

Effects of Biosynthesized Zinc and Copper Nanoparticles on Medicine Resistant Pathogenic Bacteria(Antibiotics)

Yasman Elsadat Nabipour¹ , Arman Rostamzad^{2*} , Ardeshir Hesampour¹ , Maryam Tajabadi¹ , Salman Ahmadi Asbchin³ 

¹ Dept of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Ilam University, Ilam, Iran

³ Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Mazandaran University, Mazandaran, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: 27 December 2021

Revised: 13 March 2022

Accepted: 16 May 2022

Published Online: 23 November 2022

* Correspondence to:

Arman Rostamzad

Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Ilam University, Ilam, Iran.

Email:

a.rostamzad@ilam.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: In this study, the antimicrobial activity of biologically synthesized zinc (Zn) and copper (Cu) nanoparticles was investigated on gram-positive and gram-negative bacteria, pathogens, and resistant and common nosocomial infections.

Material & Methods: Initially, zinc oxide and copper nanoparticles were synthesized using *Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas stutzeri* bacteria, respectively. To investigate the effect of different concentrations of nanoparticles on bacteria using the macrodilution method, concentrations of 0.01, 0.1, 0.5, 1, and 1.5% of Zn and Cu nanoparticles (culture medium + nanoparticles) were prepared and were added to the respective bacteria at a concentration of 10⁵ cell/ml. Containers containing treated media (bacteria + nanoparticles) and control media were placed in a shaker incubator. Afterward, the optical density (OD) of treatment and positive control and negative control media were determined.

(Ethical code: IR.ILAM.REC.1401.008)

Findings: The results of statistical analysis showed that Zn and Cu nanoparticles, at a concentration of 0.5%, were able to remove almost all (100%) *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* bacteria and were bacteriostatic at the concentration of 0.1%.

Discussion & Conclusion: The results obtained from the determination of antibacterial properties of nanoparticles showed a direct relationship between the concentration of nanoparticles and the percentage of bacterial removal.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Bacteriostatic, *Klebsiella pneumoniae*, Macrodilution, Nanoparticle, *Pseudomonas stutzeri*, *Xanthomonas campestris*, *Staphylococcus aureus*

➤ How to cite this paper

Nabipour YE, Rostamzad A, Hesampour A, Tajabadi M, Ahmadi Asbchin S. Effects of Biosynthesized Zinc and Copper Nanoparticles on Medicine Resistant Pathogenic Bacteria(Antibiotics). Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(5): 40-50.



بررسی آثار نانو پارسیکل‌های روی و مس سنتز شده به روش زیستی بر باکتری‌های پاتوژن مقاوم به دارو (آنتی بیوتیک)

یاسمن السادات نبی پور^۱، آرمان رستم‌زاد^۲، اردشیر حسام‌پور^۱، مریم تاج‌آبادی^۱، سلمان احمدی اسب‌پین^۳

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

^۳ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، مازندران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۶

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۶

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۹/۰۲

مقدمه: در این تحقیق کارایی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات Cu و Zn سنتز شده به روش زیستی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زای مقاوم در عفونت‌های بیمارستانی بررسی گردید. **مواد و روش‌ها:** نانوذرات اکسید روی با استفاده از باکتری زانتوموناس کمپستریس و نانوذرات مس و با استفاده از باکتری سودوموناس استوتزری سنتز شدند. برای تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات بر باکتری‌ها، به روش ماکرودایلوشن غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد از نانوپارسیکل‌های روی و مس (محیط کشت+نانوذرات) تهیه و به غلظت ۱۰^۵ cell/ml از هریک از باکتری‌های بررسی شده اضافه گردید. ظروف حاوی محیط کشت‌های تیمار (باکتری+نانوذرات) و محیط‌های کشت کنترل در انکوباتور شیکر قرار داده شدند؛ سپس OD محیط‌های تیمار و کنترل مثبت و کنترل منفی تعیین گردید.

یافته‌ها: در نتایج آنالیز آماری مشخص شد، نانوپارسیکل‌های Cu و Zn با غلظت ۰/۵ درصد قادر به حذف تقریباً ۱۰۰ درصد باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه، اسیتوباکتر بومانی و استافیلوکوکوس اورئوس هستند و غلظت ۰/۱ درصد برای هر سه باکتری باکتریواستاتیک بود. **بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج به‌دست‌آمده از تعیین خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نشان داد که میان غلظت نانوذره و درصد حذف باکتری ارتباط مستقیم وجود دارد.

نویسنده مسئول:

آرمان رستم‌زاد

گروه زیست‌شناسی، دانشکده

علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام،

ایران

Email:

a.rostamzad@ilam.ac.ir

واژه‌های کلیدی: اسیتوباکتر بومانی، استافیلوکوکوس اورئوس، باکتریواستاتیک، زانتوموناس کمپستریس، سودوموناس استوتزری، کلبسیلا پنومونیه، ماکرودایلوشن، نانوپارسیکل

← **استناد:** نبی پور، یاسمن السادات؛ رستم‌زاد، آرمان؛ حسام‌پور، اردشیر؛ تاج‌آبادی، مریم؛ احمدی اسب‌پین، سلمان. بررسی آثار نانوپارسیکل‌های روی و

مس سنتز شده به روش زیستی بر باکتری‌های پاتوژن مقاوم به دارو (آنتی بیوتیک). مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دی ۱۴۰۱؛ ۳۰(۵): ۴۰-۵۰.

مقدمه

نانوفناوری دانشی کاربردی و نوعی فناوری است که زمینه‌های متفاوتی را شامل می‌شود. زمینه اصلی نانوفناوری تولید مواد یا ابزارهایی در ابعاد کمتر از صد نانومتر است. کاهش اندازه در یک یا چند بعد باعث ایجاد ویژگی‌های جدید نسبت به شکل توده‌ای آن‌ها است (۱). جهش‌های باکتریایی، مقاومت دارویی به آنتی‌بیوتیک‌ها و شیوع سویه‌های بیماری‌زا ضرورت توسعه ترکیبات ضد میکروبی کارآمدتر و درمان‌های جایگزین را ایجاد می‌کند (۲). نانوذرات را می‌توان نسل جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌های آینده به شمار آورد (۳).

فرضیه‌های ارائه شده درباره خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسیدهای فلزی شامل تخریب دیواره سلول میکروبی، تجزیه اسیدهای نوکلئیک و آنزیم‌ها در سلول میکروب است. به منظور بهبود ویژگی‌های مختلف نانوذرات اکسیدهای فلزی، سایر عناصر در ساختار این ترکیبات به روش‌های مختلف شیمیایی وارد می‌شود که در نتیجه، خصوصیات مختلف این نانوذرات تغییر می‌یابد (۴).

مس یکی از فلزات سنگین است که از راه‌های مختلف مانند آبکاری، استخراج معادن، ذوب مواد معدنی و فلزات، تولید لوازم الکتریکی و... وارد پساب می‌گردد و توسط میکروارگانیسم‌هایی که مقاوم به فلز هستند، جذب می‌شود و بعضی از اوقات، نانوذرات فلزی با اشکال، اندازه و ساختارهای مختلفی را تولید می‌کند (۵).

نانواکسید روی ماده‌ای ضدالتهاب برای پوست سوخته است (۶). عنصر روی باعث ترمیم اپیدرم پوست می‌گردد و آثار باقی‌مانده از زخم‌های ناشی از سوختگی را کاهش می‌دهد. نانواکسید روی باعث بسته شدن زخم‌های حاصل از سوختگی می‌شود (۷).

نانوذرات اکسید مس (CuO) اخیراً به عنوان یک ماده ضد میکروبی مدنظر قرار گرفته‌اند. ویژگی‌های باکتری‌کشی نانوذرات وابسته به اندازه آن‌ها، پایداری

و غلظت استفاده شده به عنوان ماده ضد باکتریایی است. نانوذرات به شدت یونی اکسید مس می‌توانند در مورفولوژی‌های کریستالی و با سطح ویژه بالا سنتز شوند (۸).

کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella pneumoniae*) باکتری گرم منفی‌ای است که باعث ایجاد بیماری‌هایی با منشأ بیمارستانی از جمله پنومونی، عفونت مجاری ادراری، عفونت خونی و عفونت زخم می‌گردد (۱۴). انسان میزبان اولیه کلبسیلا پنومونیه است. در عموم جوامع، ۱۳-۵ درصد افراد این ارگانیسم را در مدفوع و ۶-۱ درصد افراد در ناحیه حلق دارند (۹). پنومونی ناشی از کلبسیلا پنومونیه به طور کلی، تقریباً ۱۱-۸ درصد از کل پنومونی بیمارستانی را در جهان تشکیل می‌دهد (۱۰).

اسیتوباکتر بومانی (*Baumannii Acinetobacter*) از شایع‌ترین پاتوژن‌های مهم و مؤثر در ایجاد عفونت‌های جدی ICU دستگاه‌های بیمارستانی پیشرفته جهان است و تهدیدی جدی برای سلامت عمومی و بیماران محسوب می‌شود (۱۲، ۱۱).

در میان گونه‌های اسیتوباکتر، این پاتوژن فرصت‌طلب بیمارستانی، طیف وسیعی از عفونت‌ها نظیر سپتی‌سمی (Septicemia) و پنومونی (Pneumonia) را ایجاد می‌کند و در گذر زمان و به ویژه چند دهه اخیر، به چالش بزرگ علوم پزشکی تبدیل شده است و حتی در محیط‌های معمولی آزمایشگاهی نیز به آسانی رشد می‌نماید (۱۳).

به واسطه مقاومت ذاتی یا ایجاد شده نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، مشکلات فراوانی نیز در درمان موفقیت‌آمیز عفونت‌های ناشی از اسیتوباکتر و حتی عفونت‌های غیرقابل درمان در بیماران بستری ایجاد کرده و در پی آن، مرگ‌ومیر فراوانی را رقم زده است (۱۴). بر اساس این، سازمان بهداشت جهانی از اسیتوباکتر به عنوان یکی از پاتوژن‌های باکتریال تهدیدکننده سلامت انسان یاد کرد (۱۵).

تهیه مواد و محیط کشت باکتری: برای بررسی سایزبندی نانوذرات، عکس TEM به وسیله میکروسکوپ الکترونی فیلیس مدل H987 گرفته شد تا سایز نانوذرات تأیید گردد. قطر نانوذرات استفاده شده در این تحقیق Zn: 20nm و Cu: 20nm بود. برای توزیع نانوذرات در محیط کشت، محلول نانوذرات پیش از مصرف در شیکر قرار داده شد و پس از تلقیح نیز کشت در انکوباتور شیکردار صورت می‌گرفت؛ همچنین مقدار نانوذرات تلقیح شده به اندازه‌ای نبود که رسوب بدهد یا توزیع یکنواخت نداشته باشد.

در این تحقیق از محیط پیچیده (LB Complex Lauria Bertani) برای رشد و محیط شاهد و نگهداری باکتری استفاده گردید؛ همچنین سه سویه پاتوژن استاندارد ذیل بررسی شدند. این سویه‌ها از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفلیزه تهیه گردیدند:

1. Staphylococcus Aureus (ATCC 29213)
2. Klebsiella pneumoniae (NCTC 5056)
3. Acinetobacter baumannii (PTCC 1797)

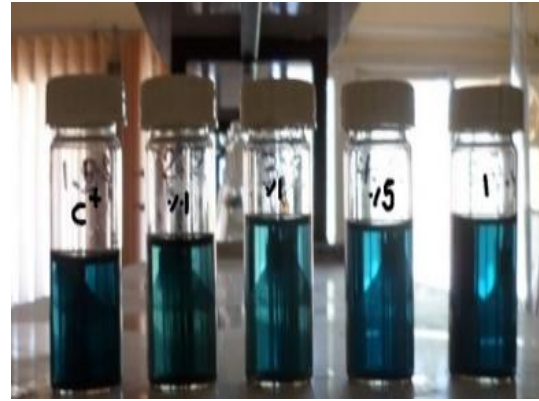
سنتز نانوذره اکسید روی: ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع YEDP ساخته می‌شود و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل می‌گردد. از پلیت‌های کشت جامد خالص، چند کلونی زانتوموناس کمپستریس PTCC1473 به محیط کشت مایع YEDP تلقیح می‌شود و سپس به مدت ۲۴ ساعت، محیط کشت در شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و چرخش ۱۳۰ دور در دقیقه قرار می‌گیرد تا باکتری مدنظر کاملاً رشد کند. pH محیط کشت پس از رشد به ۵/۵ می‌رسد؛ سپس محیط کشت نوترینت برات ۴ مرتبه رقیق‌سازی می‌گردد و برای رشد بیشتر باکتری، محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت دیگر در شیکر انکوباتور قرار داده می‌شود. دانسیته نوری محیط کشت باکتری رشد کرده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (CHROMTECH UV-VIS ساخت

اسیتوباکتر بومانی عامل اصلی ذات‌الریه بیمارستانی (acquired-Hospital pneumonia)، عفونت‌های اداری، باکتری، عفونت پس از عمل جراحی و پنومونی ایجاد شده به دنبال ونتیلاسیون (Ventilator associated pneumonia) است. پژوهشگران و متخصصان قلمرو اسیتوباکتر با توجه به چالش‌ها، بحران‌ها و تأثیر جهانی مسئله‌ای که پاتوژن اسیتوباکتر بومانی ایجاد کرده است، همواره در زمینه‌های مختلف اپیدمیولوژی، پیشگیری و کنترل، گزینه‌های جدید درمانی، مسائل بالینی، غلبه بر عفونت ناشی از این میکروارگانیسم و خصوصیات مولکولی عفونت‌های اسیتوباکتر، پژوهش‌ها و مطالعات گسترده‌ای را انجام داده‌اند (۱۶).

یکی از باکتری‌هایی که هم عامل بیماری‌های اکتسابی و هم بیمارستانی است و در سوختگی‌ها هم باعث عفونت زخم‌ها می‌شود، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (Staphylococcus aureus) است که با وجود داروهای موضعی و سیستمیک برای کاهش عفونت، همچنان درمان آن با مشکلاتی همراه است. استافیلوکوکوس اورئوس نوعی پاتوژن درون سلولی و برون سلولی شناخته شده است که میتواند درون ماکروفاژها وارد شود و از نابود شدن توسط سیستم ایمنی مصون بماند (۱۷). متأسفانه در بیش از ۵۰ درصد از موارد، استافیلوکوکوس اورئوس‌ها به متی‌سیلین مقاوم هستند. استافیلوکوکوس اورئوس مسئول اصلی شمار زیادی از عفونت‌های حاد بیمارستانی است و به عنوان تهدیدی برای سلامت عمومی شناخته میشود. این باکتری به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است (۱۸).

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ابتدا نانوذرات تهیه شد و سپس اثر آن‌ها در رقت‌های مختلف (۰/۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۱/۵ درصد)، بر باکتری‌های پاتوژن کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و اسیتوباکتر بومانی بررسی گردید.



شکل شماره ۱. تأثیر رقت‌های مختلف نانوپار تیکل Cu بر باکتری‌های پاتوژن کلبسیلا پنومونه

کشور تایوان) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، حدود ۰/۳ اندازه‌گیری شد. پس از گرمخانه‌گذاری، pH به وسیله سود ۰/۴ مولار روی ۷ تنظیم می‌گردد. دانستن pH مخلوط واکنش مهم است؛ زیرا نقش مهمی در فرایند سنتز و کنترل شکل و اندازه نانوذرات ایفا می‌کند (۱۹ و ۲۰). ۱۰ میلی‌لیتر محلول نیترات روی ۰/۱ مولار تهیه و استریل می‌شود؛ سپس به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت باکتری اضافه می‌گردد. محلول حاصل در حمام آب گرم ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ - ۵ دقیقه حرارت داده می‌شود. طی حرارت دادن، رسوب سفیدرنگی در انتهای ارلن ظاهر می‌گردد و این نشان‌دهنده آغاز تولید نانوذرات اکسید روی است (شکل شماره ۱).

محیط کشت باکتری بدون محلول نمکی به‌عنوان کنترل مثبت و محلول نمکی نیترات روی بدون محیط کشت باکتری به‌عنوان کنترل منفی در شرایط یکسان آزمایش و حرارت‌دهی شد که بدون رسوب سفیدرنگ مشاهده‌شده در ارلن محیط کشت و نمک مدنظر در این آزمایش بود. ارلن از حمام آب گرم خارج می‌شود و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و چرخش ۱۳۰ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور قرار گذاشته می‌شود تا همه نانوذرات شروع به رسوب کنند. محصول حاصل در چرخش ۳۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ

می‌گردد و سپس ۳ بار با آب دیونیزه شستشو داده می‌شود. پس از آن، رسوبات حاصل در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در آون خشک می‌گردد. پودر حاصل در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت، به‌منظور حذف بقایای باکتری و مواد آلی کلسینه می‌شود (۲۱، ۲۲).

سنتز نانوذره اکسید مس: برای تولید نانوذرات مس، باکتری سودوموناس استوتزری (Pseudomonas stutzeri ATCC 17588) در محیط تربیک سوی براث، در ارلن‌های ۱۰۰ سی‌سی کشت داده و در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از رشد، محلول به‌وسیله سانتریفیوژ در سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه، به مدت ۳۰ دقیقه از محیط کشت جداسازی گردید؛ سپس به ۵۰ میلی‌لیتر از مایع رویی به‌دست‌آمده به میزان ۴۰ میکرولیتر نیترات مس با رقت ۱۰^{-۵} افزوده شد (برای تهیه رقت موردنیاز نیترات مس، ابتدا نیترات مس یک مولار را تهیه می‌کنند؛ سپس از آن رقت‌های موردنیاز بر اساس وزن مولکولی به‌دست می‌آید) و درنهایت، نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. تجمع ذرات نانو با تغییر رنگ محیط کشت بررسی گردید. برای شاهد مثبت، محیط کشت استریل به همراه نیترات مس و برای شاهد منفی، محیط کشت همراه با باکتری بودند. برای تهیه نمونه‌ها، به میزان ۱۰ سی‌سی از محیط کشت برداشته شد و در سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید؛ سپس با آب مقطر دیونیزه و اتانول ۹۸ درصد به مدت ۲۰ دقیقه دو بار شستشو داده شد و سوپرناتانت (محلول رویی) برای انجام آزمون‌های تأییدی و بررسی تولید نانوذره مس جدا و خشک گردید تا به‌صورت پودر درآید.

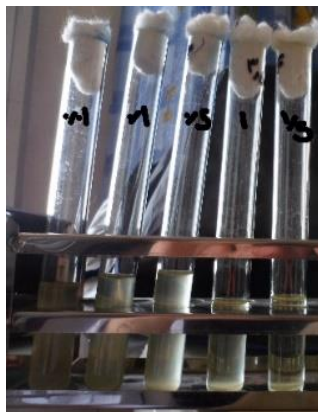
تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات بر باکتری‌ها در

طول موج ۶۰۰nm برای اندازه‌گیری غلظت باکتری‌ها استفاده شد. محیط‌های تیمار و کنترل مثبت و کنترل منفی، به ترتیب در کوئیت‌های شیشه‌ای مخصوص دستگاه ریخته و OD تعیین شدند. از رقت‌های نانوذرات در محیط کشت باکتری برای کالیبر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر، به‌عنوان محلول بلنک (شاهد) استفاده گردید. این آزمایش سه مرتبه تکرار شد و میانگین نتایج گزارش گردید.

عکس‌ها توسط دوربین دیجیتال Olympus C2020Z گرفته شد. نتایجی که در همه آزمایش‌ها به‌دست آمد، با گروه کنترل مقایسه گردید. از آزمون آماری ANOVA برای تعیین معنی‌داری ($P < 0.01$) نتایج آزمایش‌ها و ارزیابی آن‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

تأثیر نانوذرات (Cu) بر باکتری‌های بررسی‌شده در محیط LB، با توجه به آنالیز آماری چگالی نوری حاصل از اسپکتروفتومتری محیط‌های تیمار مشخص شد که غلظت ۰/۰۱ درصد از نانوذرات Cu هیچ اثر آنتی‌باکتریال چشمگیری بر باکتری‌های مطالعه‌شده ندارد؛ اما غلظت‌های ۰/۱ درصد و ۰/۵ درصد آثار مهاری بسیار فراوانی بر رشد و تعداد باکتری‌های گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل دارد (شکل شماره ۲، جدول شماره ۱).



شکل شماره ۲. تأثیر رقت‌های مختلف نانوپارابتیک Zn بر باکتری‌های پاتوژن کلبسیلا پنومونه

محیط ماکرودیلوشن: ابتدا محیط کشت (LB) سنتز و استریل شد. پس از آن، ذرات نانو به‌وسیله ترازوی الکترونیکی در وزن‌های ۰/۰۱g، ۰/۰۱g، ۰/۰۵g، ۰/۱g، ۰/۱۵g توزین گردید و با اضافه کردن این ذرات به ۱۰ml از محیط کشت مایع (LB)، غلظت‌های ۰/۰۱ درصد، ۰/۱ درصد، ۰/۵ درصد، ۱ درصد و ۱/۵ درصد از نانوپارابتیک‌های Zn و Cu به‌صورت سوسپانسیون تهیه شد.

دوباره برای استریل کردن محیط به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و در فشار ۱۵ پوند (۱۵Lb) در اتوکلاو خودکار قرار داده و سپس برای خنک شدن در یخچال نگه داشته شد. برای تهیه کشت تازه باکتری‌های کلبسیلا پنومونه، استافیلوکوکوس اورئوس و اسینتوباکتر بومانی از محیط کشت مولر هینتون آگار (Merck)، ۳۴ گرم در یک لیتر آب مقطر استفاده شد (۲۳).

به‌منظور تهیه سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک‌فارلند، یک لوپ از هر سویه میکروبی به ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت (LB) اضافه گردید. در مرحله بعد، به‌وسیله دستگاه اسپکت غلظت دارای چگالی نوری (OD) ۰/۰۵ در طول موج ۶۰۰ nm تهیه شد تا یک غلظت نهایی ۱۰۵ cell/ml در هر میلی‌لیتر از هر یک از نمونه‌ها به‌دست آید.

در مرحله بعد، به‌وسیله سمپلر، ۲ ml از رقت تهیه‌شده از هر یک از باکتری‌ها به غلظت‌های آماده‌شده (محیط کشت+نانوذرات) اضافه گردید و همین مراحل برای تهیه گروه کنترل مثبت به‌کار رفت، با این تفاوت که نانوذرات به محیط کشت اضافه نشد. از محیط کشت بدون باکتری به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. در ظروف حاوی محیط کشت‌های تیمار (باکتری+نانوذرات) و محیط‌های کشت کنترل بسته شد و در انکوباتور شیکر با ۲۵۰ دور در دقیقه، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت گردید.

پس از طی شدن مدت یادشده، از چگالی نوری در

جدول شماره ۱. تغییرات چگالی نوری باکتری‌های بررسی شده، حاصل از تأثیر رقت‌های مختلف نانوپار تیکل Cu در محیط LB

Cu	C	۰/۰۱	۰/۱	۰/۵	۱	۱/۵
K	۱/۱۱۵	۱/۱۰۴	۰/۲۷۵	۰/۰۶۵	۰/۰۳۴	۰/۰۰۹
A	۱/۲۰۳	۱/۱۵۰	۰/۳۷۶	۰/۰۹۲	۰/۰۴۷	۰/۰۰۹
S	۱/۲۵۰	۱/۰۱۰	۰/۲۰۴	۰/۰۴۳	۰/۰۲۸	۰/۰۰۷

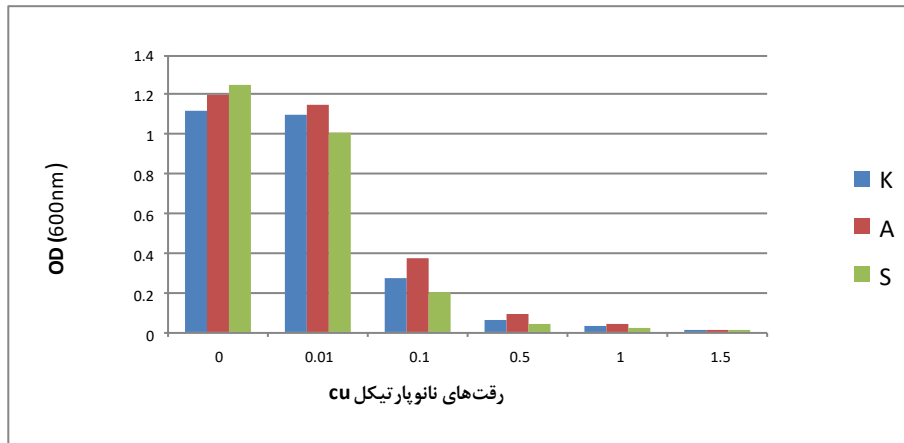
درصد Cu، به میزان ۶۹ درصد کاهش رشد داشت که نسبت به باکتری‌های دیگر، کمترین حساسیت و بیشترین مقاومت را نشان می‌دهد؛ همچنین این باکتری در غلظت ۰/۵ درصد نانو Cu، ۷۲ درصد نسبت به گروه کنترل مثبت، کاهش رشد نشان می‌دهد که نسبت به غلظت ۰/۱ درصد، تفاوت چندانی در مرگ باکتری‌ها نداشته است؛ اما غلظت ۱ درصد Cu بر این باکتری مؤثر و میزان باکتری‌سیدی بسیار بالا بود و نسبت به گروه کنترل، ۹۲ درصد باکتری‌ها از بین رفته‌اند. نتایج به‌دست‌آمده از تعیین خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نشان داد که میان غلظت نانوذرات و درصد حذف باکتری ارتباط مستقیم وجود دارد.

این نتایج از لحاظ آماری معنی‌دار است ($P < 0.01$). بر اساس داده‌های به‌دست‌آمده مشخص شد که درصد حذف باکتری‌های بررسی شده به‌وسیله نانوذرات مختلف، متفاوت است (نمودار شماره ۱ و جدول شماره ۱).

تأثیر نانوذرات (Zn) بر باکتری‌های بررسی شده در محیط LB، با توجه به آنالیز آماری چگالی نوری حاصل از اسپکت محیط‌های تیمار مشخص شد که غلظت ۰/۰۱ درصد از نانوذرات Zn هیچ اثر آنتی‌باکتریال چشمگیری بر باکتری‌های مطالعه شده نداشت؛ اما غلظت‌های ۰/۱ درصد و ۰/۵ درصد آثار مهاری بسیار فراوانی بر رشد و تعداد باکتری‌های گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل داشتند. در غلظت ۰/۵ درصد، میزان باکتری‌سیدی نانوذرات Zn بسیار قوی بود و تقریباً به ۱۰۰ درصد می‌رسد. غلظت ۰/۱ درصد این نانوذرات باکتریو استاتیک است. این نانوذره در غلظت ۰/۱ درصد بیشترین اثر بازدارندگی را بر باکتری استاف اورئوس دارد و این باکتری را به

غلظت ۰/۵ درصد نانوذره Cu برای هر سه باکتری باکتری‌سیدال بود و باکتری‌ها به میزان بیش از ۸۰ درصد از بین رفتند. به همین صورت با افزایش غلظت نانوذره Cu، میزان تأثیر باکتری‌سیدی افزایش می‌یابد. در غلظت ۰/۵ درصد، میزان کشندگی نانوذرات Cu نسبت به گروه کنترل، در باکتری‌های کلبسیلا ۹۱ درصد و در استاف اورئوس ۷۲ درصد بود. در این غلظت نیز، نانوذره Cu بر باکتری اسپینتوباکتر بومانی بیشترین تأثیر را داشت، به طوری که نسبت به گروه کنترل، این باکتری ۹۴ درصد کاهش رشد را نشان می‌دهد؛ همچنین نانوذرات Cu در غلظت ۰/۱ درصد، قادر به حذف ۷۶ درصد باکتری کلبسیلا، ۶۹ درصد باکتری استاف و ۸۳ درصد باکتری اسپینتوباکتر بومانی شده است. در مجموع، نانوذره Cu بر باکتری اسپینتوباکتر بومانی بیشترین تأثیر را داشت، به طوری که در غلظت ۰/۱ درصد، این باکتری ۸۳ درصد و در غلظت ۰/۵ درصد، ۹۴ درصد کاهش رشد را نشان می‌دهد. علاوه بر این، اثر نانوذره Cu بر باکتری اسپینتوباکتر بومانی در غلظت ۱ درصد، به میزان ۹۸ درصد خاصیت باکتری‌سید داشت. این نتیجه اندکی با نتایج مطالعه آدامز و همکاران متفاوت بود، به طوری که طی مطالعه آنان، غلظت بازدارنده رشد در ۴۸ درصد گونه‌های اسپینتوباکتر بومانی در غلظت ۱۰۰۰ mg/L از نانوذره Cu به‌دست آمد (۲۴). علت اصلی تفاوت در دو مطالعه می‌تواند اندازه نانوذرات و شرایط کشت باکتری و تفاوت‌های سویه‌ای باشد، به طوری که مشخص شده است که اندازه نانوذرات در سمیت آن‌ها تأثیرگذار است (۲۵).

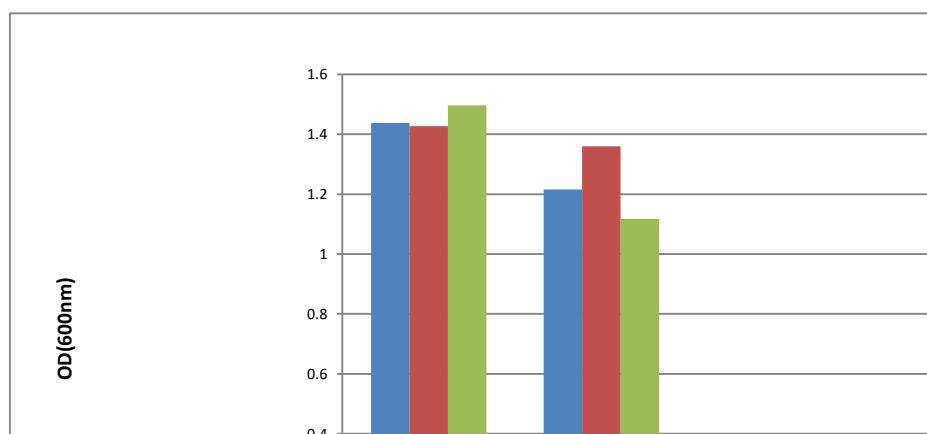
کمترین تأثیر نانوذره Cu بر باکتری استاف اورئوس مشاهده شد، به طوری که این باکتری در غلظت ۰/۱



نمودار شماره ۱. تأثیر رقت‌های مختلف نانوپارتيکل Cu بر باکتری‌های پاتوژن کلبسیلا پنومونیه (K)، استافیلوکوکوس اورئوس (S) و اسیتوباکتر بومانی (A) در محیط LB

MIC، برای هر باکتری میزان تنفس به پایین‌ترین حد خود می‌رسد (26). نتایج به دست آمده از تعیین خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات Zn نشان داد که میان غلظت نانوذرات و درصد حذف باکتری ارتباط مستقیم وجود دارد (نمودار شماره ۲ و جدول شماره ۲). با افزایش درصد غلظت نانوذرات، میزان فعالیت باکتریسیدی اضافه گردید که با مطالعات پیشین مطابقت دارد. این نتایج از لحاظ آماری معنادار است ($P < 0.01$).

میزان ۹۲ درصد از بین می‌برد. کمترین تأثیر نانوذره Zn بر باکتری اسیتوباکتر بومانی بود، به طوری که در غلظت ۰/۱ درصد نانو Zn، این باکتری به میزان ۷۲ درصد کاهش رشد داشت. سازوکار عمل نانو Zn به این صورت است که تنفس سلولی در حضور غلظت‌های مختلف نانو Zn در گروه‌های مختلف باکتریایی، یک الگوی مشابه را مطرح می‌کنند و آن کاهش تدریجی میزان تنفس سلولی به موازات افزایش غلظت نانو Zn است تا اینکه در غلظت



نمودار شماره ۲. تأثیر رقت‌های مختلف نانوپارتيکل Zn بر باکتری‌های پاتوژن کلبسیلا پنومونیه (K)، استافیلوکوکوس اورئوس (S) و اسیتوباکتر بومانی (A) در محیط LB

جدول شماره ۲. تغییرات چگالی نوری باکتری‌های بررسی شده، حاصل از تأثیر رقت‌های مختلف نانوپارتيکل Zn در محیط LB

Zn	C	۰/۰۱	۰/۱	۰/۵	۱	۱/۵
K	۱/۴۳۸	۱/۲۱۶	۰/۲۹۸	۰/۰۱۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۲
A	۱/۴۲۷	۱/۳۶۰	۰/۳۹۹	۰/۰۴۱	۰/۰۲۸	۰/۰۱۷
S	۱/۴۹۶	۱/۱۱۷	۰/۱۰۷	۰/۰۱۹	۰/۰۰۸	۰/۰۰۵

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، مقایسه آثار ضدباکتریایی Zn و Cu روی سه سویه از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مقاوم به عفونت‌های بیمارستانی صورت گرفت. نانوذرات موجب پراکسیداسیون ترکیبات فسفولیپیدی چندحلقه‌ای غشای لیپیدی باکتری‌ها می‌شود و در نتیجه، یکپارچگی غشای سلولی کاهش می‌یابد و فعالیت‌های اساسی در ساختار سلولی سالم از جمله فعالیت‌های تنفسی از بین می‌رود و مرگ سلولی غیرقابل اجتناب می‌شود.

فرضیه‌های ارائه شده درباره خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسیدهای فلزی شامل تخریب دیواره میکروبی و تجزیه اسیدهای نوکلئیک و آنزیم‌ها در ساختار میکروب است. به منظور بهبود ویژگی‌های مختلف نانوذرات اکسیدهای فلزی، سایر عناصر در ساختار این ترکیبات به روش‌های مختلف شیمیایی وارد می‌گردد که در نتیجه، خصوصیات مختلف این نانوذرات تغییر می‌یابد (۲۷).

در سال‌های اخیر، فناوری نانوذرات یکی از زمینه‌های مهم در طیف گسترده‌ای از مطالعات بوده است. در مطالعات مواد میکروبیولوژیک، نانوذرات عملکردهای جالبی در مهار میکروارگانیسم‌های مختلف بیماری‌زا داشته‌اند. یکی از ویژگی‌های مهم نانوذرات، نسبت سطح به حجمشان است که به آن‌ها اجازه برقراری ارتباط با ذرات دیگر را می‌دهد (۲۸).

مکانیسم ضدباکتریایی نانوذرات می‌تواند به دلیل توانایی جذب الکترواستاتیک بین یون‌های مثبت در ساختار نانوذرات فلزی و یون‌های منفی در ساختار باکتری باشد. (۲۹) این اتصال با اثر بر پروتئین‌های تیولی غشاء سلولی باکتری باعث اکسیداسیون غشاء باکتری می‌گردد و شرایط را برای انجام واکنش‌های استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن فراهم می‌کند. این امر ساختار غشاء سلولی و عملکرد آن را در نفوذپذیری و تنفس سلولی مختل کرده و

باعث مرگ آن می‌شود (۳۰).

سو اون جین و همکاران (Norms et al) در سال ۲۰۲۱ در پژوهشی با عنوان «فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی کاربردهای زیست پزشکی: از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی به جنبه‌های دارویی» گزارش کردند، ZnO به عنوان عوامل ترانوستیک، اثرات ضد میکروبی افزایش یافته‌ای را نشان می‌دهد. بنابراین، مواد ZnO می‌توانند یک داروی آنتی‌بیوتیکی نسل بعدی در برابر چندین دارو مقاوم باشند. (۳۱)

میزان الرحمن و همکاران در سال ۲۰۲۱ در طی تحقیقی با عنوان (نانوذرات به عنوان عوامل ضد میکروبی و ضد ویروسی) چشم انداز نانوذرات را در درمان عفونت‌های میکروبی مختلف بررسی کرده و با خواص منحصر به فرد کانالیزه شده برای پاسخگویی به نیازهای درمانی خاص نشان دادند. (۳)

در مطالعات جی نارادالا و همکاران در سال 2021 تحت عنوان (فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات مس سنتز شده توسط عصاره برگ Bambusa arundinacea مشخص گردید که نانوذرات مس سنتز شده فعالیت ضد باکتریایی عالی در برابر اشریشیا از خود نشان دادند. (۳۳)

در مجموع نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر چند موضوع را اثبات می‌کند:

نانو ذرات فلزی دارای خواص آنتی‌باکتریال بسیار مؤثری هستند. اثر نانو ذرات کلوئیدی بر باکتری‌ها، وابسته به غلظت است. محلول نانو ذرات کلوئیدی به صورت ذرات ریز میکروسکوپی منتشر شده و به راحتی می‌تواند به داخل سلول‌های باکتری نفوذ کند.

اثر نانو ذرات کلوئیدی در باکتری‌های مذکور به صورت کشندگی است و نه مهارکنندگی، بنابراین در همه باکتری‌ها MIC برابر MBC است. در مطالعه موجود اسیتو باکتر بومانی مقاوم‌ترین سویه و استاف اورئوس حساس‌ترین سویه نسبت به خاصیت

وجود نیاز به بررسی‌های بیشتر در باره سمیت سلولی این ذرات، نانوذرات Zn و Cu می‌توانند برای کنترل عفونت در بیماران بستری، طراحی روش‌های جدید درمان عفونت‌ها و بیماری‌هایی که به وسیله S. aureus و A. baumannii و K. pneumoniae ایجاد می‌شود، مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در مرکز تحقیقات میکروبی‌شناسی بالینی دانشگاه علوم پزشکی ایلام انجام گرفت. بدین‌وسیله نویسندگان از جناب آقای دکتر محمد حسین حدادی که با در اختیار گذاشتن امکانات لازم، ما را در اجرای این تحقیق یاری کردند، صمیمانه تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان اعلام می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

کد اخلاق: IR.ILAM.REC.1401.008

References

- Huang Y, Song J, Yang C, Long Y, Wu H . Scalable manufacturing and applications of nanofibers. *Materials Today* 2019; 28 :98-113doi:10.1016/j.mattod.2019.04.018.
- Bayat M, Zargar M, Chudinova E, Astarkhanova T, Pakina E. In Vitro Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity of Biogenic Silver and Copper Nanoparticles .The First Report of Applying Biogenic Nanoparticles against *Pilidium concavum* and *Pestalotia* sp. *Fungi Molecules* 2021;26: 5402. doi: 10.3390/molecules26175402.
- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 579 : 270–73. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- Poloju M, Jayababu N, Ramana M, Reddy V. Improved gas sensing performance of Al doped ZnO/CuO nanocomposite based ammonia gas sensor. *Mater Sci Eng* 2018; 227: 61-67 doi:10.1016/j.mseb.2017.10.012.
- Suleiman M, Mousa M, Hussein A. Wastewater disinfection by synthesized copper oxide nanoparticles stabilized with surfactant. *J Mater Environ Sci* 2015;6:1924-37. doi:10.1016/S0010-938X(99)00049-9.
- Rezaie A, Mohajeri D, Zarkhah A, Nazeri M. Comparative assessment of *Matricaria chamomilla* and zinc oxide on healing of experimental skin wounds on rats. *Ann Biol Res* 2012;3:550-60.
- Arslan K, Karahan O, Okus A, Unlu Y, Erilmaz M, Serden A, et al. Comparison of topical zinc oxide and silver sulfadiazine in burn wounds: an experimental study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2012;18 :376-83.
- Shaffiey SF, Shapoori M, Bozorgnia A, Ahmadi M. Synthesis and evaluation of bactericidal properties of CuO nanoparticles against *Aeromonashydrophila*. *Nanomed J* 2014 ;1:198-204.
- Esposito EP, Cervoni M, Bernardo M, Crivaro V, Cuccurullo S, Imperi F, et al. Molecular epidemiology and virulence profiles of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* blood isolates from the hospital agency "Ospedale dei Colli," Naples, Italy. *Front Microbiol* 2018 ;9:1463. doi:10.3389/fmicb.2018.01463.
- Walter J, Haller S, Quinten C, Kärki T, Zacher B, Eckmanns T, et al. Healthcare-associated pneumonia in acute care hospitals in European Union/European Economic Area countries: an

باکتری‌سیدال نانو ذرات بودند.

بر اساس این نتایج می‌توان گفت نانوذرات روی دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشد و باکتری‌های مقاوم به دارو مانند اسینتوباکتر بومانی نیز نسبت به آن حساس می‌باشند و تاکنون در برابر نانوذرات روی هیچ مقاومتی در این باکتری به وجود نیامده است که نتایج این مطالعه مانند اکثر مطالعه‌های دیگر این موضوع را تأیید کرد.

اسینتوباکتر بومانی یکی از شایع‌ترین پاتوژن‌های چالش برانگیز در ایجاد عفونت‌های جدی در بخش‌های مراقبت‌های ویژه سیستم‌های بیمارستانی مدرن در سراسر جهان است و تهدیدی جدی برای سلامت عمومی و بیماران محسوب می‌شود. (۳۴)

به واسطه مقاومت ذاتی یا ایجاد شده نسبت به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، مشکلات فراوانی بر درمان موفقیت آمیز عفونت‌های ناشی از اسینتوباکتر بومانی، ایجاد و در پی آن مرگ و میر قابل توجهی را رقم زده است. (۳۵)

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت نانو ذرات استفاده شده در این مطالعه از فعالیت ضد میکروبی قوی برخوردارند. داده‌های این مطالعه نشان دادند با

- analysis of data from a point prevalence survey. *Euro Surveill* 2018; 23:1700843. doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.32.1700843.
11. Saleh NM, Hesham MS, Amin MA, Samir Mohamed R. Acquisition of Colistin Resistance Links Cell Membrane Thickness Alteration with a Point Mutation in the *lpxD* Gene in *Acinetobacter Baumannii*. *Antibiotics* 2020; 9, 164. doi: 10.3390/antibiotics9040164.
 12. Wang X, Qin LJ. A review on *Acinetobacter Baumannii*. *J Acute Dis* 2019; 8: 16-20. doi:10.4103/2221- 6189.250373.
 13. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter Baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:55. doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
 14. Karyne R, Curty Lechuga G, Almeida Souza AL, Rangel da Silva Carvalho JP, Simões Villas Bôas MH, et al . Pan-Drug Resistant *Acinetobacter Baumannii*, but Not Other Strains, Are Resistant to the Bee Venom Peptide Mellitin. *Antibiotics* 2020; 9:178. doi: 10.3390/antibiotics9040178.
 15. Da Silva GJ, Domingues S. Interplay between Colistin Resistance, Virulence and Fitness in *Acinetobacter Baumannii*. *Antibiotics* 2017; 6: 28. doi:10.3390/antibiotics6040028.
 16. World Health Organization (WHO). WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed; WHO, 2017: Geneva, Switzerland .
 17. Hoang Quoc C, Nguyen Thi Phuong T, Nguyen Duc H, Tran Le T, Tran Thi Thu H, Nguyen Tuan S, et al . Carbapenemase Genes and Multidrug Resistance of *Acinetobacter Baumannii*: A Cross Sectional Study of Patients with Pneumonia in Southern Vietnam. *Antibiotics* 2019;8: 148. doi:10.3390/antibiotics8030148.
 18. Mairi A, Touati A, Lavigne JP. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST80 Clone: a systematic review. *Toxins* 2020; 12:119. doi: 10.3390/toxins12020119.
 19. Galar A, Weil AA, Dudzinski DM, Muñoz P, Siedner MJ. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic valve endocarditis: pathophysiology, epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev* 2019; 32: e00041-18. doi: 10.1128/CMR.00041-18.
 20. Shrivastava S, Jyung w, Lungue M. Characterization of Enhanced Antibacterial Effects of Nano Silver Nano Particles. *J Nanotech* 2010; 25:103-125. doi: 10.1088/0957-4484/18/22/ 225103.
 21. Wen-Ru Li. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* . *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;85:1115-22. doi: 10.1007/s00253-009-2159-5.
 22. Amanda S, Mohammad F, John J, SchlZner D, Syed A. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *J Nanomed Nanobiotechnol* 2010; 2: 544-68. doi:10.1002/wnan.103.
 23. Lara HH, Ayala-Núñez NV, Ixtepan Turrent L, et al. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 2010;26, 615-21. doi:10.1007/s11274-009-0211-3.
 24. Guangyin Lei. Synthesis of Nano-Silver Colloids and Their Anti Microbial Effects. *Blacksburg Virginia* 2007;8:72-78.
 25. Hu TL, Hwa JZ, Chang WF. Anti-bacterial study using nano silver-doped high density polyethylene pipe. *Sustainable Environ* 2012; 22: 153-58. doi:10.1080/27658511.2022.2118654.
 26. Dutta RK, Nenavathu BP, et al. Studies On Antibacterial Activity Of Zno Nanoparticles By ROS Induced Lipid Peroxidation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012;94:143-50. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.046
 27. Poloju M, Jayababu N, Ramana Reddy M.V. Improved gas sensing performance of Al doped ZnO/CuO nanocomposite based ammonia gas sensor. *Mater Sci Eng* 2018; 227: 61-7. doi:10.1016/j.mseb.2017.10.012.
 28. Torabi zarchi M, Mirhosseini M. Investigation of Combination Effect of Magnesium Oxide and Iron Oxide Nanoparticles on the Growth And Morphology of the Bacteria *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli* in Juice. *J Shahid Sadoughi Uni Med Sci* 2017; 24: 924-37.
 29. Prabhu YT, Rao KV, Kumara BS, Sai kumar VS, Pavani T. Synthesis of Fe 3 O 4 nanoparticles and its antibacterial application. *Int Nano Lett* 2015; 5: 85- 92. doi: 10.1007/s40089-015-0141-z.
 30. Mahdy SA, Raheed QJ, Kalaichelvan PT. Antimicrobial activity of zero-valent iron nanoparticles. *Int J Modern Eng Res Tech* 2012; 2: 578 -81.
 31. Jin SE, Jin HE. Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nano/Microparticles and Their Combinations against Pathogenic Microorganisms for Biomedical Applications. From Physico-chemical Characteristics to Pharmacological Aspects. *Nanomaterials* 2021;11, 263. doi: 10.3390/nano110 20263.
 32. Sharmin S, Rahaman MM, Sarkar C, Atolani O, Islam MT, Adeyemi OS. Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective study. *Heliyon* 2021;13;7: e06456. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06456.
 33. Naradala J, Allam A, Tumu VR, Rajaboina RK. Antibacterial Activity of Copper Nanoparticles Synthesized by *Bambusa arundinacea* Leaves Extract. *Biointerface Res Appl Chem* 2022; 12:1230 -36. doi:10.33263/BRIAC121.12301236.
 34. Saleh NM, Hesham MS, Amin MA, Samir Mohamed R. Acquisition of Colistin Resistance Links Cell Membrane Thickness Alteration with a Point Mutation in the *lpxD* Gene in *Acinetobacter Baumannii*. *Antibiotics* 2020; 9:164. doi: 10.3390/antibiotics9040164.
 35. Karyne R, Curty Lechuga G, Almeida Souza AL, Rangel da Silva Carvalho JP, Simões Villas Bôas MH, De Simone SG. Pan-Drug Resistant *Acinetobacter Baumannii*, but Not Other Strains, Are Resistant to the Bee Venom Peptide Mellitin. *Antibiotics* 2020;9: 178. doi:10.3390/antibiotics9040178.