Original Article

Evaluation of synergistic antimicrobial activity of silver nanoparticles and *Eucalyptus microtheca* on *streptococcus mutans*

Farrokhpour R[1], Anzabi Y[2,3*], Jafarizadeh-Malmiri H[4]

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, I.R. Iran.
2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, I.R. Iran.
3- Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, I.R. Iran.
4- Department of Chemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Sahand University of Technology, Tabriz, I.R. Iran.

Received: 2018/12/9 | Accepted: 2019/06/1

Abstract:

Background: *Streptococcus mutans* is a main bacteria caused by tooth decay. In the present study, antibacterial activities of the essential oil and hydroalcoholic extract of *EucalyptusMicrotheca* and silver nanoparticles (AgNPs) as compared to some different standard antibiotics, was evaluated against *S. mutans.*

Materials and Methods: In this experimental study, bactericidal activities of the mentioned essential oil, extract, AgNPs, and the selected antibiotics including Amoxicillin-Clavulanic acid, Chloramphenicol, and Ciprofloxacin were evaluated using the agar disc diffusion method against *S. mutans.* The main bioactive compounds presented in the essential oil and extract of *E.microtheca* were detected using gas chromatography technique (GC-MS). All the obtained results were statistically analyzed using SPSS software and the comparison test using Dunken with 95% of significance level was used.

Results: The results obtained indicated that maximum clear zone area with diameter of 23±0.2 mm was observed for the samples containing essential oil and extract of *E.-microtheca* and AgNPs. While the minimum clear zone (7±0.1 mm) war related to the sample containing essential oil of *E.microtheca* and AgNPs. The results also indicated that the clear zone diameter for the samples containing Amoxicillin-Clavulanic acid, Chloramphenicol, and Ciprofloxacin were 8±0.1, 22±0.2 and 9±0.1 mm, respectively. GC-MS analysis indicated that there were 44 bioactive compounds in the essential oil of *E.-microtheca* which Eucalyptol, alpha-Pinene and L-trans-Pinocarol were the most important components. Furthermore, the extract of *E.microtheca* was contained 30 bioavtive compounds which Eucalyptol, Globulol and Aroman dendron were its main components.

Conclusion: The results showed that silver nanoparticles in combination with extract and essential oil of *E. microtheca* have antimicrobial activity against *S.mutans*.

Keywords: Anti-streptococcus properties, Eucalyptus, Essential oil, Extract, Silver-nanoparticles.

***Corresponding Author:**
Email: anzabi@iaut.ac.ir
Tel: 0098 914 117 0856
Fax: 0098 413 637 935

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2019; Vol. 23, No 4, Pages 334-343

Please cite this article as: Farrokhpour R, Anzabi Y, Jafarizadeh-Malmiri H. Evaluation of synergistic antimicrobial activity of Silver nanoparticles and *Eucalyptus microtheca* on *Streptococcus mutans*. ***Feyz*** 2019; 23(4): 334-43.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

ارزیابی هم‌افزایی فعالیت ضدّمیکروبی نانوذرّات نقره و گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* بر روی باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*

رامین فرخ‌پور [۱]، یونس انزابی [۲،۳*]، هدا جعفری‌زاده مالمیری [٤]

خلاصه:

سابقه و هدف: *استرپتوکوکوس‌موتانس* مهم‌ترین عامل پوسیدگی دندان‌ها می‌باشد. در پژوهش حاضر، خواص ضدّباکتریایی اسانس و عصاره هیدروالکلی گیاه *اکالیپتوس‌میکروتکا* و نانوذرّه نقره در مقایسه با اثرات تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد، علیه سویه‌ای از باکتری مذکور مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، خواص ضدّباکتریایی ترکیبات موردنظر و آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین-کلاوولانیک‌اسید، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین به روش نفوذ دیسک در آگار علیه سویه استاندارد باکتری *استرپتوکوکوس‌موتانس* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بااستفاده از نرم‌افزار آماری SPSS آنالیز شد و برای شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره و اسانس گیاه مورد آزمایش نیز از سیستم دستگاه کروماتوگراف گازی-طیف‌سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد.

نتایج: بیشترین مقدار قطر منطقه عدم رشد باکتری موردآزمایش، مربوط به تلفیقی از ترکیب عصاره و اسانس گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* و نانوذرّه نقره به میزان ۲۳±۰/۲ میلی‌متر و کمترین آن مربوط به تلفیق اسانس این گیاه و نانوذرّه نقره به میزان ۷±۰/۱ میلی‌متر بود. همچنین قطر منطقه عدم رشد باکتری مذکور تحت‌تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین-کلاوولانیک‌اسید، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین به‌ترتیب ۹±۰/۱، ۲۲±۰/۲ و ۸±۰/۱ میلی‌متر ثبت شد. در اسانس گیاه موردآزمایش، ٤٤ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات اصلی آن به‌ترتیب شامل اکالیپتول، آلفاپینن، ال-ترانس-پینوکارئول بودند. در عصاره این گیاه هم، ۳۰ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات اصلی به‌ترتیب شامل اکالیپتول،گلوبولول و آرومان دندرون می‌باشد.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد که نانوذرّه نقره در تلفیق با عصاره و اسانس گیاه *اکالیپتوس‌میکروتکا* فعالیت ضدّمیکروبی مناسبی علیه باکتری بیماری‌زای *استرپتوکوکوس موتانس* دارد.

واژگان کلیدی: خاصیت ضدّاسترپتوکوکی، اکالیپتوس، اسانس، عصاره، نانوذرّات نقره

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ٤، مهر و آبان ۹۸، صفحات ۳٤۳-۳۳٤

مقدمه

استرپتوکوکوس موتانس یکی از باکتری‌های فلور طبیعی حفره دهانی در انسان می‌باشد؛ ولی در عین حال این باکتری، مهم‌ترین عامل پوسیدگی دندان‌هاست. باکتری مذکور با تخمیر قند ساکاروز و تولید اسیدلاکتیک، موجب صدمه به مینای دندان می‌شود. البته گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که عدم تعادل در میکروفلور طبیعی دهان به‌عنوان زمینه‌ساز، در پیدایش بیماری‌های دهان و دندان دخالت ویژه دارد.

بنابراین رعایت اصول بهداشت دهان، از رشد باکتری مذکور، تشکیل پلاک و پوسیدگی دندان‌ها جلوگیری می‌کند [۱]. در سال‌های اخیر به‌دلیل بروز مقاومت‌های دارویی، به گیاهان دارویی به‌عنوان مخازن طبیعی توجه خاصّی شده‌است و بر این اساس عصاره گیاه اکالیپتوس نیز به‌عنوان یک ترکیب دارای خواص ضدّمیکروبی معرفی شده‌است [۲]. مطالعات فیتوشیمیایی اسانس و عصاره گونه‌های مختلف این گیاه نشان‌دهنده حضور مخلوط پیچیده‌ای از مواد آلی فرّار، انواع ترکیبات مونوترپنی، سزکوئی‌ترپنی، فنل‌های‌آروماتیک و ترکیبات اتری، استری، آلدئیدی و کتونی است که غلظت آن‌ها به نوع و وضعیت آب‌وهوای مناطق جغرافیایی مختلف، ترکیب خاک و سنّ گیاه وابسته است [۳]. مشخص کرده‌اند که منوترپن‌های هیدروکربنی نقش بسزایی در دارویی‌بودن گیاه مذکور دارند؛ به‌طوری‌که ترکیب اصلی ۱ و ۸-سینئول که در برگ گیاه *اوکالیپتوس میکروتکا* وجود دارد، اثر میکروب‌کشی داشته، همچنین به دلیل این‌که این ماده دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدّالتهابی مناسبی نیز می‌باشد، اخیراً در فرمول پودر دندان استفاده و در دندانپزشکی ترمیمی نیز به مقدار ۲۵

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲. استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۴. دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

تبریز، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه پاتوبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۴۱۱۷۰۸۵۶ **دورنویس:** ۰۴۱۳۶۳۷۳۹۳۵

پست الکترونیک: anzabi@iaut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۱۸ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۸/۳/۱۱

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

درصد وارد شده‌است [٤]. از طرف دیگر ترکیب شیمیایی آلفا-پینن که در اسانس برگ این گیاه به مقدار بالایی وجود دارد، به‌دلیل دارابودن فعالیت‌های بیولوژیکی متعدد، در ساخت صابون، داروهای ضدّعفونی‌کننده و حلال‌ها نیز به کار می‌رود [٥]. استفاده از نقره به‌عنوان ماده‌ای ضدّمیکروب در تهیه ظروف نگهداری غذا از دیرباز مورد توجه بوده، اخیراً به‌دلیل ساخته‌شدن نقره به‌صورت نانوذرّه و بنابراین افزایش سطح تماس آن، خاصیت ضدّمیکروبی نقره تا حدود ٩٩ درصد افزایش پیداکرده‌است. ابعاد نانو در این ذرّات باعث عبور آسان از غشاهای بیولوژیکی و اثر بر فیزیولوژی سلول و میکروارگانیسم‌ها شده‌است؛ به‌طوری‌که با کاهش قطر، سطح تماس افزایش یافته و اثرگذاری و قدرت نفوذ این ذرّات نیز بیشتر می‌شود. البته شکل نانوذرّات نیز بر میزان سطح تماس و رهایش یون نقره اثرگذار می‌باشد. از آن‌جا که تمایل پروتئین‌ها برای پیوستن به لبه‌های نوک‌تیز بیشتر است، ازاین‌رو تمایل به چسبندگی به ذرّات مکعبی یا مثلثی شکل بیشتر خواهد بود که در نانوذرّه نقره این خاصیت به‌خوبی فراهم می‌باشد. مجموع ویژگی-های فوق، نانوذرّات نقره را به ماده‌ای مناسب جهت کاربردهای پزشکی تبدیل کرده‌است و بررسی‌های اخیرِ انجام‌گرفته حاکی از آن است که ٦٥ درصد از سهم نانوذرّات موجود در جهان امروزی، به نانوذرّات نقره اختصاص یافته‌است، بنابراین این ذرّات به‌صورت گسترده در توسعه و بهبود کیفیت بسیاری از محصولات زیستی و دارویی استفاده می‌شوند و این نانوذرّات با توجه به خصوصیات ضدّباکتریایی، ضدّقارچی و ضدّویروسی منحصربه‌فرد، امروزه جایگاه خاصّی را به خود اختصاص داده‌اند [٧،٦]. با توجه به موارد ذکرشده، ضرورت تحقیق حاضر به‌منظور شناسایی و اندازه-گیری مقدار ترکیبات عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* بااستفاده از تکنیک کروماتوگرافی گازی متصل به طیف-سنج‌جرمی (GC/MS) و بررسی خواص ضدّاسترپتوکوکی آن‌ها و نانوذرّه نقره لازم به نظر می‌رسد، چراکه در صورت بالا بودن مقدار ترکیبات ضدّمیکروبی و وجود خواص ضدّاسترپتوکوکی مناسب در آن‌ها، به احتمال زیاد این مواد بتوانند به‌عنوان جایگزینی طبیعی جهت مصارف بهداشتی و درمانی در دندانپزشکی مورد استفاده قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

الف- جمع‌آوری و آماده‌سازی گیاه موردنظر:

برگ‌های تازه گیاه موردنظر در تحقیق حاضر، از مناطق مختلف شهرستان اهواز در اواخر سال ١٣٩٦ جمع‌آوری شده، در هرباریوم گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به مشخصات ظاهری و توصیفات گیاه‌شناسی به‌عنوان *Eucalyptus microtheca* تشخیص داده‌شد. بلافاصله برگ‌های این گیاه در شرایط مناسب به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز منتقل و در سایه خشک شد.

ب- اسانس‌گیری از گیاه مورد آزمایش:

جهت استخراج اسانس گیاه موردنظر، از روش تقطیر با آب و دستگاه اسانس‌گیری کلونجر (SCHOTTDURAN-Germany) استفاده شد. بدین‌منظور ١٠٠ گرم از برگ‌های خشک و آسیاب‌شده گیاه مذکور به بالن ٢ لیتری کلونجر منتقل و مقدار ١ لیتر هم آب مقطر به آن اضافه شد و عملیات اسانس‌گیری به‌مدت ٤ ساعت ادامه یافت. از آن‌جا که اسانس‌ها نسبت به نور، اکسیژن و دما حساسند، بلافاصله اسانس استخراج شده به یک شیشه تیره دربسته منتقل و تا زمان استفاده، در یخچال آزمایشگاهی نگهداری شد [٨].

ج- تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه مورد آزمایش:

بدین‌منظور ابتدا مقداری از برگ‌های پودرشده *اکالیپتوس-میکروتکا* را در معرض حلال (٣ قسمت اتانول ٩٦ و یک قسمت گیاه) قرار داده، به‌مدت ٢٤ الی ٤٨ ساعت بااستفاده از دستگاه شیکر آزمایشگاهی مخلوط کردیم. بعد از این مدت بااستفاده از کاغذ صافی μ ٠/٤٥، مخلوط عصاره و الکل را صاف کرده، سپس بااستفاده از دستگاه روتاری (Stuart-England) و پمپ خلأ در دمای ٥٠ درجه سلسیوس حلال را جدا کردیم تا این‌که عصاره در ته بالن باقی ماند. در ادامه عصاره جداشده را در دمای اتاق قرار دادیم تا حلال باقی‌مانده کاملاً جدا شود. عصاره تهیه‌شده هم تا زمان استفاده، در یخچال آزمایشگاهی نگهداری شد [٩].

د- بررسی خواص ضدّمیکروبی اسانس و عصاره گیاه مورد آزمایش:

١) آماده‌سازی باکتری مورد مطالعه: سویه استاندارد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* (ATCC:35668) از مجموعه میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران-ایران) تهیه و تحت‌شرایط توصیه‌شده این سازمان و در آزمایشگاه میکروب‌شناسی گروه پاتوبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز با رعایت اصول روش‌های میکروبیولوژی و بااستفاده از محیط‌های کشت BHI broth (Brain Heart Infusion broth)، BHI agar (Brain Heart Infusion agar) و آگار خون‌دار (همگی مرک- آلمان) و بااستفاده از رنگ‌آمیزی گرم و همچنین آزمون‌های بیوشیمیایی و بیولوژیکی به تأیید قطعی هویت

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

میکروارگانیسم آماده‌شده مطابق جداول باکتری‌شناسی به‌صورت پرگنه‌های خالص مبادرت شد [۱۲-۱۰].

۲) تهیه سوسپانسیون میکروبی از باکتری استاندارد مورد آزمایش: با استفاده از پرگنه‌های خالص حاصل از باکتری مورد آزمایش تعیین هویت شده، در یک لوله آزمایش استریل، سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه کردیم، به‌طوری‌که تعداد باکتری‌های موجود در آن معادل $1/5\times10^{8}$ cfu/ml باشد [۱۲].

۳) تهیه نانوذرّه نقره: نانوذرّه نقره موردنظر با اندازه ۱۰ نانومتر از شرکت NEUTRINO (تهران-ایران) تهیه و استفاده شد.

٤) نحوه انجام آزمایش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) ترکیبات مورد آزمایش: به‌منظور بررسی اثرات ضدّ استرپتوکوکی ترکیبات مورد آزمایش (عصاره و اسانس گیاه *اکالیپتوس میکروتکا*، نانوذرّه نقره، تلفیق عصاره با نانوذرّه نقره، تلفیق اسانس با نانوذرّه نقره و تلفیق عصاره، اسانس همراه با نانوذرّه نقره) در پژوهش حاضر، در مرحله اوّل ابتدا مقدار MIC این ترکیبات، بر مبنای روش براث دایلوشن و رقت‌سازی سریال و بااستفاده از معرف رنگی تری فنیل تترازولیوم کلراید–Sigma) (Aldrich, USA به‌طور جداگانه تعیین شد. در مرحله قرائت نتیجه آزمایش، آخرین رقتی که در آن از رشد باکتری ممانعت شده بود (آخرین رقتی از هر ترکیب که رنگ قرمز تترازولیوم را به خود گرفته بود) (شکل شماره ۱) به‌عنوان MIC ترکیب مورد آزمایش، در نظر گرفته شد [۱٦-۱۳].

۵) مقایسه اثرات ضدّاسترپتوکوکی ترکیبات گیاهی، نانوذرّه نقره و آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد: بدین‌منظور از آزمایش سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام) به روش انتشار دیسک در آگار بر مبنای اصول کربی- بوئر استفاده شد. بدین‌منظور ابتدا در مورد هر ترکیب، دیسک‌های کاغذی سترون بلانک تهیه‌شده از شرکت پادتن طب (تهران-ایران) با همان رقت مربوط به نتیجه MIC ثبت شده در مرحله قبل، به‌طور جداگانه آغشته شد. جهت انجام این عمل، ابتدا بااستفاده از حلال دی متیل سولفوکسید (Sigma–Aldrich, USA) در لوله‌های سترون، رقت موردنظر از هر ترکیب، به‌طور جداگانه تهیه شده و سپس دیسک‌های فوق را در لوله‌های مذکور قرار داده و بعد از مدت حدود ۳۰ دقیقه و جذب‌شدن محتویات لوله‌ها توسط دیسک‌ها و اشباع شدن آن‌ها، دیسک‌های تهیه‌شده را به‌مدت ۲-۱ ساعت در دمای ٤۵ درجه‌ی سلسیوس قرار دادیم تا کاملاً خشک شده، جهت استفاده در آزمایش انتشار دیسک در آگار آماده شوند [۱۳]. در ادامه ۱۰۰- میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده از باکتری مورد آزمایش را در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) به کمک سواب پنبه‌ای استریل و به‌روش کشت یکنواخت وارد کردیم. سپس با کارگذاری دیسک‌های کاغذی تهیه‌شده در مرحله قبل بر روی محیط کشت مذکور و گرم‌خانه‌گذاری آن‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، آزمایش آنتی‌بیوگرام در مورد هریک از ترکیبات مورد آزمایش به‌طور جداگانه انجام شد. لازم به ذکر است که هم‌زمان این آزمایش بااستفاده از دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین-کلاوونیک‌اسید، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین (شرکت پادتن طب-تهران) نیز انجام شد. درنهایت قطر منطقه عدم رشد در اطراف هریک از دیسک‌ها با استفاده از کولیس (Helios-Preisser-Germany) به‌دقت اندازه‌گیری شد. این عمل برای هر یک از ترکیبات مورد آزمایش سه‌بار تکرار شد و در پایان میانگین قطر منطقه عدم رشد ایجاد شده درمورد هر دیسک به‌صورت میانگین ($\bar{X} \pm SD$) محاسبه و جداگانه ثبت شد [۱۵].

ه- شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس و عصاره گیاه مورد آزمایش

برای شناسایی ترکیبات شیمیایی و مواد مؤثره عصاره و اسانس گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* از سیستم دستگاه کروماتوگراف گازی-طیف‌سنج‌جرمی (GC/MS) دانشکده علوم پایه دانشگاه زنجان استفاده شد. این سیستم شامل کروماتوگرافی گازی مدل 7890B و طیف‌سنج‌جرمی مدل 5977A ساخت شرکت Agilent آمریکا، مجهز به سیستم تزریقی از نوع split/splitless و مدل یونیزاسیون بمباران الکترونی بوده و نیز از کتابخانه‌های جرمی مربوط به NIST و WILEY برخوردار بود. به‌منظور آنالیز ترکیبات موردنظر از ستون HP5-MS به طول ٦۰ متر با قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای محلّ تزریق، دمای Interface و دمای محلّ یونیزاسیون به‌ترتیب بر روی ۲۵۰، ۲۷۰ و ۲۵۰ درجه سلسیوس تنظیم شده‌بود. برنامه دمایی ستون با دمای اوّلیه ۵۰ درجه سلسیوس شروع و به‌مدت ۵ دقیقه در این دما نگه‌داشته شد، سپس دمای ستون با شیب ۱۰ درجه سلسیوس در دقیقه به دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس رسیده، به‌مدت ۲ دقیقه در این دما ثابت ماند و در نهایت با شیب ۲۰ درجه سلسیوس بر دقیقه به دمای ۳۰۰ درجه سلسیوس رسیده، ۵ دقیقه در این دما ثابت ماند. نسبت split هم به‌صورت ۱ به ۵۰ تنظیم شد و حجم تزریقی یک میکرومتر بود.

و- آنالیز آماری

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

آنالیز نتایج بااستفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد. برای مقایسه نمونه‌های مختلف مورد آزمایش هم از آزمون‌های ANOVA (تجزیه واریانس) استفاده کردیم و اختلاف بین ۹ گروه را مورد مطالعه قرار دادیم (جدول شماره ٤) و سپس از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ استفاده شد.

نتایج

الف- نتایج خواص ضدّمیکروبی ترکیبات مورد آزمایش:

مطابق جدول شماره ۱ و شکل شماره ۲ مشخص شد که بیشترین قطر منطقه عدم رشد باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در آزمایش آنتی‌بیوگرام به روش نفوذ دیسک در آگار مربوط به تلفیق عصاره و اسانس گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* و نانوذرّه نقره و به میزان ۲۳±۰/۳ میلی‌متر و کمترین مقدار آن هم به میزان ۷±۰/۱ میلی‌متر مربوط به تلفیق عصاره گیاه مذکور و نانوذرّه نقره می‌باشد. همچنین براساس نتایج جدول شماره ۲ و شکل شماره ۳ مشخص شد که باکتری مورد آزمایش در تحقیق حاضر نسبت به آنتی-بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین- کلاوولانیک‌اسید و سیپروفلوکساسین مقاوم و نسبت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل حساس می‌باشد. از طرف دیگر با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمایشات سنجش حساسیت میکروبی به روش نفوذ دیسک در آگار و آنالیز آماری آن‌ها مطابق شکل شماره ٤ مشخص شد که از نظر خاصیت ضدّاسترپتوکوکی بین عصاره و اسانس گیاه مورد آزمایش که دارای میانگین و انحراف معیار (٤۲/۳۳±۲/۰۳۳) است و نیز بین عصاره و تلفیق عصاره و اسانس و نانوذرّه نقره اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد (٤٥/۳۳±۱/۸۸۲) در حالی‌که از این نظر بین اثرات عصاره و نانوذرّه نقره (۳٥/٦٦±۱/۷٦٤) و همچنین بین عصاره و تلفیق عصاره و نانوذرّه (۲۹/٦٦±۱/۲۱٥) و همچنین تلفیق اسانس با نانوذرّه مذکور و نیز بین عصاره و آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین- کلاوولانیک‌اسید، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین (۷۳/۳۲±٤/٦۳۳) اختلاف آماری، معنی‌دار می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

ب- نتایج مربوط به تعیین ترکیبات و مواد مؤثره تشکیل‌دهنده اسانس و عصاره هیدروالکلی گیاه اکالیپتوس براساس آزمایش (GC-MS):

مطابق جدول شماره ۳ و ٤ ترکیبات شناسایی‌شده در اسانس و عصاره گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* و نیز درصد هر یک از آن‌ها در تحقیق حاضر به این ترتیب بود که در اسانس برگ گیاه مورد آزمایش، ٤٤ ترکیب شناسایی شد که درمجموع ۹٥/٥۱ درصد از کلّ اسانس را تشکیل می‌دهند. بر این اساس ترکیبات اصلی شناسایی‌شده در اسانس به‌ترتیب شامل اوکالیپتول (۳۸/٥٦ درصد)، آلفاپینن (۸/۲۹ درصد)، ال-ترانس-پینوکارول (٦/۹ درصد)، آرومان‌دندرن (٥/٥۷ درصد)، پینوکارون (۲/٦٦ درصد)، آلفاکارون (۲/٥٦ درصد)، گلوبولول (۲/۳۲ درصد)، آلفاهیماچالن (۲/۲٦ درصد)، آلوآرومادندرن (۲/۰٦ درصد) و آلفاترپینیل‌استات (۱/٦۳ درصد) بود که درواقع تشکیل‌دهنده ۷۲/۸۱ درصد از کلّ ترکیبات اسانس مورد آزمایش هستند. همچنین در عصاره این گیاه، ۳۰ ترکیب شناسایی شد که در مجموع ۹۱/٥٥ درصد از کلّ عصاره را تشکیل می‌دهند. همچنین ترکیبات اصلی شناسایی‌شده آن هم به ترتیب شامل اکالیپتول (٤۹/۰٥ درصد)، گلوبولول (۷/٦۳ درصد)، آرومان دندرون (٦/۸۷ درصد)، آلفاپینن (٤/٦۱ درصد)، ال--ترانس-پینوکاروئول (۳/٥۲ درصد)، ۲- متیل۲-متوکسی‌پروپان (۲/٦۹ درصد)، آلفااسورنول (۲/٤۰ درصد)، آلوآرومادندرن (۱/۷۸ درصد) و اپی‌گلوبولول (۱/۰۲ درصد) بودند که درمجموع تشکیل‌دهنده ۸۱/٤۸ درصد از کلّ ترکیبات موجود در عصاره مذکور می‌باشند.

شکل شماره ۱- نمونه‌ای از آزمایش تعیین MIC ترکیبات موردنظر در تحقیق حاضر بااستفاده از معرف رنگی تترازولیوم.

در این شکل چاهک‌های ردیف C مربوط به رقت‌های مختلف نانوذرّه نقره، چاهک‌های ردیف AC مربوط به رقت‌های مختلف تلفیق عصاره و نانوذرّه، چاهک‌های ردیف BC مربوط به رقت‌های مختلف تلفیق اسانس و نانوذرّه و چاهک‌های ردیف ABC هم مربوط به رقت‌های مختلف تلفیق عصاره، اسانس و نانوذرّه نقره می-باشد. همچنین بالاترین رقت با رنگ صورتی در هر ردیف نشان‌دهنده MIC ترکیب مورد آزمایش در آن ردیف می‌باشد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

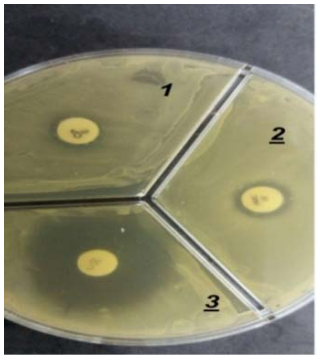
جدول شماره ۱- نتایج آزمایش حساسیت میکروبی باکتری *Streptococcus mutans* تحت‌تأثیر ترکیبات مختلف به‌روش نفوذ دیسک در آگار

ترکیبات مورد آزمایش	میزان جذب‌شده از ترکیبات در هر دیسک (µg/mL)	میانگین قطر منطقه عدم رشد (mean ±SD) برحسب میلی‌متر
عصاره اکالیپتوس	۷/۸	۲۲±۰/۳
اسانس اکالیپتوس	۷/۸	۲۰±۰/۳
نانوذرّه نقره	۱۵/٦	۱۳±۰/۲
عصاره + نانوذرّه	۳/۹	۷±۰/۱
اسانس+ نانوذرّه	۳۱/۲	۸±۰/۱
عصاره + اسانس+ نانوذرّه	۳/۹	۲۳±۰/۳

شکل شماره ۲- نمونه‌ای از آزمایش حساسیت میکروبی باکتری *Streptococcus mutans* تحت‌تأثیر ترکیبات مختلف به‌روش نفوذ دیسک در آگار که شماره‌های ۱،۲،۳ نشان‌دهنده قطر هاله عدم رشد ترکیبات موردنظر (عصاره، اسانس و تلفیق عصاره، اسانس و نانوذرّه نقره) می‌باشد.

جدول شماره ۲- نتایج آزمایش حساسیت میکروبی باکتری *Streptococcus mutans* تحت‌تأثیر تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد به روش نفوذ دیسک در آگار

آنتی‌بیوتیک مورد آزمایش	محتویات هر دیسک (µg/disk)	میانگین قطر منطقه عدم رشد ($\bar{X} \pm SD$) برحسب میلی‌متر
آموکسی‌سیلین- کلاوولانیک‌اسید	۲۰	۹±۰/۱
کلرامفنیکل	۳۰	۲۲±۰/۳
سیپروفلوکساسین	۵	۸±۰/۱



شکل شماره ۳- نتایج آنتی‌بیوگرام باکتری *Streptococcus mutans* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد. در این شکل منطقه عدم رشد در اطراف دیسک کلرامفنیکل (منطقه شماره ۳) و منطقه رشد نسبی در اطراف دیسک-های دو آنتی‌بیوتیک دیگر (منطقه شماره ۱و۲) مشاهده می‌شود.

جدول شماره ۳- نام و مشخصات ترکیبات شیمیایی شناسایی‌شده در اسانس گونه *اکالیپتوس میکروتکا* مورد آزمایش بااستفاده از تکنیک GC/MS

ردیف	نام ترکیب	نام لاتین ترکیب	زمان بازداری	درصد ترکیب	فرمول مولکولی ترکیب
۱	آلفاپینن	1R-α-pinene	۱۱/۰٤	۸/۲۹	$C_{10}H_{16}$
۲	اکالیپتول	Eucalyptol	۱۳/۰۳	۳۸/٥٦	$C_{10}H_{18}O$
۳	ال- ترانس-پینوکاروئول	L-trans-pinocarveol	۱٤/۹٦	٦/۹	$C_{10}H_{16}O$
٤	پینوکارون	Pinocarvone	۱٥/۳٦	۲/٦٦	$C_{10}H_{14}O$
٥	آلفا کارون	(-)-Carvone	۱٦/٦۹	۲/٥٦	$C_6H_{12}O_5$
٦	آلفاترپینیل استات	alpha.-Terpinyl acetate	۱۸/۱۲	۱/٦۳	$C_{15}H_{26}O$
۷	آرومان‌دندرن	Aromandendrene	۱۹/٤۱	٥/٥۷	$C_{15}H_{24}$
۸	آلوآرومادندرن	Alloaromadendrene	۱۹/٦۳	۲/۰٦	$C_{15}H_{24}$

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

جدول شماره ٤- نام و مشخصات ترکیبات شیمیایی شناسایی‌شده در عصاره گونه *اکالیپتوس میکروتکا* مورد آزمایش بااستفاده از تکنیک GC/MS

ردیف	نام ترکیب	نام لاتین ترکیب	زمان بازداری	درصد ترکیب	فرمول مولکولی ترکیب
١	٢-متیل-٢-متوکسی پروپان	Propane, 2-methoxy-2-methyl-	٤/٨٢	٢/٦٩	$C_{10}H_{16}$
٢	آلفاپینن	1R-α-pinene	١٠/٩٩	٤/٦١	$C_{10}H_{16}$
٣	اکالیپتول	Eucalyptol	١٢/٨١	٤٩/٠٥	$C_{10}H_{18}O$
٤	ال- ترانس-پینوکاروئول	L-trans-pinocarveol	١٤/٨٧	٣/٥٢	$C_{10}H_{16}O$
٥	آرومان‌دندرن	Aromandendrene	١٩/٣٧	٦/٨٧	$C_{15}H_{24}$
٦	آلوآرومادندرن	Alloaromadendrene	١٩/٦١	١/٧٨	$C_{15}H_{24}$
٧	اپی‌گلوبولول	Epiglobulol	٢٠/٥٥	١/٠٢	$C_{15}H_{26}O$
٨	گلوبولول	Globulol	٢٠/٧٧	٧/٦٣	$C_{15}H_{26}O$
٩	آلفا آسورنول	α -acorenol	٢٠/٨٥	١/٩١	$C_{15}H_{26}O$
١٠	آلفا آسورنول	α –acorenol	٢١/٣٠	٢/٤٠	$C_{15}H_{26}O$

بحث

در بررسی حاضر اثر ضدّمیکروبی عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* و نیز تلفیق این دو ماده با نانوذرّه‌نقره علیه سویه‌ای استاندارد از باکتری *استرپتوکوکوس-موتانس* (ATCC:35668) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که علاوه بر این‌که باکتری مذکور نسبت به عصاره و اسانس گیاه اکالیپتوس مورد آزمایش دارای حساسیت می‌باشد، تلفیق عصاره، اسانس و نانوذرّه نقره بر رشد و بقای باکتری مذکور دارای تأثیرات منفی به‌مراتب قابل‌ملاحظه‌تری می‌باشند. احتمالاً دلیل آن را می‌توان ناشی از این دانست که نانوذرّات نقره پتانسیل غشایی پلاسما را ناپایدار می‌کنند که نتیجه آن کاهش سطح آدنوزین تری‌فسفات درون سلول می‌باشد که این عمل با هدف قرار دادن غشای سلولی باعث مرگ باکتری می‌شود. در واقع نانوذرّات نقره موجب از هم گسستن اجزای ممانعت‌کننده موجود در غشای خارجی باکتری می‌شوند که این عمل هم باعث آزاد شدن تصاعدی مولکول‌هایی نظیر لیپوساکاریدها و پورین‌ها از غشای سیتوپلاسمی می‌شود [١٧]. در این ارتباط امین و همکاران نیز در سال ٢٠١٣ به بررسی اثرات ضدّمیکروبی اسانس متانولی برگ اکالیپتوس علیه برخی از باکتری‌های دهان پرداختند که نتایج به‌دست‌آمده با یافته‌های پژوهش حاضر مطابق جدول شماره ١ هم‌خوانی دارد [١٨]. همچنین Srinivasan و همکاران در سال ٢٠٠١ قطر منطقه بازدارنده از رشد عصاره گیاه اکالیپتوس در مورد استرپتوکوک مورد آزمایش در غلظت ٣/١٢ µg/mL را ١٢ میلی‌متر گزارش و عصاره مذکور را به‌عنوان یک ماده ضدّباکتریایی مناسب معرفی کردند [١٩]. بخشی از یافته‌های پژوهش حاضر هم با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد؛ به‌طوری‌که در روش نفوذ دیسک در آگار، هم عصاره و هم اسانس گیاه *E.-microtheca* مورد آزمایش ما در غلظت ٧/٨ µg/mL خاصیت ضدّ استرپتوکوکی مشخصی داشتند؛ به‌گونه‌ای‌که میانگین قطر منطقه عدم رشد در این غلظت در مورد عصاره و اسانس مربوطه به‌ترتیب ٢٢±٠/٣ و ٢٠±٠/٣ میلی‌متر بود. از طرف دیگر بررسی نتایج پژوهش حاضر مشخص کرد که علاوه بر این‌که اسانس و عصاره اکالیپتوس و نیز نانوذرّه نقره مورد آزمایش ما در غلظت‌های مختلف دارای خواص باکتریواستاتیکی و حتی باکتریوسیدی می‌باشند، ولی تلفیق هم‌زمان سه ترکیب مذکور، با عمل هم‌افزایی، قدرت ضدّ استرپتوکوکی این ترکیبات را به‌شدت افزایش می‌دهد. در این ارتباط مطالعاتی در زمینه ارزیابی اثرات بیولوژیکی ناشی از استفاده هم‌زمان و یا استفاده تلفیقی از نانوذرّات نقره همراه با ترکیبات طبیعی از جمله اسانس و عصاره‌های گیاهی انجام شده و نشان داده‌اند که خواص کشندگی نانوذرّات نقره غالباً به خواص فیزیکوشیمیایی آن‌ها مانند: اندازه، شکل و بار سطحی وابسته است [٢٠]. به نظر می‌رسد که موارد مذکور می‌تواند توجیه‌کننده علت ارتقای قدرت ضدّاسترپتوکوکی تلفیق اسانس و عصاره گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* همراه با نانوذرّه نقره باشد (میانگین قطر منطقه عدم رشد ایجادشده معادل ٢٣±٠/٣ میلی‌متر در غلظت µg/mL ٣/٩). همچنین در تحقیق حاضر جهت مقایسه قدرت ضدّمیکروبی عصاره و اسانس گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* و نیز نانوذرّه نقره نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، آزمایش آنتی‌بیوگرام به‌روش نفوذ دیسک در آگار براساس مدل کربی- بوئر بااستفاده از ٣ آنتی‌بیوتیک استاندارد هم انجام گرفت که نتایج به‌دست‌آمده نشان داد فقط آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل توانست منطقه عدم رشد مناسبی ایجاد کند که نشان‌دهنده حساسیت باکتری مورد آزمایش ما نسبت به این آنتی‌بیوتیک بود (میانگین قطر منطقه عدم رشد معادل ٢٢±٠/٣ میلی‌متر ثبت شد) در حالی‌که دو آنتی‌بیوتیک دیگر یعنی آموکسی‌سیلین-کلاوولانیک‌اسید و سیپروفلوکساسین به ترتیب مناطق عدم رشد ناچیزی با میانگین ٩±٠/١ و ٨±٠/١

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

میلی‌متر ایجاد کردند. در عین حال زمانی‌که نتایج آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام انجام‌گرفته در مورد این باکتری بااستفاده از اسانس، عصاره و نانوذرّه نقره و تلفیق آن‌ها، مقایسه می‌شود، استنباط می‌شود که عصاره و اسانس گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* و تلفیق عصاره، اسانس و نانوذرّه نقره با ایجاد مناطق عدم رشدی با میانگین قطر به ترتیب به اندازه ۰/۳±۲۲، ۰/۳±۲۰ و ۰/۳±۲۲ میلی‌متر، خاصیت ضدّاسترپتوکوکی قوی‌تری نسبت به دو آنتی‌بیوتیک متداول ذکرشده را نشان می‌دهد و براساس نتایج آنالیز آماری هم مشخص شد که بین اثرات ضدّاسترپتوکوکی اسانس و عصاره گیاه *اکالیپتوس میکروتیکا* و ۳ آنتی‌بیوتیک استاندارد مورد آزمایش اختلاف آماری معنی‌دار بالایی وجود دارد($p<0/05$). این یافته‌ها هم با نتایج برخی تحقیقات هم‌خوانی دارد؛ به‌طوری‌که چالشتری و همکاران در مطالعه خود در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که بین اثرات ضدّمیکروبی اسانس گیاهان زیره، اکالیپتوس و لاوند و آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد و در تمام غلظت‌های مورد استفاده، اسانس اکالیپتوس نسبت به آنتی-بیوتیک مذکور اثر بیشتری علیه استافیلوکوکوس‌ها نشان داده‌است [۲۱]. همچنین سلیمانی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۹ در تحقیق خود نشان دادند که اسانس زیره سیاه در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در مقابله با باکتری‌های *اشریشیاکولی* و *باسیلوس-سرئوس* نتایج بهتری دارد [۲۲]. از طرف دیگر انزابی و خاکی هم در سال ۱۳۹٤ در تحقیقی که هم در in vivo و هم در in vitro انجام گرفته، نشان دادند که هم عصاره اتانولی و هم اسانس گیاه کاکوتی کوهی علیه عوامل ایجادکننده عفونت‌های مجرای ادراری تأثیر بالاتری داشته، درضمن قدرت ضدّمیکروبی این ترکیبات طبیعی دارویی به‌مراتب بیشتر از آنتی‌بیوتیک آمیکاسین بوده‌است [۲۳]. به نظر می‌رسد که این یافته‌ها در عین حال، عدم ایجاد خاصیت مقاومت نسبت به ترکیبات گیاهی و طبیعی را هم برخلاف مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نشان می‌دهد که این امر اهمیت استفاده از این ترکیبات را بیشتر توجیه و توصیه می‌کند. از طرف دیگر ترکیبات شناسایی‌شده در اسانس و عصاره گونه اکالیپتوس مورد آزمایش در تحقیق حاضر بر اساس آزمایش GC-Mass نشان داد که ترکیبات ۱ و ۸ -سینئول (اوکالیپتول) و آلفا -پینن و گلوبولول، ترکیبات اصلی و عمده آن می‌باشند، به‌طوری‌که بالاترین میزان اوکالیپتول (٤۹/۰۵ درصد) در عصاره و بالاترین میزان آلفا-پینن (۸/۲۹ درصد) در اسانس و نیز بالاترین مقدار گلوبولول (۷/٦۳ درصد) در عصاره گیاه مورد آزمایش ما وجود داشت. به‌نظر می-رسد که براساس نتایج تحقیقات انجام‌شده توسط سایر محققان و نیز یافته‌های تحقیق حاضر می‌توان این ۳ ترکیب را در اکثر موارد، از مهم‌ترین ترکیبات عصاره و اسانس گونه‌های گیاه دارویی اکالیپتوس دانست، به‌طوری‌که در تحقیق انجام شده توسط ماندال و همکاران در سال ۲۰۰۱ که بر روی اسانس برگ گونه‌ای از گیاه اکالیپتوس انجام گرفته، تعداد ۱۷ ترکیب شناسایی شده که اوکالیپتول با ۷۸/۹ درصد، اصلی‌ترین ترکیب شناسایی‌شده بوده است [۲٤]. البته نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که از ٤٤ ترکیب شناسایی‌شده در اسانس گونه اکالیپتوس مورد آزمایش ما، اوکالیپتول فقط ۳۸/٥٦ درصد ترکیبات اسانس را تشکیل داده، هرچند که بیشترین ترکیب موجود در اسانس مذکور نیز بوده‌است. بنابراین نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های تحقیق مذکور فقط در زمینه بالاتر بودن مقدار اوکالیپتول نسبت به دیگر ترکیبات اسانس هم‌خوانی دارد در حالی‌که درخصوص میزان این ماده و نیز تعداد ترکیبات شناسایی‌شده در اسانس هم‌خوانی وجود ندارد. از طرف دیگر توزیع طبقه‌بندی شیمیایی ترکیبات اسانس و عصاره گیاه مورد آزمایش در تحقیق حاضر براساس نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز آن‌ها نشان داد که تعداد و میزان مواد مؤثره موجود در اسانس گونه *اکالیپتوس میکروتکا* به مراتب بیشتر از عصاره آن می‌باشد. با توجه به این‌که ترکیب شیمیایی اصلی که در برگ گیاه مذکور وجود دارد، ۱ و ۸- سینئول می‌باشد که اثر میکروب‌کشی و ضدّالتهابی نیز دارد [۲٦،۲٥]، بنابراین به‌نظر می‌رسد که ترکیب مذکور نقش بسزایی در خواص ضدّاسترپتوکوکی ترکیبات طبیعی تهیه‌شده از این گیاه داشته و بنابراین ارزش دارویی داشتن عصاره و اسانس مورد آزمایش در تحقیق حاضر را توجیه می‌کند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرّه نقره در تلفیق با عصاره و اسانس گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* فعالیت ضدّمیکروبی مناسبی بر روی باکتری بیماری‌زای *استرپتوکوکوس موتانس* دارد (حتی با غلظت ۵۰ درصد نسبت به اسانس و عصاره به‌تنهایی). این یافته مهم می‌تواند فرصت مناسبی را برای صنایع داروسازی فراهم کند و به نظر می‌رسد که بااستفاده از ترکیبات مذکور به جای آنتی‌بیوتیک‌ها، از افزایش مداوم سویه‌هایی از باکتری‌ها که در اثر مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف منجر به ظهور پاتوژن‌های Multi Drug Resistance (MDR) می‌شوند، جلوگیری کند. فناوری نانو هم، بستر مناسبی را برای غلبه بر مشکلات مقاومتی به کمک نانوذرّات فراهم می‌کند چرا که پتانسیل ضدّباکتریایی این ترکیبات می‌تواند توسط دستکاری کردن در اندازه و به‌دست آوردن سایز جدید افزایش یابد که به احتمال زیاد این امر در تولید مواد ضدّمیکروبی جهت استفاده در بهداشت دهان و دندان

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

هم بسیار کاربرد خواهد داشت. البته جهت حصول اطمینان کامل از امکان استفاده کاربردی از ترکیبات مورد آزمایش در تحقیق حاضر و ارزیابی دقیق‌تر تاثیرات ضداستریپتوکوکی آن‌ها در موارد عفونت‌های دهان و دندان، استفاده از سویه‌های بالینی باکتری مذکور و انجام آزمایشات لازم در شرایط in vivo هم ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته زیست‌شناسی گرایش میکروبیولوژی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز می‌باشد که بدین‌وسیله از کلیه مسؤولان و کارکنان محترم این دانشگاه جهت حمایت‌های مالی و معنوی سپاسگزاری می‌شود.

References:

[1] Davey AL, Rogers AH. Multiple types of the bacterium Streptococcus mutans in the human mouth and their intra-family transmission. ***Arch Oral Biol*** 1984; 29(6): 453-60.

[2] Siddiqui B, Sultana Im, Begum S. Triterpenoidal constituents from *Eucalyptus camaldulensis* var. Obtusa leaves. ***Phytochem*** 2000; 54(8): 861-5.

[3] Maciel MV, Morais SM, Bevilaqua CM, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, et al. Chemical composition of Eucalyptus spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis.* ***Vet Parasitol*** 2010; 167(1): 1-7.

[4] Iqbal Z, Hussain I, Hussain A, Ashraf MY. Genetic variability to essential oil contents and composition in five species of Eucalyptus. ***PAK J BOT*** 2003; 35(5): 843-52.

[5] Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore G, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, Tundis R, Sharifi-Rad M, Loizzo M, Ademiluyi A, Sharifi-Rad R. Biological activities of essential oils: from plant chemoecology to traditional healing systems. ***Molecules*** 2017; 22(1): 70.

[6] Whitesides GM. The 'right' size in nanobiotechnology. ***Nat Biotechnol*** 2003; 21(10): 1161.

[7] Devi LS, Joshi SR. Antimicrobial and synergistic effects of silver nanoparticles synthesized using soil fungi of high altitudes of eastern Himalaya. ***Mycobiol*** 2012; 40(1): 27-34.

[8] Anzabi Y, Aghdam VB, Makoui MH, Anvarian M, Mousavinia MN. Evaluation of Antibacterial Properties of Edible Oils and Extracts of A Native Plant, *Ziziphora Clinopodioides* (Mountains' Kakoty), on Bacteria Isolated From Urinary Tract Infections. ***Life Sci J*** 2013; 10 Suppl 4: 121-7.

[9] Manandhar B, Paudel KR, Sharma B, Karki R. Phytochemical profile and pharmacological activity of *Aegle marmelos* Linn. ***JIM*** 2017; 22(1):70.

[10] Finegold SM, Martin WJ. Diagnostic microbiology. 6th ed. Missouri: The C.V. Mosby; 1982. p. 532-59.

[11] Tabatabaei A, Firuzi R. Animal diseases due to bacteria. 1th ed. Tehran University Press; 2009. P.206-61.

[12] Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Lynton House, London WC1H9LB, England: Mosby; 1994. p. 209-36.

[13] Anzabi Y, Javadi A. Evaluation of antibacterial effects of Onions' methanol extracts and some antibiotics against the number of food born bacteria. ***J Food Microbiol*** 2017; 3(4): 83-94. [in Persian]

[14] Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogen. ***J Ethnopharmacol*** 2001; 74(2): 113-23.

[15] Nascimento GG, Locatelli J, Freitas PC and Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. ***Braz J Microbiol*** 2000; 31(4): 247-56.

[16] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard, M100. 28th ed. 2018. CLSI, Wayne, PA 19087 USA. Available at: https://clsi.org/

[17] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. ***Nanotechno*** 2005; 16(10): 23-46.

[18] Amin M, Abbasi ME, Javadi M, Shahin F, Teymuri RM. Antimicrobial Evaluation of Methanolic Essential Oil of *Eucalyptus glubulos* leaves against a Number of Oral Cavity Bacteria. ***Jentashapir J Health Res*** 2013; 4 Suppl 1: 41-7.

[19] Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Perumalsamy PL. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. ***J Ethnopharmacol*** 2001; 74(3): 217-20.

[20] Cheng SS, Huang CG, Chen YJ, Yu JJ, Chen WJ, Chang ST. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. ***Bioresour Technol*** 2009; 100(1): 452-6.

[21] Chaleshtori RS, Arani NM, Taghizadeh M, Chaleshtori FS, Barfrosh F. Detection of antibiotic resistance pattern in Staphylococcus aureus isolated from ready to eat foods in Kashan. ***Int J Food Microbiol*** 2015; 74(2): 101-2.

[22] Soleymani N, Sattari M, Sepehriseresht S, Daneshmandi S. Evaluation of reciprocal pharmaceutical effects and antibacterial activity of *Bunium persicum* essential oil against some Gram

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]

positive and Gram negative bacteria. ***IJM*** 2010; 4(1): 26-34.
[23] Anzabi Y, Khaki A. Antibacterial Effects of the Essential Oils and Ethanol Extracts of the Native Plants*; Ziziphora Clinopodioides* on 3 Species of Urinary Tract Isolated Bacteria in Rats' Experimental Model. ***Med J Tabriz Univ Med Sci*** 2015; 37(3): 18-25. [in Persian]
[24] Mandal S, Dwivedi PD, Singh A, Naqvi AA, Bagchi GD. Capillary gas chromatographic analysis of *Eucalyptus globulus* from different geoclimatic zones in India. ***J Essent Oil Res*** 2001; 13(3):196-7.
[25] Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. ***Int J Food Microbiol*** 2002; 74(2):90-101.
[26] Rizzello L, Pompa PP. Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines. ***Chem Soc Rev*** 2014; 43(5): 1501-18.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2024-04-25]