

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

Farrokhpour R¹, Anzabi Y^{2,3*}, Jafarizadeh-Malmiri H⁴

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.

ارزیابی هم‌افزایی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره و گیاه اکالیپتوس میکروتکا بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس

رامین فرخ‌پور^۱، یونس انزابی^{۲*}، هدا جعفری‌زاده مالمری^۴

خلاصه:

سابقه و هدف: استرپتوکوکوس موتانس مهم‌ترین عامل پوسیدگی دندان‌ها می‌باشد. در پژوهش حاضر، خواص ضدباکتریایی اسانس و عصاره هیدروالکلی گیاه اکالیپتوس میکروتکا و نانوذره 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 ضدباکتریایی ترکیبات موردنظر و آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین-کلاولانیک‌اسید، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین به روش نفوذ دیسک در آگار علیه سویه استاندارد باکتری استرپتوکوکوس موتانس مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج با استفاده 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 مورد آزمایش، مربوط به تلفیقی از ترکیب عصاره و اسانس گیاه اکالیپتوس میکروتکا و نانوذره نقره به میزان 23 ± 0.2 میلی‌متر و کمترین آن مربوط به تلفیق اسانس این گیاه و نانوذره نقره به میزان 7 ± 0.1 میلی‌متر بود. همچنین قطر منطقه عدم رشد باکتری مذکور تحت تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین-کلاولانیک‌اسید، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین به ترتیب 9 ± 0.1 ، 22 ± 0.2 و 8 ± 0.1 میلی‌متر ثبت شد. در اسانس گیاه مورد آزمایش، ۴۴ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات اصلی آن به ترتیب شامل اکالیپتول، آلفاپینن، ال-ترانس-پینوکارنول بودند. در عصاره این گیاه هم، ۳۰ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات اصلی به ترتیب شامل اکالیپتول، گلوبولول و آرومان دندرون می‌باشد.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد که نانوذره نقره در تلفیق با عصاره و اسانس گیاه اکالیپتوس میکروتکا فعالیت ضد میکروبی مناسبی علیه باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس موتانس دارد.

واژگان کلیدی: خاصیت ضد استرپتوکوکی، اکالیپتوس، اسانس، عصاره، نانوذرات نقره

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۴، مهر و آبان ۹۸، صفحات ۳۴۳-۳۴۴

مقدمه

بنابراین رعایت اصول بهداشت دهان، از رشد باکتری مذکور، تشکیل پلاک و پوسیدگی دندان‌ها جلوگیری می‌کند [۱]. در سال‌های اخیر به دلیل بروز مقاومت‌های دارویی، به گیاهان دارویی به عنوان مخازن طبیعی توجه خاصی شده است و بر این اساس عصاره گیاه اکالیپتوس نیز به عنوان یک ترکیب دارای خواص ضد میکروبی معرفی شده است [۲]. مطالعات فیتوشیمیایی اسانس و عصاره گونه‌های مختلف این گیاه نشان‌دهنده حضور مخلوط پیچیده‌ای از مواد آلی فرار، انواع ترکیبات مونوترپنی، سزکوئی-ترپنی، فنل‌های آروماتیک و ترکیبات اتری، استری، آلدئیدی و کتونی است که غلظت آن‌ها به نوع و وضعیت آب‌وهوای مناطق جغرافیایی مختلف، ترکیب خاک و سن گیاه وابسته است [۳]. مشخص کرده‌اند که منوترپن‌های هیدروکربنی نقش بسزایی در دارویی بودن گیاه مذکور دارند؛ به طوری که ترکیب اصلی ۱ و ۸-سینئول که در برگ گیاه اکالیپتوس میکروتکا وجود دارد، اثر میکروب‌کشی داشته، همچنین به دلیل این که این ماده دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی مناسبی نیز می‌باشد، اخیراً در فرمول پودر دندان استفاده و در دندانپزشکی ترمیمی نیز به مقدار ۲۵

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 به عنوان زمینه‌ساز، در پیدایش بیماری‌های دهان و دندان دخالت ویژه دارد.

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 مسئول:

تبریز، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه پاتوبیولوژی

دوره‌پس: ۰۴۱۳۶۳۷۳۹۳۵

تلفن: ۰۹۱۴۱۱۷۰۸۵۶

پست الکترونیک: anzabi@iaut.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۳/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۱۸

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 (SCHOTT-DURAN-Germany) استفاده شد. بدین منظور ۱۰۰ گرم از برگ‌های خشک و آسیاب‌شده گیاه مذکور به بالن ۲ لیتری کلونجر منتقل و مقدار ۱ لیتر هم آب مقطر به آن اضافه شد و عملیات اسانس‌گیری به مدت ۴ 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 [۸].

ج- تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه مورد آزمایش:

بدین منظور ابتدا مقداری از برگ‌های پودر شده *اکالیپتوس*- میکروتکا را در معرض حلال (۳ قسمت اتانول ۹۶ و یک قسمت گیاه) قرار داده، به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت با استفاده از دستگاه شیکر آزمایشگاهی مخلوط کردیم. بعد از این مدت با استفاده از کاغذ صافی ۰/۴۵، مخلوط عصاره و الکل را صاف کرده، سپس با استفاده از دستگاه روتاری (Stuart-England) و پمپ خلأ در دمای ۵۰ درجه سلسیوس حلال را جدا کردیم تا این‌که عصاره در ته بالن باقی ماند. در ادامه عصاره جدا شده را در دمای اتاق قرار دادیم تا حلال باقی‌مانده کاملاً جدا شود. عصاره تهیه‌شده هم تا زمان استفاده، در یخچال آزمایشگاهی نگهداری شد [۹].

د- بررسی خواص ضد میکروبی اسانس و عصاره گیاه مورد آزمایش:

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

درصد وارد شده است [۴]. از طرف دیگر ترکیب شیمیایی آلفا-پینن که در اسانس برگ این گیاه به مقدار بالایی وجود دارد، به دلیل دارا بودن فعالیت‌های بیولوژیکی متعدد، در ساخت صابون، داروهای ضد عفونی‌کننده و حلال‌ها نیز به کار می‌رود [۵]. استفاده از نقره به‌عنوان ماده‌ای ضد میکروب در تهیه ظروف نگهداری غذا از دیرباز مورد توجه بوده، اخیراً به دلیل ساخته شدن نقره به صورت نانو ذره و بنابراین افزایش سطح تماس آن، خاصیت ضد میکروبی نقره تا حدود ۹۹ درصد افزایش پیدا کرده است. ابعاد نانو در این ذرات باعث عبور آسان از غشاهای بیولوژیکی و اثر بر فیزیولوژی سلول و میکروارگانیسم‌ها شده است؛ به طوری که با کاهش قطر، سطح تماس افزایش یافته و اثرگذاری و قدرت نفوذ این ذرات نیز بیشتر می‌شود. البته شکل نانوذرات نیز بر میزان سطح تماس و رهایش یون نقره اثرگذار می‌باشد. از آنجا که تمایل پروتئین‌ها برای پیوستن به لبه‌های نوک‌تیز بیشتر است، از این رو تمایل به چسبندگی به ذرات مکعبی یا مثلثی شکل بیشتر خواهد بود که در نانو ذره نقره این خاصیت به خوبی فراهم می‌باشد. مجموع ویژگی‌های فوق، نانوذرات نقره را به ماده‌ای مناسب جهت کاربردهای پزشکی تبدیل کرده است و بررسی‌های اخیر انجام گرفته حاکی از آن است که ۶۵ درصد از سهم نانوذرات موجود در جهان امروزی، به نانوذرات نقره اختصاص یافته است، بنابراین این ذرات به صورت گسترده در توسعه و بهبود کیفیت بسیاری از محصولات زیستی و دارویی استفاده می‌شوند و این نانوذرات با توجه به خصوصیات ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی منحصر به فرد، امروزه جایگاه خاصی را به خود اختصاص داده‌اند [۷، ۶]. با توجه به موارد ذکر شده، ضرورت تحقیق حاضر به منظور شناسایی و اندازه‌گیری مقدار ترکیبات عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی گازی متصل به طیف-سنج جرمی (GC/MS) و بررسی خواص ضد استرپتوکوکوی آن‌ها و نانو ذره نقره لازم به نظر می‌رسد، چراکه در صورت بالا بودن مقدار ترکیبات ضد میکروبی و وجود خواص ضد استرپتوکوکوی 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 ۱۳۹۶ جمع‌آوری شده، در هرباریوم گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران

آزمایش را در سطح محیط کشت مولر هیتون آگار (مرک-آلمان) به کمک سواب پنبه‌ای استریل و به روش 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 هر یک از ترکیبات مورد آزمایش به‌طور جداگانه انجام شد. لازم به ذکر است که هم‌زمان این آزمایش با استفاده از دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین-کلاوونیک‌اسید، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین (شرکت پادتن طب-تهران) نیز انجام شد. در نهایت قطر منطقه عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک‌ها با استفاده از کولیس (Helios-Preisser-Germany) به دقت اندازه‌گیری شد. این عمل برای هر یک از ترکیبات مورد آزمایش سه‌بار تکرار شد و در پایان میانگین قطر منطقه عدم رشد ایجاد شده در مورد 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-طیف‌سنج جرمی (GC/MS) دانشکده علوم پایه دانشگاه زنجان استفاده شد. این سیستم شامل کروماتوگرافی گازی مدل 7890B و طیف‌سنج جرمی 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 ۶۰ متر با قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای محل تزریق، دمای Interface و دمای محل یونیزاسیون به ترتیب بر روی ۲۵۰، ۲۷۰ و ۲۵۰ درجه سلسیوس تنظیم شده بود. برنامه دمایی ستون با دمای اولیه ۵۰ درجه سلسیوس شروع و به مدت ۵ دقیقه در این دما نگاه داشته شد، سپس دمای ستون با شیب ۱۰ درجه سلسیوس در دقیقه به دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس رسیده، به مدت 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

میکروارگانیزم آماده‌شده مطابق جداول باکتری‌شناسی به صورت 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 1.0×10^8 cfu/ml باشد [۱۲].

۳) تهیه نانوذره نقره: نانوذره نقره موردنظر با اندازه ۱۰ نانومتر از

شرکت NEUTRINO (تهران-ایران) تهیه و استفاده شد.

۴) نحوه انجام آزمایش تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) ترکیبات مورد آزمایش: به‌منظور بررسی اثرات ضد استرپتوکوکی ترکیبات مورد آزمایش (عصاره و اسانس گیاه اکالیپتوس میکروتکا، نانوذره نقره، تلفیق عصاره با نانوذره نقره، تلفیق اسانس با نانوذره نقره و تلفیق عصاره، اسانس همراه با نانوذره نقره) در پژوهش حاضر، در مرحله اول ابتدا مقدار MIC این ترکیبات، بر مبنای روش برات دایلوویشن و رقت‌سازی سریال و با استفاده 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 [۱۶-۱۳].

۵) مقایسه اثرات ضد استرپتوکوکی ترکیبات گیاهی، نانوذره 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 با استفاده 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 جذب شدن محتویات لوله‌ها توسط دیسک‌ها و اشباع شدن آن‌ها، دیسک‌های تهیه‌شده را به مدت ۲-۱ ساعت در دمای ۴۵ 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

تلفیق اسانس با نانوذره مذکور و نیز بین عصاره و آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین- کلارولانیک اسید، کلرامفنیکل و سیپروفلوکساسین ($P < 0/05$).

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

مطابق جدول شماره ۳ و ۴ ترکیبات شناسایی شده در اسانس و عصاره گیاه اکالیپتوس میکروتکا و نیز درصد هر یک از آن ها در تحقیق حاضر به این ترتیب بود که در اسانس برگ گیاه مورد آزمایش، ۴۴ ترکیب شناسایی شد که در مجموع ۹۵/۵۱ درصد از کل اسانس را تشکیل می دهند. بر این اساس ترکیبات اصلی شناسایی شده در اسانس به ترتیب شامل اوکالیپتول (۳۸/۵۶ درصد)، آلفا پینن (۸/۲۹ درصد)، ال-ترانس-پینوکارول (۶/۹ درصد)، آرومان دندرن (۵/۵۷ درصد)، پینوکارون (۲/۶۶ درصد)، آلفا کارون (۲/۵۶ درصد)، گلوبولول (۲/۳۲ درصد)، آلفاهیمچالن (۲/۲۶ درصد)، آلوآرومادندرن (۲/۰۶ درصد) و آلفاترپینیل استات (۱/۶۳ درصد) بود که در واقع تشکیل دهنده ۷۲/۸۱ درصد از کل ترکیبات اسانس مورد آزمایش هستند. همچنین در عصاره این گیاه، ۳۰ ترکیب شناسایی شد که در مجموع ۹۱/۵۵ درصد از کل عصاره را تشکیل می دهند. همچنین ترکیبات اصلی شناسایی شده آن هم به ترتیب شامل اکالیپتول (۴۹/۰۵ درصد)، گلوبولول (۷/۶۳ درصد)، آرومان دندرون (۶/۸۷ درصد)، آلفا پینن (۴/۶۱ درصد)، ال- ترانس-پینوکاروئول (۳/۵۲ درصد)، ۲- متیل-۲-متوکسی پروپان (۲/۶۹ درصد)، آلفا سورنول (۲/۴۰ درصد)، آلوآرومادندرن (۱/۷۸ درصد) و ایپی گلوبولول (۱/۰۲ درصد) بودند که در مجموع تشکیل دهنده ۸۱/۴۸ درصد از کل ترکیبات موجود در عصاره مذکور می باشند.

آنالیز نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد. برای مقایسه نمونه های مختلف مورد آزمایش هم از آزمون های ANOVA (تجزیه واریانس) استفاده کردیم و اختلاف بین ۹ گروه را مورد مطالعه قرار دادیم (جدول شماره ۴) و سپس از آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح معنی داری $P < 0/05$ استفاده شد.

نتایج

الف- نتایج خواص ضد میکروبی ترکیبات مورد آزمایش:

مطابق جدول شماره ۱ و شکل شماره ۲ مشخص شد که بیشترین قطر منطقه عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس در آزمایش آنتی بیوگرام به روش نفوذ دیسک در آگار مربوط به تلفیق عصاره و اسانس گیاه اکالیپتوس میکروتکا و نانوذره نقره و به میزان $23 \pm 0/3$ میلی متر و کمترین مقدار آن هم به میزان $7 \pm 0/1$ میلی متر مربوط به تلفیق عصاره گیاه مذکور و نانوذره نقره می باشد. همچنین براساس نتایج جدول شماره ۲ و شکل شماره ۳ مشخص شد که باکتری مورد آزمایش در تحقیق حاضر نسبت به آنتی-بیوتیک های آموکسی سیلین- کلارولانیک اسید و سیپروفلوکساسین مقاوم و نسبت به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل حساس می باشد. از طرف دیگر با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایشات سنجش حساسیت میکروبی به روش نفوذ دیسک در آگار و آنالیز آماری آن ها مطابق شکل شماره ۴ مشخص شد که از نظر خاصیت ضد استرپتوکوکوی بین عصاره و اسانس گیاه مورد آزمایش که دارای میانگین و انحراف معیار ($42/33 \pm 2/033$) است و نیز بین عصاره و تلفیق عصاره و اسانس و نانوذره نقره اختلاف آماری معنی داری وجود ندارد ($45/33 \pm 1/882$) در حالی که از این نظر بین اثرات عصاره و نانوذره نقره ($35/66 \pm 1/764$) و همچنین عصاره و تلفیق عصاره و نانوذره ($29/66 \pm 1/215$) و همچنین



شکل شماره ۱- نمونه ای از آزمایش تعیین MIC ترکیبات مورد نظر در تحقیق حاضر با استفاده از معرف رنگی ترازولیوم.

در این شکل چاهک های ردیف C مربوط به رقت های مختلف نانوذره نقره، چاهک های ردیف AC مربوط به رقت های مختلف تلفیق عصاره و نانوذره، چاهک های ردیف BC مربوط به رقت های مختلف تلفیق اسانس و نانوذره و چاهک های ردیف ABC هم مربوط به رقت های مختلف تلفیق عصاره، اسانس و نانوذره نقره می باشد. همچنین بالاترین رقت با رنگ صورتی در هر ردیف نشان دهنده MIC ترکیب مورد آزمایش در آن ردیف می باشد.

جدول شماره ۱- نتایج آزمایش حساسیت میکروبی باکتری *Streptococcus mutans* تحت تأثیر ترکیبات مختلف به روش نفوذ دیسک در آگار

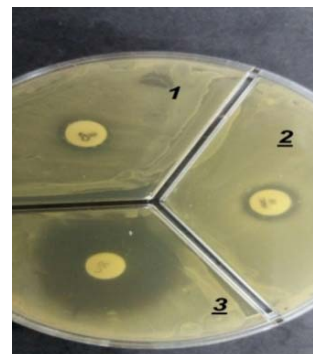
ترکیبات مورد آزمایش	میزان جذب شده از ترکیبات در هر دیسک ($\mu\text{g/mL}$)	میانگین قطر منطقه عدم رشد (mean \pm SD) بر حسب میلی متر
عصاره اکالیپتوس	۷/۸	۲۲ \pm ۰/۳
اسانس اکالیپتوس	۷/۸	۲۰ \pm ۰/۳
نانوذره نقره	۱۵/۶	۱۳ \pm ۰/۲
عصاره + نانوذره	۳/۹	۷ \pm ۰/۱
اسانس + نانوذره	۳۱/۲	۸ \pm ۰/۱
عصاره + اسانس + نانوذره	۳/۹	۲۳ \pm ۰/۳

جدول شماره ۲- نتایج آزمایش حساسیت میکروبی باکتری *Streptococcus mutans* تحت تأثیر تعدادی از آنتی بیوتیک‌های استاندارد به روش نفوذ دیسک در آگار

آنتی بیوتیک مورد آزمایش	محتویات هر دیسک ($\mu\text{g/disk}$)	میانگین قطر منطقه عدم رشد ($\bar{X} \pm \text{SD}$) بر حسب میلی متر
آموکسی سیلین - کلاوولانیک اسید	۲۰	۹ \pm ۰/۱
کلرامفنیکل	۳۰	۲۲ \pm ۰/۳
سیپروفلوکساسین	۵	۸ \pm ۰/۱



شکل شماره ۲- نمونه‌ای از آزمایش حساسیت میکروبی باکتری *Streptococcus mutans* تحت تأثیر ترکیبات مختلف به روش نفوذ دیسک در آگار که شماره‌های ۱، ۲، ۳ نشان‌دهنده قطر هاله عدم رشد ترکیبات مورد نظر (عصاره، اسانس و تلفیق عصاره، اسانس و نانوذره نقره) می‌باشد.



شکل شماره ۳- نتایج آنتی بیوگرام باکتری *Streptococcus mutans* نسبت به آنتی بیوتیک‌های استاندارد. در این شکل منطقه عدم رشد در اطراف دیسک کلرامفنیکل (منطقه شماره ۳) و منطقه رشد نسبی در اطراف دیسک-های دو آنتی بیوتیک دیگر (منطقه شماره ۱ و ۲) مشاهده می‌شود.

جدول شماره ۳- نام و مشخصات ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در اسانس گونه اکالیپتوس میکروتنکا مورد آزمایش با استفاده از تکنیک GC/MS

ردیف	نام ترکیب	نام لاتین ترکیب	زمان بازداری	درصد ترکیب	فرمول مولکولی ترکیب
۱	آلفا پینین	1R- α -pinene	۱۱/۰۴	۸/۲۹	C ₁₀ H ₁₆
۲	اکالیپتول	Eucalyptol	۱۳/۰۳	۳۸/۵۶	C ₁₀ H ₁₈ O
۳	ال - ترانس - پینو کارونول	L-trans-pinocarveol	۱۴/۹۶	۶/۹	C ₁₀ H ₁₆ O
۴	پینو کارون	Pinocarvone	۱۵/۳۶	۲/۶۶	C ₁₀ H ₁₄ O
۵	آلفا کارون	(-)-Carvone	۱۶/۶۹	۲/۵۶	C ₆ H ₁₂ O ₅
۶	آلفا ترپینیل استات	alpha-Terpinyl acetate	۱۸/۱۲	۱/۶۳	C ₁₅ H ₂₆ O
۷	آرومان دندرن	Aromadendrene	۱۹/۴۱	۵/۵۷	C ₁₅ H ₂₄
۸	آلواروماندندرن	Alloaromadendrene	۱۹/۶۳	۲/۰۶	C ₁₅ H ₂₄

جدول شماره ۴- نام و مشخصات ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در عصاره گونه *اکالیپتوس میکروتکا* مورد آزمایش با استفاده از تکنیک GC/MS

ردیف	نام ترکیب	نام لاتین ترکیب	زمان بازداری	درصد ترکیب	فرمول مولکولی ترکیب
۱	۲-متیل-۲-متوکسی پروپان	Propane, 2-methoxy-2-methyl-	۴/۸۲	۲/۶۹	C ₁₀ H ₁₆
۲	آلفاپینن	1R- α -pinene	۱۰/۹۹	۴/۶۱	C ₁₀ H ₁₆
۳	اکالیپتول	Eucalyptol	۱۲/۸۱	۴۹/۰۵	C ₁₀ H ₁₈ O
۴	ال- ترانس-پینوکاروئول	L-trans-pinocarveol	۱۴/۸۷	۳/۵۲	C ₁₀ H ₁₆ O
۵	آروماندندرن	Aromandendrene	۱۹/۳۷	۶/۸۷	C ₁₅ H ₂₄
۶	آلواروماندندرن	Alloaromadendrene	۱۹/۶۱	۱/۷۸	C ₁₅ H ₂₄
۷	اپی گلوبولول	Epiglobulol	۲۰/۵۵	۱/۰۲	C ₁₅ H ₂₆ O
۸	گلوبولول	Globulol	۲۰/۷۷	۷/۶۳	C ₁₅ H ₂₆ O
۹	آلفا آسورنول	α -acorenol	۲۰/۸۵	۱/۹۱	C ₁₅ H ₂₆ O
۱۰	آلفا آسورنول	α -acorenol	۲۱/۳۰	۲/۴۰	C ₁₅ H ₂₆ O

بحث

ضد استرپتوکوکی مشخصی داشتند؛ به گونه‌ای که میانگین قطر منطقه عدم رشد در این غلظت در مورد عصاره و اسانس مربوطه به ترتیب 22 ± 0.3 و 20 ± 0.3 میلی متر بود. از طرف دیگر بررسی نتایج پژوهش حاضر مشخص کرد که علاوه بر این که اسانس و عصاره *اکالیپتوس* و نیز نانوذره نقره مورد آزمایش ما در غلظت-های مختلف دارای خواص باکتریواستاتیکی و حتی باکتریوسیدی می‌باشند، ولی تلفیق هم‌زمان سه ترکیب مذکور، با عمل هم‌افزایی، قدرت ضد استرپتوکوکی این ترکیبات را به شدت افزایش می‌دهد. در این ارتباط مطالعاتی در زمینه ارزیابی اثرات بیولوژیکی ناشی از استفاده هم‌زمان و یا استفاده تلفیقی از نانوذرات نقره همراه با ترکیبات طبیعی از جمله اسانس و عصاره‌های گیاهی انجام شده و نشان داده‌اند که خواص کشندگی نانوذرات نقره غالباً به خواص فیزیکوشیمیایی آن‌ها مانند: اندازه، شکل و بار سطحی وابسته است [۲۰]. به نظر می‌رسد که موارد مذکور می‌تواند توجیه‌کننده علت ارتقای قدرت ضد استرپتوکوکی تلفیق اسانس و عصاره گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* همراه با نانوذره نقره باشد (میانگین قطر منطقه عدم رشد ایجاد شده معادل 23 ± 0.3 میلی متر در غلظت $\mu\text{g/mL}$ ۳/۹). همچنین در تحقیق حاضر جهت مقایسه قدرت ضد میکروبی عصاره و اسانس گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* و نیز نانوذره نقره نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، آزمایش آنتی‌بیوگرام به روش نفوذ دیسک در آگار براساس مدل کربی-بوئر با استفاده از ۳ آنتی‌بیوتیک استاندارد هم انجام گرفت که نتایج به دست آمده 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 22 ± 0.3 میلی متر ثبت شد) در حالی که دو آنتی‌بیوتیک دیگر یعنی آموکسی‌سیلین-کلاولانیک‌اسید و سیپروفلوکساسین به ترتیب مناطق عدم رشد ناچیزی با میانگین 9 ± 0.1 و 8 ± 0.1

در بررسی حاضر اثر ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی و اسانس گیاه *اکالیپتوس میکروتکا* و نیز تلفیق این دو ماده با نانوذره نقره علیه سویه‌ای استاندارد از باکتری *استرپتوکوکوس-موتانس* (ATCC:35668) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که علاوه بر این که باکتری مذکور نسبت به عصاره و اسانس گیاه *اکالیپتوس* مورد آزمایش دارای حساسیت می‌باشد، تلفیق عصاره، اسانس و نانوذره نقره بر رشد و بقای باکتری مذکور دارای تأثیرات منفی به مراتب قابل ملاحظه‌تری می‌باشند. احتمالاً دلیل آن را می‌توان ناشی از این دانست که نانوذرات نقره پتانسیل غشایی پلاسما را ناپایدار می‌کنند که نتیجه آن کاهش سطح آدنوزین تری فسفات درون سلول می‌باشد که این عمل با هدف قرار دادن غشای سلولی باعث مرگ باکتری می‌شود. در واقع نانوذرات 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 [۱۷]. در این ارتباط امین و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ به بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس متانولی برگ *اکالیپتوس* علیه برخی از باکتری‌های دهان پرداختند که نتایج به دست آمده با یافته‌های پژوهش حاضر مطابق جدول شماره ۱ هم-خوانی دارد [۱۸]. همچنین Srinivasan و همکاران در سال ۲۰۰۱ قطر منطقه بازدارنده از رشد عصاره گیاه *اکالیپتوس* در مورد استرپتوکوک مورد آزمایش در غلظت $\mu\text{g/mL}$ ۳/۱۲ را ۱۲ میلی متر گزارش و عصاره مذکور را به عنوان یک ماده ضد باکتریایی مناسب معرفی کردند [۱۹]. بخشی از یافته‌های پژوهش حاضر هم با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد؛ به طوری که در روش نفوذ دیسک در آگار، هم عصاره و هم اسانس گیاه *E. microtheca* مورد آزمایش ما در غلظت $\mu\text{g/mL}$ ۷/۸ خاصیت

از مهم ترین ترکیبات عصاره و اسانس گونه های گیاه دارویی اکالیپتوس دانست، به طوری که در تحقیق انجام شده توسط ماندال و همکاران در سال ۲۰۰۱ که بر روی اسانس برگ گونه ای از گیاه اکالیپتوس انجام گرفته، تعداد ۱۷ ترکیب شناسایی شده که اوکالیپتول با ۷۸/۹ درصد، اصلی ترین ترکیب شناسایی شده بوده است [۲۴]. البته نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که از ۴۴ ترکیب شناسایی شده در اسانس گونه اکالیپتوس مورد آزمایش ما، اوکالیپتول فقط ۳۸/۵۶ درصد ترکیبات اسانس را تشکیل داده، هر چند که بیشترین ترکیب موجود در اسانس مذکور نیز بوده است. بنابراین نتایج پژوهش حاضر با یافته های تحقیق مذکور فقط در زمینه بالاتر بودن مقدار اوکالیپتول نسبت به دیگر ترکیبات اسانس هم خوانی دارد در حالی که در خصوص میزان این ماده و نیز تعداد ترکیبات شناسایی شده در اسانس هم خوانی وجود ندارد. از طرف دیگر توزیع طبقه بندی شیمیایی ترکیبات اسانس و عصاره گیاه مورد آزمایش در تحقیق حاضر براساس نتایج به دست آمده از آنالیز آن ها نشان داد که تعداد و میزان مواد مؤثره موجود در اسانس گونه اکالیپتوس میکروتکا به مراتب بیشتر از عصاره آن می باشد. با توجه به این که ترکیب شیمیایی اصلی که در برگ گیاه مذکور وجود دارد، ۱ و ۸- سینئول می باشد که اثر میکروب کشی و ضد التهابی نیز دارد [۲۶، ۲۵]، بنابراین به نظر می رسد که ترکیب مذکور نقش بسزایی در خواص ضد استرپتوکوکی ترکیبات طبیعی تهیه شده از این گیاه داشته و بنابراین ارزش دارویی داشتن عصاره و اسانس مورد آزمایش در تحقیق حاضر را توجیه می کند.

نتیجه گیری

یافته های مطالعه حاضر نشان داد که نانوذره نقره در تلفیق با عصاره و اسانس گیاه اکالیپتوس میکروتکا فعالیت ضد میکروبی مناسبی بر روی باکتری بیماری زای استرپتوکوکوس موتانس دارد (حتی با غلظت ۵۰ درصد نسبت به اسانس و عصاره به تنهایی). این یافته مهم می تواند فرصت مناسبی را برای صنایع داروسازی فراهم کند و به نظر می رسد که با استفاده از ترکیبات مذکور به جای آنتی بیوتیک ها، از افزایش مداوم سوبه هایی از باکتری ها که در اثر مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف منجر به ظهور پاتوزن های Multi Drug Resistance (MDR) می شوند، جلوگیری کند. فناوری نانو هم، بستر مناسبی را برای غلبه بر مشکلات مقاومتی به کمک نانوذرات فراهم می کند چرا که پتانسیل ضد باکتریایی این ترکیبات می تواند توسط دستکاری کردن در اندازه و به دست آوردن سایز جدید افزایش یابد که به احتمال زیاد این امر در تولید مواد ضد میکروبی جهت استفاده در بهداشت دهان و دندان

میلی متر ایجاد کردند. در عین حال زمانی که نتایج آزمایش های آنتی بیوگرام انجام گرفته در مورد این باکتری با استفاده از اسانس، عصاره و نانوذره نقره و تلفیق آن ها، مقایسه می شود، استنباط می شود که عصاره و اسانس گیاه اکالیپتوس میکروتکا و تلفیق عصاره، اسانس و نانوذره نقره با ایجاد مناطق عدم رشدی با میانگین قطر به ترتیب به اندازه $22 \pm 0/3$ ، $20 \pm 0/3$ و $22 \pm 0/3$ میلی متر، خاصیت ضد استرپتوکوکی قوی تری نسبت به دو آنتی بیوتیک متداول ذکر شده را نشان می دهد و براساس نتایج آنالیز آماری هم مشخص شد که بین اثرات ضد استرپتوکوکی اسانس و عصاره گیاه اکالیپتوس میکروتکا و ۳ آنتی بیوتیک استاندارد مورد آزمایش اختلاف آماری معنی دار بالایی وجود دارد ($p < 0/05$). این یافته ها هم با نتایج برخی تحقیقات هم خوانی دارد؛ به طوری که چالشتری و همکاران در مطالعه خود در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که بین اثرات ضد میکروبی اسانس گیاهان زیره، اکالیپتوس و لاوند و آنتی بیوتیک کوتریموکسازول اختلاف آماری معنی دار وجود دارد و در تمام غلظت های مورد استفاده، اسانس اکالیپتوس نسبت به آنتی بیوتیک مذکور اثر بیشتری علیه استافیلوکوکوس ها نشان داده است [۲۱]. همچنین سلیمانی و همکاران نیز در سال ۱۳۸۹ در تحقیق خود نشان دادند که اسانس زیره سیاه در مقایسه با آنتی بیوتیک جنتامایسین در مقابله با باکتری های اشریشیاکولی و باسیلوس-سرتوس نتایج بهتری دارد [۲۲]. از طرف دیگر انزایی و خاکی هم در سال ۱۳۹۴ 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 ایجاد کننده عفونت های مجرای ادراری تأثیر بالاتری داشته، در ضمن قدرت ضد میکروبی این ترکیبات طبیعی دارویی به مراتب بیشتر از آنتی بیوتیک آمیکاسین بوده است [۲۳]. به نظر می رسد که این یافته ها در عین حال، عدم ایجاد خاصیت مقاومت نسبت به ترکیبات گیاهی و طبیعی را هم برخلاف مقاومت های آنتی بیوتیکی نشان می دهد که این امر اهمیت استفاده از این ترکیبات را بیشتر توجیه و توصیه می کند. از طرف دیگر ترکیبات شناسایی شده 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 می باشند، به طوری که بالاترین میزان اوکالیپتول (۴۹/۰۵ درصد) در عصاره و بالاترین میزان آلفا-پینن (۸/۲۹ درصد) در اسانس و نیز بالاترین مقدار گلوبولول (۷/۶۳ درصد) در عصاره گیاه مورد آزمایش ما وجود داشت. به نظر می رسد که براساس نتایج تحقیقات انجام شده توسط سایر محققان و نیز یافته های تحقیق حاضر می توان این ۳ ترکیب را در اکثر موارد،

تشکر و قدردانی

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

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 ضدآستریتوکوکی 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.

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, Bevilacqua 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 chemocology 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, Ramirez 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, Sephehriseresht S, Daneshmandi S. Evaluation of reciprocal pharmaceutical effects and antibacterial activity of *Bunium persicum* essential oil against some Gram

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.