکسید سدیم[4] با خلوص ۹۸ درصد، کلرید روی[5] با خلوص ۹۸ درصد و ۲-مرکاپتواتانول[6] با کد ۸۰۵۷۴۰۰۲۵۰ استفاده شد که همگی از شرکت مِرک[7] آلمان بودند.

برای آماده‌سازی عصاره آبی گزنه، از برگ‌های این گیاه استفاده شد که از مرکز تحقیقات پژوهشی زوفه، واقع در قهدریجان اصفهان، با شماره هرباریوم ۰۱۷۰۰۱۰۰۱ خریداری شده بود. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، شامل ۱۰ میکروگرم/دیسک ایمی‌پنم[8]، ۳۰ میکروگرم/دیسک سفوکسیتین[9]، ۲۵ میکروگرم/دیسک آموکسی‌سیلین، ۱۵ میکروگرم/دیسک اریترومایسین و ۳۰ میکروگرم/دیسک ونکومایسین برای آزمایش آنتی‌بیوگرام[10] باکتری‌ها، از شرکت پادتن طب خریداری و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. محیط کشت‌های بلاد آگار[11]، مانیتول سالت آگار[12] برای کشت باکتری‌ها و محیط کشت مولر هینتون آگار[13] برای آنتی‌بیوگرام استفاده شد. تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده متعلق به شرکت مِرک آلمان بود.

۲-۲- سنتز نانوذرات

۲-۲-۱- تهیه عصاره آبی گزنه

برگ‌های گیاه گزنه، بعد از شست‌وشو، در تاریکی خشک شد و به‌سیله آسیاب، پودر شد. برای تهیه عصاره آبی، ۳ گرم پودر خشک برگ گزنه به ۱۰۰ میلی‌لیتر آبِ در حال جوش اضافه شد. عصاره به‌دست‌آمده، به‌مدت ۱۴ دقیقه، با دور g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد از سانتریفیوژ، دو فاز تشکیل شد که فاز زیرین، برای تهیه نانوذرات اکسید روی/گزنه، در تاریکی خشک شد [۲۳].

۲-۲-۲- سنتز نانوذرات اکسید روی

[1] Multiple-Drug Resistance
[2] Hydrothermal
[3] Sol-Gel

[4] Sodium Hydroxide
[5] Zinc Choloride
[6] 2-MercaptoEthanol
[7] MERCK
[8] Imipenem
[9] Cefoxitin
[10] Anti-Biogram
[11] Blood Agar
[12] Mannitol Salt Agar
[13] Muller Hinton Agar

به‌منظور تولید نانوذرات اکسید روی/گزنه از روش شیمیایی مرطوب استفاده شد. ۱/۳٦ گرم کلرید روی با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط و در داخل بالن سوکسله[1] ریخته شد و به آن ٤۰۰ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول که در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شده بود، اضافه و در داخل قیف جداکننده[2] سوکسله ریخته و روی هیتر مگنت‌دار قرار داده شد. بعد از ۲۰ دقیقه، ۰/۸ گرم هیدروکسید سدیم که با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده بود، به آن اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه، محلول سفید رنگی حاصل شد و به‌منظور حذف ناخالصی‌ها و نمک موجود از آن، ۳ بار شست‌وشو داده شد.

۲-۲-۳- سنتز نانوذرات اکسید روی/گزنه

پس از تولید نانوذرات اکسید روی، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به رسوب حاصل اضافه و به بالن سوکسله منتقل و ۱۰۰ میلی‌لیتر از عصاره آبی گزنه به آن اضافه شد. بعد از ۲۰ دقیقه، رسوب نانوذرات اکسید روی/گزنه به‌دست آمد. رسوب حاصل به ظرف‌های استریل منتقل و در فور ٤۰ درجه سانتیگراد خشک شد. سپس، از پودر حاصل، غلظت‌های ۰/۰۳۲، ۰/۰٦٤، ۰/۱۲۸ و ۰/۲٥٦ گرم/میلی لیتر در حلال آب مقطر استریل تهیه شد [۲٤].

۲-۳- مشخصه‌یابی نانوذرات اکسید روی/گزنه

به‌منظور بررسی ساختار بلوری نانوساختارهای اکسید روی/گزنه و اندازه‌گیری قطر میانگین دانه‌ها، از روش ثبت الگوی پراش پرتو ایکس[3] (XRD)، توسط دستگاه XRD ۷۰۰۰، متعلق به شرکت ژاپنی شیمادزو[4]، استفاده شد. برای بررسی پیوندهای پودر نانوی حاصله و جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها در نانوذرات، از روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز[5] (FTIR) و دستگاه FTIR مدل ٦۳۰۰ از کشور ژاپن، با رزولوشن ٤ cm^{-1} نیز استفاده شد. ریخت‌شناسی و ابعاد نانوذرات با کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری[6] (TEM)، دارای نشان تجاری LEO 912 AB شرکت زایس آلمان، بررسی شد. برای آماده‌سازی نمونه TEM، پودر حاصل از برهم‌کنش، ۳ بار و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ و از رسوب حاصل، عکس‌برداری شد.

۲-٤- ارزیابی میکروبی

۲-٤-۱- تهیه سوسپانسیون باکتریایی

در این پژوهش، از ۳۰ بیمار دارای زخم دیابتی نمونه‌گیری شد و با استفاده از لام مستقیم و آزمایش‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی شامل (تست کاتالاز،[7] تست کواگولاز،[8] تست دئوکسی ریبونوکلئاز،[9] کشت روی محیط مانیتول سالت آگار و بررسی ویژگی‌های کشت)، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شد.

سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند که معادل ۱/٥×۱۰^{۸} Cfu/ml (کلنی در هر میلی‌لیتر) است از باکتری‌های جداشده تهیه شد و به‌منظور بررسی مقاومت باکتری‌ها به چند آنتی‌بیوتیک رایج در کشور، از روش کربی -بائر استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل ۱۰ میکروگرم/دیسک ایمی‌پنم، ۳۰ میکروگرم/دیسک سفوکسیتین، ۲٥ میکروگرم/دیسک آموکسی‌سیلین، ۱٥ میکروگرم/دیسک اریترومایسین و ۳۰ میکروگرم/دیسک ونکومایسین از شرکت پادتن طب ایران خریداری و استفاده شد. بعد از آزمایش، ظرف‌ها، ۲٤ ساعت، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت و درنهایت، قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌وسیله خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد و عدد میانگین آن‌ها، پس از ۳ بار تکرار، بر حسب میلی‌متر گزارش شد [۲٥].

۲-٤-۲- بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی/گزنه

بدین منظور، از روش کیفی انتشار چاهک در آگار[10] استفاده شد. باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، با حفظ شرایط استاندارد، از سوسپانسیون نیم مک فارلند آن‌ها، روی محیط کشت مولر هینتون آگار، کشت داده شدند. غلظت‌های مورد نظرِ ۰/۰۳۲، ۰/۰٦٤، ۰/۱۲۸ و ۰/۲٥٦ گرم/میلی‌لیتر از نانوذرات

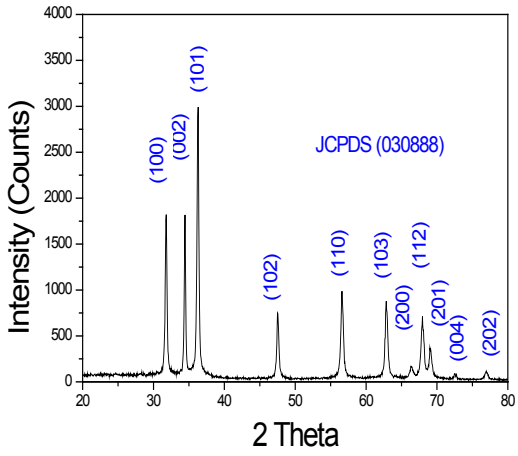
[1] Soxhlet
[2] Decanter
[3] X-Ray Diffraction
[4] Shimadzu Company
[5] Fourier-Transform Infrared
[6] Transmission Electron Microscope
[7] Catalase Test
[8] Coagulase Test
[9] DNase Test
[10] Well Diffusion Method

اکسید روی/گزنه تهیه شد و به‌اندازه ۸۰ میکرولیتر از هر غلظت، درون چاهک‌ها ریخته شد (البته قبل از اضافه‌کردن غلظت‌ها، انتهایی چاهک‌ها با محیط کشت مولر هینتون مذاب مُهر و بسته شد) و از دیسک سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم/دیسک، جهت کنترل مثبت و سرم فیزیولوژی، به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. میانگین نتایج، بعد از ۳ بار تکرار، گزارش شد [۲٦].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه‌یابی نانوذرات اکسید روی/گزنه

شکل ۲، الگوی پراش پرتو ایکس نانوساختار به‌دست‌آمده را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، پیک‌ها در صفحات بلوری (100)، (002) و (101)، با کارت مرجع JCPDS نانوذرات اکسید روی با شماره کارت ۰۳۰۸۸۸ که دارای ساختار بلوری هگزاگونال است، مطابقت داشت و هیچ پیک ناخالصی در آن مشاهده نشد.



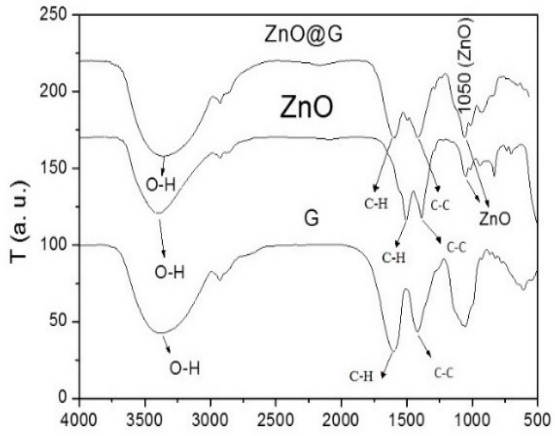
شکل ۲. طیف XRD نانوذرات اکسید روی (۰۳۰۸۸۸JCPDS)

در این پژوهش، اندازه بلورک‌ها از طریق فرمول دبای شرر[1] (رابطه ۱) و براساس بزرگ‌ترین پیک (101) محاسبه شد.

$$D = 0.9\lambda/\beta\cos\Theta \quad (۱)$$

که در این رابطه، D، متوسط اندازه بلورک‌ها، λ، طول موج پرتو ایکس تابیده‌شده به نمونه و β، نصف پهنای پیک در ارتفاع بیشینه بود. براساس رابطه فوق، متوسط اندازه بلورک‌ها، ۲۷/۵ نانومتر محاسبه شد.

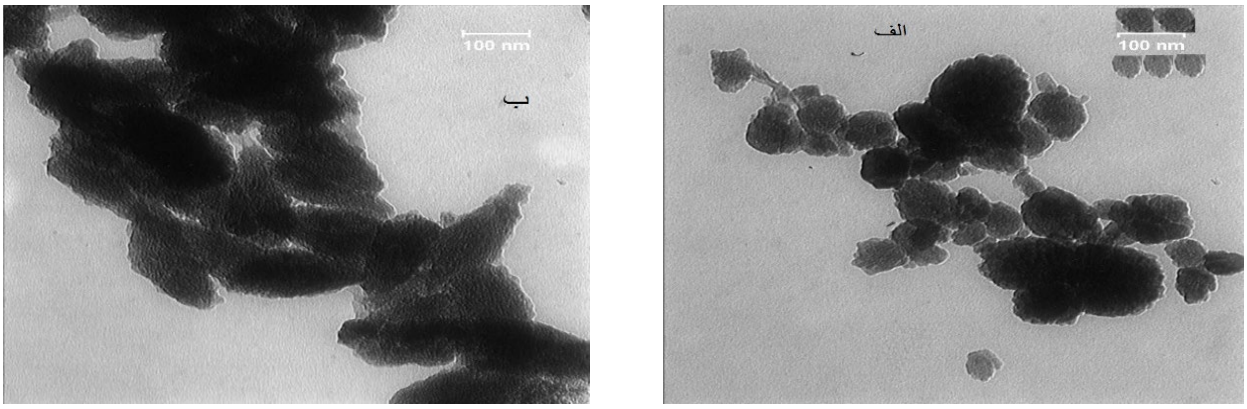
در تحلیل FTIR، ماهیت مولکول‌های زیستی احیاکننده در تشکیل نانوذرات اکسید روی مطالعه شد. هر باند با گروه‌های عاملی خاصی ارتباط داشت که با توجه به شکل ۳، FTIR نانوذرات اکسید روی/گزنه، پیک‌هایی در ۳۳٦٦/۱٤ cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های الکلی O-H و پیک‌هایی در ۲۹۷۸/۲٤ cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی گروه آلیفاتیک موجود در عصاره گیاه دارد. همچنین، پیک‌هایی در ۱٦۰/۱، ۱۲۷۲/۷۹، ۱۰۵۲/۹٤، ۸۲٤/٤۲، ٦۱۰/۳٦ و ۱٤۱۸/۳۹ cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی آلکن و ارتعاشات خمشی C-H و پیک‌هایی در ۱٦۵٦ cm^{-1} مربوط به پیوند C=C و پیک‌هایی در ۱٤۲۷ cm^{-1} مربوط به پیوند C-C در آزمایش FTIR این نانوذرات نشان داده است [٤۲]. در این آزمایش، اتصالات میان ذرات اکسید روی و گزنه در پیک ۱۰۵۰ cm^{-1} وجود داشت که در شکل ۳ ترسیم شده است [۲۷].



شکل۳. طیف FTIR گزنه، اکسید روی و اکسید روی/گزنه

تصاویر TEM نانوذرات اکسید روی/گزنه در شکل ٤ ارائه شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود توزیع اندازه و شکل نانوذرات یکنواخت هستند. نانوذرات اکسید روی/گزنه، دوکی‌شکل و با ابعاد ۱۰۰ نانومتر بوده و نانوذرات اکسید روی کروی‌شکل است.

[1] Debye Scherrer



شکل ٤. تصویر TEM حاصل از نانوذرات: الف) اکسید روی و ب) اکسید روی/گزنه

۳-۲- بررسی مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده

طی بررسی‌های بیوشیمیایی، از ۳۰ جدایه باکتریایی جداسازی و شناسایی‌شده از زخم‌های دیابتی افراد، ۱۲ ایزوله S1 تا S12 آن، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. نتایج آنتی‌بیوگرام این باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها (ایمی‌پنم ۱۰ میکروگرم/دیسک، سفوکسیتین ۳۰ میکروگرم/دیسک، آموکسی‌سیلین ۲۵ میکروگرم/دیسک، اریترومایسین ۱۵ میکروگرم/دیسک و ونکومایسین ۳۰ میکروگرم/دیسک) در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از مقاوت ٤ باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، آموکسی‌سیلین و اریترومایسین ارائه شده است که این ٤ باکتری از بین ۱۲ باکتری انتخاب شدند و نانوذرات اکسید روی/گزنه روی آن‌ها اثر داده شد.

جدول ۱. میانگین مقاومت و حساسیت باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از زخم‌های دیابتی به آنتی‌بیوتیک

آنتی بیوتیک / نمونه	ایمی پنم ۱۰ µg/disc	سفوکسیتین ۳۰ µg/disc	ونکومایسین ۳۰ µg/disc	آموکسی سیلین ۲۵ µg/disc	اریترومایسین ۱۵ µg/disc
S۱	۲۰mm	۱۷mm	٦mm	۵mm	۱۱mm
S۲	۱۵mm	۱٦mm	۸mm	٤mm	٦mm
S۳	۱۱mm	۱۷mm	۱۲mm	۱۷mm	۸mm
S٤	۱۷mm	۱۸mm	۷mm	٦mm	۵mm
S۵	۲۸mm	۲۰mm	۷mm	٦mm	۹mm
S٦	۱۱mm	۱۳mm	۱٦mm	۱۵mm	۱۲mm
S۷	۹mm	۱۰mm	۱۲mm	۱٤mm	۱٤mm
S۸	۱٦mm	۱۰mm	۹mm	۸mm	۱۰mm
S۹	۱۲mm	۱۱mm	۱۰mm	۸mm	۱۲mm
S۱۰	۱٤mm	۱۲mm	۱۰mm	۹mm	۱۰mm
S۱۱	۱۵mm	۱۲mm	۱۱mm	۱۰mm	۱۰mm
S۱۲	۱٦mm	۱۵mm	۱۰mm	۹mm	۷mm

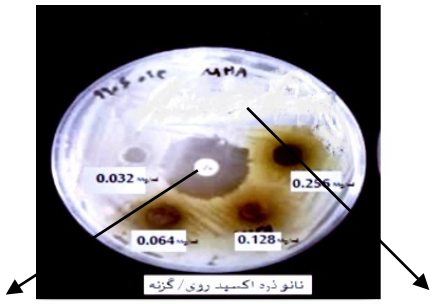
۳-۳- بررسی اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی/گزنه

چهار باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از ایزوله‌های بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک، انتخاب و غلظت‌های ۰/۰۳۲، ۰/۰٦٤، ۰/۱۲۸ و ۰/۲۵٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات اکسید روی/گزنه محلول در آب مقطر استریل تهیه شدند و روی *استافیلوکوکوس اورئوس*های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به روش انتشار چاهک در آگار مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت کنترل مثبت، از آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین و کنترل منفی، سرم

فیزیولوژی استفاده شد. طبق شواهد، بیشترین هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۰/۲۵۶ گرم بر میلی‌لیتر از این نانوذرات بود که قطر هاله عدم رشد آن ۲۰ میلی‌متر بود. نتایج میانگین این آزمایش، پس از ۳ بار تکرار، در جدول ۲ ارائه شده است. در شکل ۵، تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی/گزنه نشان داده شده است.

جدول ۲. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک با توجه به غلظت‌های نانوذرات اکسید روی/گزنه

غلظت	۰/۰۳۲ گرم/میلی لیتر	۰/۰۶۴ گرم/میلی لیتر	۰/۱۲۸ گرم/میلی لیتر	۰/۲۵۶ گرم/میلی لیتر
نمونه	میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری (mm)			
S۱	۰	۸/۶	۱۰/۳	۱۸/۳
S۲	۲	۱۰/۳	۱۶/۳	۲۲/۸
S۵	۲/۲	۹/۶	۱۶	۱۰/۶
S۴	۳	۸/۵	۱۵	۱۸
کنترل مثبت	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
کنترل منفی	۰	۰	۰	۰



کنترل منفی کنترل مثبت

شکل ۵. تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید روی/گزنه بر باکتری S1

در سال‌های اخیر، استفاده از عصاره‌های گیاهی، برای تهیه نانوذرات فلزی، جایگزین آسان و مناسب روش‌های شیمیایی و فیزیکی شده است. به‌طور کلی، مزیت تولید استفاده از گیاهان بر سایر روش‌های زیستی، در پوشش‌دهی نانوذرات اکسید روی، بی‌خطربودن و قابلیت بالای گیاهان دارویی است.

در پژوهش رفیعی و همکاران [۲۸]، نانوذرات اکسید روی تهیه‌شده همراه با عصاره اکالیپتوس، اثر مهارکنندگی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* نداشت، درحالی‌که اثر مهارکنندگی نانوذرات اکسید روی با عصاره آبی گزنه در غلظت ۰/۲۵۶ گرم/میلی لیتر و $P < ۰/۰۵$، بر نمونه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک، با قطر هاله عدم رشدی معادل ۲۰ میلی‌متر داشت و با تحلیل آماری انجام‌شده، این غلظت، در مقایسه با نمونه کنترل مثبت با $P < ۰/۰۱$، از نظر حساسیت باکتری و قطر هاله عدم رشدی با $P < ۰/۰۵$، اختلاف معناداری از خود نشان داد. رحیمی و همکاران [۲۹]، نانوذرات اکسید روی به همراه گیاه زوفا را سنتز و گزارش کردند که در غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی لیتر این نانوذرات، بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلای*، اثر بازدارندگی داشت. درصورتی که در پژوهش حاضر، نانوذرات اکسید روی/گزنه، در غلظت ۰/۲۵۶ گرم/میلی لیتر و با $P < ۰/۰۵$، اختلاف معناداری در مهارکنندگی استافیلوکوکوس‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک نشان داده بود.

در مطالعه ندافی و همکاران [۳۰]، اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی بر باکتری‌های استاندارد جداشده از مواد غذایی، *سالمونلا انتریتیدیس* و *باسیلوس سرئوس* بررسی شد که نشان داد در غلظت‌های ۱۶ و ۸ گرم/میلی لیتر بر *سالمونلا انتریتیدیس* و غلظت ۱۶ میلی گرم/میلی لیتر بر *باسیلوس سرئوس* مؤثر است. اما در مطالعه حاضر، مشخص شد که تلفیق نانوذرات اکسید روی با عصاره آبی گزنه، در غلظت ۰/۲۵۶ گرم/میلی لیتر بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از زخم‌های دیابتی اثر قابل توجهی داشته است.

در پژوهش‌های مختلف، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی متفاوتی از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داده شده است. در مطالعه یانگ و همکاران [۳۱]، *استافیلوکوکوس اورئوس*ها به افلوکساسیلین، ونکومایسین و ایمی‌پنم مقاوم و به

اگزاسیلین[1]، پنی‌سیلین و سولفامتوکسازول[2] حساس بودند. درصورتی‌که در این پژوهش، بیشترِ *استافیلوکوکوس اورئوس‌ها* به اریترومایسین، آموکسی‌سیلین و ونکومایسین مقاوم بودند و اثردهی نانوذرات اکسید روی/گزنه در برابر باکتری‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک جداسازی شده از زخم‌های دیابتی تاکنون در ایران گزارش نشده است. اسلامی و همکاران [۳۲]، از عفونت‌های پوستی زخم بیماران دیابتی، فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جداسازی شده را ۳۱ درصد گزارش کردند، درحالی‌که در پژوهش حاضر، این فراوانی ٤۰ درصد بود. *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جداسازی شده از زخم‌های دیابتی‌ها، در این پژوهش، ۹۳ درصد به ایمی‌پنم و ۸۷ درصد به سفوکسیتین حساس بودند، درحالی‌که ٤ ایزوله از ۱۲ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جداشده در این پژوهش، ۹۸ درصد به آموکسی‌سیلین، ونکومایسین و اریترومایسین مقاوم بودند. استیونز و همکاران [۳]، نشان دادند که بیشترین اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به *اشرشیاکلای* بود. در پژوهش حاضر، نانوذرات اکسید روی/گزنه به روش شیمیایی مرطوب با اثردهی ۲-مرکاپتواتانول سنتز شد که با توجه به مطالعه دیگران که از طریق هم‌رسوبی، نانوذرات اکسید روی را تهیه کرده بودند، ویژگی یکنواختی ذرات در آن مشهود بود. اثر نانوذرات اکسید روی با پوشش‌دهی گزنه بر *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مقاوم به ۳ آنتی‌بیوتیک، در غلظت ۰/۲۵٦ گرم/میلی لیتر بیشترین اثر مهارکنندگی را نشان داد.

٤- نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که نانوذرات اکسید روی با پوشش‌دهی عصاره آبی گزنه دارای خواص ضدباکتریایی قابل توجهی بر *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک جداسازی شده از زخم‌های دیابتی بیماران بود. با توجه به مقاومت روزافزون باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، داروهای جدیدی که از طریق سنتز سبز تهیه می‌شوند می‌توانند جایگزین درمانی مناسبی، پس از بررسی عدم‌سمّیت آن‌ها در شرایط درون‌تنی باشند. در انتها می‌توان پیشنهاد داد که استفاده از عصاره گیاهی گزنه برای تولید نانوذرات اکسید روی/گزنه، به‌دلیل صرفه اقتصادی و خاصیت ضدباکتریایی قوی، می تواند جهت پیشگیری و بهبود زخم‌های دیابتی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک استفاده شود.

[1] Oxacillin
[2] Sulfamethoxazole

۵- سپاسگزاری

این پژوهش حاصل بخشی از رساله دکتری رشته میکروبیولوژی با کد ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۷۲۰۱۹ است که در آزمایشگاه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان انجام شده است. نویسندگان مقاله از مسؤولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی این دانشگاه، به‌دلیل حمایت‌های اجرایی، کمال تشکر و امتنان را دارند.

مراجع

1. Yu, B., Leung, K. M., Guo, Q., Lau, W. M., Yang, J., "Synthesis of Ag-TiO_2 composite nano thin film for antimicrobial application", ***Nanotechnology***, Vol. 22, No. 11, (2011), 115603. https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/11/115603
2. Moghanian, A., Zohour Fazeli, M. A., "Investigation the in vitro and bacterial properties of magnesium and copper containing bioactive glasses", ***Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)***, Vol. 9, No. 2, (2020), 19-33. (In Farsi). https://doi.org/10.30501/JAMT.2020.195763.1041
3. Stevens, E., Laabei, M., Gardner, S., Somerville G. A., Massey, R. C., "Cytolytic toxin production by *Staphylococcus aureus* is dependent upon the activity of the protoheme IX farnesyltransferase", ***Journal of Scientific Reports***, Vol. 7, (2017), 137-144. https://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-14110-8
4. Bonnmain, B., "Superparamagnetic agents in Magnetic Resonance Imaging: Physiochemical characteristics and clinical cpplications, A review", ***Journal of Drug Target***, Vol. 6, No. 3, (1998), 167-174. https://doi.org/10.3109/10611869808997890
5. Aruoja, V., Dubourguier, H. C., Kasemets, K., Kahu, A., "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO_2 to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*", ***Sciences of the Total Environment***, Vol. 407, No. 4, (2009), 1461-1468. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053
6. Mirhosseini, M., Firouzabadi, B. F., "Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens", ***International Journal of Dairy Technology***, Vol. 66, No. 2, (2013), 291-295. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12015
7. Dimkpa, Co., Alyssa, C., Britt, D. W., Mclean, J. E., Anderson, A. J., "Responses of a soil bacterium, *Pseudomonas chlororephis* O_6 to commercial metal oxide nanoparticles compared with responses to metal ions", ***Environmental Pollution***, Vol. 159, No. 7, (2011), 1749-1756. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.020
8. Sharp, A., Clark, J., "Diabets and its impact on wound healing", ***Journal of Nursing Standard***, Vol. 25, (2011), 45-47. https://doi.org/10.7748/ns2011.07.25.45.41.c8626
9. Das, M., Sarma, B. P., Rokeya, B., Parial, R., Nahar, N., Mosihuzzaman, M., "Antihyperglycemic and anti hyperlipidemic activity of *Urtica dioica* on type 2 diabetic model rats", ***Journal of Diabetology***, Vol. 2, (2011), 2. https://www.juornalofdiabetoilogy.org/

10. Rigato, M., Pizzol, D., Tiago, A., Putoto, G., Avogaro, A., Fadini, G. P., "Characteristics, prevalence, and outcomes of diabetic foot ulcers in Africa: A systemic review and meta-analysis", ***Journal of Diabetes Research and Clinical Practice***, Vol. 142, (2018), 63-73. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.05.016
11. Mueller, N. C., Nowack, B., "Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment", ***Environmental Science and Technology***, Vol. 42, (2008), 4447-4453. https://doi.org/10.1021/es7029637
12. Imani, S., Zagari, Z., Rezaei-Zarchi, S., Zand, A. M., Dorodiyan, M., Bariabarghoyi, H., Lotfi, F., "Antibacterial effect of CrO and Co Fe_2O_4 nanoparticles upon *Staphylococcus aureus*", ***Journal of Fums***, Vol. 3, (2021), 1-83. (In Farsi). www.fums.ac.ir
13. Shen, G. H., Wang, J. L., Wen, F. S., Chang, K. M., Kuo, C. F., "Isolation and characterization of φkm18p, a novel lytic phage with *Acinetobacter baumanni*", ***US National Library of Medicine, National Institues of Health***, Vol. 10, (2012), e46537. https://doi.org/10.1371/j.pone.0046537
14. Mohammed-Ali, M. N., Jamalludeen, N. M., "Isolation and characterization of bacteriophage against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*", ***Journal of Medicin Microb Diagnostic***, Vol. 5, No. 1, (2015), 1000213. https://dx.doi.org/10.4172/2161-0703.1000213
15. Wenru, L. I., "Antibacterial activity and mechanism of Silver nanoparticles on *Esherichia coli*", ***Applied Journal Microbiology and Biotechnolgy***, Vol. 85, (2010), 1115-1122. https://doi.org/10.1007/S00253-009-2159-5
16. Koosha, R. Z., Fooladi, A. A. I., Hosseini, H. M., Aghdam, E. M., "Prevalence of exfoliative toxin A and B genes in *Staphylococcus* Of action", ***Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences***, Vol. 91, No. 3, (2001), 453-462. https://doi.org/10.1064/j.1365-2672.2001.01428.x
17. Khakpour, Z., Pourfarahani, H. A., Maghsoudipour, A., Ebadzadeh, T., "Hydrothermal synthesis of hematite nanoparticles doped with (Ti and Sn) and deposition on FTO", ***Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)***, Vol. 7, No. 3, (2018), 11-18. (In Farsi). https://doi.org/10.30501/JAMT.2018.91737
18. Taheri–Nassaj, E., Khajelakzay, M., "Synthesis of lead titanate ziconate nano powders via sol-gel process and investigation of dielectric properties of the sintered pellets", ***Journal of Advanced Materials and Technologies (JAMT)***, Vol. 2, No. 1, (2013), 49-54. (In Farsi). https://doi.org/10.30501/JAMT.2634.70178
19. Yousefi, H., Jannesari, M., Khosravi, A., Mokhtari, A., Khani, O., "Synthesis of ZnS: Fe semiconductor nanoparticles and investigation of their physical and optical properties", (1385). www.SID.ir
20. Shariat, E., Hoseini, H., Porahmad, R., "Antibacterial aqueous extract of *Urtica diocia* and marjoram against *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*", ***Journal of Innovation in Food Science and Technology***, Vol. 4, No. 4, (2010). (In Farsi). http://10.18869/acadpub/Sjimu.24.370
21. Richard, J. L., Sotto, A., Lavigne, J. P., "New insights in diabetic foot infection", ***Journal of World Diabetes***, Vol. 2, No. 2, (2011), 24-32. http://dx.doi org/10.4239/wjd.v2.i2.24. PMid: 21537457
22. Ahmadi, Z., Tajbakhsh, E., Momtaz, H., "Detection of the antibiotic resistance pattern in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples obtained from patients hospitalised in Imam Reza Hospital, Kermanshah", ***Journal of Microbial World***, Vol. 6, No. 4, (2014). (In Farsi). www.SID.ir
23. Nathwani, D., "Health economic issues in the treatment of drug–resistant serious gram–positive infection", ***Journal of the Infect***, Vol. 59, No. 1, (2009), S-40-50. https://doi.org/10.1016/S0163-4453 (09)60007-4
24. Oliveira, A. F., Filho, H. O., "Microbiological species and antimicrobial resistance profile in patients with diabetic foot infections", ***Journal Vascular Brasileiro***, Vol. 13, No. 4, (2014), 289-293. https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12161
25. Voicu, G., Oprea, O., Vasile, B. S., Andronescu, E., "Photoluninescence and photocatalytic activity of Mn-doped ZnO nanoparticles", ***Digest Journal of Nanomateirals and Biostructures***, Vol. 8, (2013), 667-675. https://doi.org/10.21467/anr.3.1.28-39
26. Hossaini, F., Khanaferi, A., ***Practical Mcrobiology***, 1th ed., edited by: Poursina, Danesh Fajr, (2001). (In Farsi).
27. Vicentini, D. S., Smania, A. J. R., Laranjeira, M. C. M., "Chitosan/poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers", ***Journal of Materials Science and Engineering,*** Vol. 30, (2010), S0928-4931. https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.01.026
28. Rafiee, B., Ghani, S., Sadeghi, D., Ahsani, M., "Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using eucalypteus mellidora leaf extract and evaluation of its antimicrobial effects", ***Journal of Babol University of Medical Sciences,*** Vol. 10, (2018). (In Farsi). http://www.jbums.org/article-1-7738
29. Rahimi, K. S., Homayouni, M., Ardalan, T., "Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles synthesized by the green method from Hyssopus officinail Extract", ***Journal of Yafteh,*** Vol. 4, (2019), 107-115. (In Farsi). http://www.yafte.lums.ac.ir/article-1
30. Naddafi, S. H., Soltan Dalla, M. M., Partoazar, A., Dargahi, Z., "Antibacterial activity of ZnO nanoparticles on standard and isolated strains of *Salmonella enteritidis* and *Bacillus cereus* associated with Iranian foods", ***Journal of Gorgan University of Medical Sciences***, Vol. 22, No. 2, (2020), 82-88. (In Farsi). http://goums.ac.ir/journal/article-1-3627-en.html
31. Yoong, P., Pier, G. B., "Immune-activating properties of panton-valentine leukocidin nanoparticles and plasticizers", ***Journal of Materials Science*** **and** ***Engineering***, Vol. 80, No. 2, (2012), 2894-2904. https://doi.org/10.1128/IAI.06360-11
32. Eslami, G., Taheri, S., Nalchi, F., Baseri, N., Samadi , R., Azar-Gashb, A., "The effect of bacteria that cause skin infections and their antibiotic resistance pattern in patients referred to Shohada, Loghman Hospitals in 2007-2008", ***Journal of Research in Medicin,*** Vol. 36, No. 4, (2009), 215-210. (In Farsi). http://www.pejouhesh.sbmu.ac.ir