دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

اثرات نانو ذرات مس و اسانس روغنی گیاه بادرنجبویه در مهار رشد باکتری *اشرشیاکلی* و *استرپتوکوکوس موتانس*

نوشین نقش
استادیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان،ایران

زهره نیکبخت
کارشناسی ارشد میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان،ایران

منیره دودی
استادیار میکروبیولوژی ، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان،ایران

نویسنده مسئول: زهره نیکبخت

پست الکترونیک:nikbakhatzohre@yahoo.com

تلفن:۰۹۳۷٦٤٤٨٩٦٨

آدرس: دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان

دریافت:۹۱/۹/۲٦
ویرایش پایانی:۹۲/٤/۲٦
پذیرش:۹۲/٤/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: *شیوه درمانی با گیاهان با عوارض جانبی و مقاومت دارویی کم برای درمان بیماری ها در سراسر دنیا به کار برده می‌شود. در این تحقیق به مقایسه اثرات مهاری نانو ذرات مس و اسانس بادرنجبویه بر E.coli و S.mutans در شرایط In vitro پرداخت شده است.*

روش بررسی: *در این تحقیق به منظور بررسی قطر هاله عدم رشد از روش انتشار دیسک آگار استفاده شد. سپس اثرات ضدباکتریایی این مواد ۲۴ ساعت بعد از تیمار در غلظت های ppm ۱۰۰و۵۰۰ از نانو ذرات مس(۱۰nm) و اسانس روغنی ۱۲/۵ تا ۱۰۰ درصد با استفاده از آزمون ANOVA مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته ها: *نانو ذرات مس ۲۴ ساعت بعد از تیمار هیچ تاثیری بر این باکتری ها نداشت. در حالی که میانگین قطر هاله عدم رشد به ترتیب برای اشرشیاکلی و استرپتوکوکوس موتانس در غلظت های مختلف اسانس روغنی بادرنجبویه برابر ۳۱/۳۰±۰/۱۳mm و ۱۶/۱۳±۰/۱۳ بود. ترکیب غلظت های مختلف اسانس بادرنجبویه و غلظت ۵۰۰ppm نانو ذرات مس بعد از۲۴ ساعت هیچ اثری بر اشریشیاکلی وجود نداشت در حالی که در استرپتوکوکوس موتانس ترکیب غلظت های ۲۵ و ۵۰ درصد اسانس و ۵۰۰ppm نانوذرات مس نسبت به غلظت های اسانس به تنهایی دارای تفاوت معنی داری (p=۰/۰۰۱) ، (p=۰/۰۱) بود .*

نتیجه گیری: *ترکیب نانو ذرات مس و اسانس بر اشرشیاکلی اثر هم افزایی نداشته ولی در بعضی از غلظت های اسانس بر استرپتوکوکوس موتانس اثر هم افزایی داشته است.*

واژه های کلیدی: *اسانس بادرنجبویه، نانوذرات مس، اشریشیاکلی، استرپتوکوکوس موتانس*

آدرس مقاله:
نقش ن، ارم نیکبخت ز، دودی م" اثرات نانو ذرات مس و اسانس روغنی گیاه بادرنجبویه در مهار رشد باکتری اشرشیاکلی و استرپتوکوکوس موتانس" مجله علوم آزمایشگاهی، ویزه نامه ۱۳۹۲ دوره هفتم(شماره۵) : ۱۶-۲۲

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

اثرات ضد میکروبی نانو ذرات مس در مطالعات مختلف بررسی شده است(۱). مشخصات ضد میکروبی نانوذرات نقره و مس در مقابل *اشریشیاکلی* و باسیلوس سوبتیلیس نشان داده که باسیلوس سوبتیلیس حساسیت بالاتری در مقابل نانو ذرات مس (۱۰۰nm) دارد(۱). نقره و مس از قدیم مشهور به دارا بودن فعالیت ضد میکروبی بودند دانشمندان اعتقاد دارند که این فلزات با پروتئین ها از طریق ترکیب شدن با گروه SH آنزیم ها کار خود را انجام می دهند در نتیجه این واکنش ها منجر به غیرفعال شدن این پروتئین ها می شود. محققان وقتی این فلزات را در ذرات خیلی کوچک آماده کردند انتظار داشتند که خواص ضد میکروبی بهتری را از خود نشان دهند. با توسعه نانوتکنولوژی این فلزات در اندازه های نانو تهیه شد و خواص ضد میکروبی آن را در این مطالعه و خیلی از مطالعات دیگر بررسی شد. Yoon و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره با اندازه ۴۰nm و مس با اندازه ۱۰۰nm را گزارش دادند و اعلام کردند که اثر گذاری نانو ذرات مس بیشتر است (۲). امروزه با توجه به اثرات جانبی آنتی بیوتیک ها و مقاومتی که میکروارگانیسم های بیماری زا علیه آنها کسب کرده اند در پزشکی استفاده از عصاره ها و ترکیبات با خواص بیولوژیکی با گونه های گیاهی متداول شده است. در این تحقیق از گیاه بادرنجبویه(*Melissa officinalis(Lemon balm* استفاده شده و اثرات این گیاه بر روی باکتری *اشریشیاکلی* که یک باکتری مسبب انواع عفونت ها در انسان می باشد مورد بررسی قرار گرفته است. گیاه بادرنجبویه یکی از اعضاء خانواده نعنائیان می باشد(۳). اثرات سانس آن به تازگی در داروها وعلم داروشناسی به عنوان ضدسرطان، ضدباکتری، آنتی هیستامین و ضد ویروسی ثابت شده است. همچنین به دلیل خاصیت آنتی اکسیدان برای معالجه هرپس به کار برده شده است. این گیاه باعث کاهش عوارض بیماری آلزایمر می شود و از اثرات دیگر آن می توان به تحریک سیستم ایمنی در مقابل ایدز نام برد (۵،۴). ماده اصلی متشکله اسانس این گیاه، سیترال، سیترونلال، گرانیول، بتا پینین، آلفا پینین، بتا کاریو فیلین می باشد که در بر دارنده ۹۶ درصد از اعضاء تشکیل دهنده این گیاه است(۴). مطالعاتMimica-Dukic و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مورد اسانس این گیاه نشان می دهد که تعدادی از باکتری های بیماری زا های گرم منفی نسبت به اسانس این گیاه حساسند. بروز مقاومت نسبت به عوامل کشنده باکتری ها و همچنین آنتی بیوتیک ها در میان مجموعه باکتری های دهان به ویژه استرپتوکوک های گروه ویریدانس نشان داده شده است(۶ ،۷) پنی سیلین و اریترومایسین از داروهای انتخابی برای درمان عفونت های ایجادشده توسط استرپتوکوک های ویریدانس هستند و این گروه به طور یکنواخت نسبت به عوامل ضد میکروبی بتالاکتام حساس هستند(۶). باکتری استرپتوکوکوس موتانس یکی از باکتری های گرم مثبتی است که در دهان به سر می برد و ازطریق متابولیزه کردن کربوهیدرات های مختلف محیط اسیدی ایجاد می کند قابلیت *S. mutans* برای ساخت گلوکان خارج سلولی عامل بیماری زایی اصلی این باکتری ها بوده و عامل ایجاد کننده ی پوسیدگی های دندانی در حیوانات و انسان است(۸)، از طرفی مطالعات دانشمندان نشان می دهد یکی از عوامل مهم در عفونت های ادراری باکتری *اشریشیاکلی* است. مطابق این پژوهش می توان از اسانس این گیاه برای مقابله با این عفونت ها با انجام آزمایش های در شرایط *In vivo* از اسانس این گیاه استفاده نمود. یکی از آنتی بیوتیک هایی که برای درمان عفونت *اشریشیاکلی* تجویز می کنند سیپروفلوکساسین می باشد(۹،۱۰). شایع ترین عوارض جانبی ناشی از مصرف این آنتی بیوتیک ناراحتی های گوارشی و دستگاه سیستم عصبی است(۱۰) ،در مقابل یکی از این گیاه اثرات آرام بخشی روی اعصاب معده می باشد(۳). هدف از انجام تحقیق بررسی اثرات نانو ذرات مس واسانس بادرنجبویه بر روی باکتری *اشرشیاکلی* و *استرپتوکوکوس موتانس* بود.

Archive of SID

www.SID.ir

روش بررسی

در این تحقیق از سویه استاندارد *اشریشیاکلی* با کد *Escherichiacoli* PTCC1270 تهیه شده از مرکز باکتری های علمی وصنعتی ایران و سویه استاندارد *استرپتوکوکوس موتانس* که از سازمان پژوهش تهران با کد ۱۶۵۸ تهیه شد، استفاده گردید. محیط کشت های مورد استفاده در این تحقیق مولر هینتون آگار و نوترینت براث و Brain Heart Infusion broth (BHI) و Brain Heart Infusion agar (ساخت شرکت Merck;Germany) بود. برگ های گیاه بادرنجبویه به صورت خشک شده به وسیله آسیاب برقی پودر شدند برای تهیه اسانس از این گیاه از دستگاه تقطیر کلونجر استفاده شد که در هر بار اسانس گیری حدود ۵۰۰ گرم از این گیاه داخل بالن دستگاه قرار داده شد. بعد از تهیه ۰/۵-۰/۴ میلی لیتر اسانس داخل یک شیشه جمع آوری و در داخل یخچال دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. نانو ذرات مس به شکل کروی با قطر کمتر از ۱۰ نانومتر تهیه شدند. روش استفاده از احیا کننده های شیمیایی یکی از استانداردترین روش های تهیه نانوذرات می باشد که برای سنتز نانو ذرات مس از آن استفاده شد. در این روش از احیای شیمیایی محلول های نمکی مس توسط عوامل احیا کننده سیترات استفاده شد. استفاده از احیا کننده های ضعیف تر مانند سیترات، با آنکه سرعت احیا را کم می کند، اما کنترل بیشتری را بر روی اندازه ذرات فراهم می کند(۱۱). جهت تایید قطر و شکل نانو ذرات مس از TEM(Transmission Electron Microscopy) استفاده شد. جهت اشباع دیسک ها با اسانس و نانوذرات مس از آزمون تعیین حساسیت بلانک دیسک استفاده شد. با استفاده از DMSO99%(Sigma;Germany) غلظت های مختلف اسانس روغنی ۱۲/۵ و ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ درصد تهیه و برای تهیه غلظت های مختلف نانو ذرات مس از آب دوبار تقطیر استفاده شد. غلظت های ppm ۵۰۰ و ۱۰۰ نانوذرات مس تهیه شد که بر روی دیسک ها به ترتیب به مقدار ۱۰µl و۵۰ µl تلقیح شد(۲) سپس از غلظت ppm۵۰۰ نانو ذره همراه با هر یک از غلظت های مختلف اسانس (از هر یک به مقدارµl ۱۰) بر روی دیسک ها تلقیح شد. از باکتری *E.coli* کشت داده در آگار مغذی و از *S. mutans* کشت داده شده درBHI غلظت معادل استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد و توسط لوپ به ترتیب بر روی پلیت حاوی محیط کشت Moler Hinton Agar(MHA) و Brain Heart Infusion agar (BHIجامد)، پخش گردید. سپس دیسک ها روی محیط کشت در فواصل مناسب قرار داده شدند. به همراه هر ۳ غلظت در یک پلیت حاوی باکتری، یک دیسک آغشته به آب مقطر، و یک دیسک آغشته به دی متیل سولفوکساید (DMSO99%) به ترتیب به عنوان کنترل منفی برای نانو ذرات مس و اسانس قرار داده شد. به منظور مقایسه قطر هاله عدم رشد از آزمونANOVA برای سنجش آماری داده ها از برنامه نرم افزاری SPSS15 استفاده شد و نمودار ها با برنامهExcel رسم گردید.

یافته ها

در این مطالعه میانگین قطر هاله عدم رشد سویه های مورد مطالعه در برابر غلظت های مختلف نانو ذرات مس(ppm۵۰۰،۱۰۰) نزدیک به صفر بود ولی میانگین قطرهاله عدم رشد در برابر غلظت های متفاوت اسانس در *اشریشیاکلی* نزدیک به ۳۰mm بود(جدول ۱). قطرهاله عدم رشد در برابر مخلوط غلظت های متفاوت اسانس و نانو ذرات مس نزدیک به ۳۱mm بود. ولی میانگین قطرهاله عدم رشد در برابر غلظت های متفاوت اسانس در *استرپتوکوکوس موتانس* نزدیک به ۱۶/۱۳±۰/۱۳mm بود(جدول ۲) و قطرهاله عدم رشد در برابر مخلوط غلظت های متفاوت اسانس و نانو ذرات مس نزدیک به ۷۵/۱۵±۰/۱۴mm بود.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱-مقایسه قطر هاله عدم رشد غلظت های مختلف اسانس به تنهایی و همراه با نانو ذرات مس ومقدار p-value درE.coli

غلظت های اسانس(٪)	اسانس به تنهایی (*E.coli*)		اسانس + غلظت ۵۰۰ نانو		p-value
	میانگین قطرهاله ها (mm)	انحراف معیار	میانگین قطر هاله ها	انحراف معیار	
۱۲/۵	۱۱	۱	۱۱	۰/۸	۱
۲۵	۱۳/۸	٦/۱	۷۵ (mm)	۱/۵	۰/۹٦
۵۰	۱۷/۲	۳/۲	۱۵/۲۵	۱/۵	۰/۱۹
۱۰۰	۳۳	۱/۸	۲۵/۳۲	۱/۷	۰/۹٦
p-value	<۰/۰۰۱		۰/۰۰٤		

جدول ۲- مقایسه قطر هاله عدم رشد غلظت های مختلف اسانس به تنهایی و همراه با نانو ذرات مس در S. mutans

غلظتهای اسانس(٪)	اسانس به تنهایی (*S. mutans*)		اسانس + غلظت ۵۰۰ نانو		p-value
	میانگین قطر هاله ها (mm)	انحراف معیار	میانگین قطر هاله ها (mm)	انحراف معیار	
۵/۱۲	۱۰/۲۵	۰/۵	۱۰/۸۳	۱/۳	۰/٤۳
۲۵	۱۱/۵	۱/۳	۱٦/٦	۱/٦	۰/۰۰۱
۵۰	۱۷/۷۵	۱/۷	۱۹/۸۳	۲/۹۹	۰/۰۱
p-value	<۰/۰۰۱		۰/۰۲		

بحث

میانگین قطر هاله عدم رشد بین غلظت های ۱۲/۵ ، ۲۵ ، ۵۰ ، ۱۰۰ درصد از اسانس روغنی برگ های بادرنجبویه به روش دیسک گذاری بر روی باکتریها یکسان نمی باشد. بدین معنی که با افزایش غلظت اسانس قطر هاله عدم رشد افزایش معنی دار داشته است. این روند اثر بر روی این سویه حکایت از این واقعیت داردکه اسانس این گیاه اثر ضد باکتریایی مشخصی داردکه با افزایش غلظت این اثر بیشترمی شود(p=۰/۰۰۱). بنابراین این تاثیر وابسته به دوز (Dose dependent) مـی بـاشد. مکـانیسم این عمـل را می توان تا حدی به افزایش ماده موثر موجود در اسانس روغنی برگ های این گیاه نسبت داد. همچنین بر اساس این آزمون ، میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی* در همه غلظت های مختلف اسانس به تنهایی و در ترکیب با غلظت ۵۰۰ppm نانوذرات مس دارای اختلاف معنی داری نسبت به هم بودند(جدول ۱) اما در *استرپتوکوکوس موتانس* میانگین قطـر هاله عدم رشد در غلظـت های ۲۵ و ۵۰ درصد اسانس به همراه غلظت ۵۰۰ppm نانو ذرات نسبت به اسانس به تنهایی در همین غلظت ها دارای تفاوت معنی داری بود. به عبارت دیگر نانوذرات مس به همراه در غلظت های ۲۵ و۵۰ درصد اسانس روی قطر هاله عدم رشد این باکتری مؤثر می باشد(جدول۲). این نتایج نشان داد که نانو ذرات مس (حداقل در غلظت مورد استفاده) تأثیر کمکی در اثر ضد میکروبی اسانس بادرنجبویه بر روی باکتری *اشرشیاکلی* نداشته است .در غلظت ۵۰۰ppm نانوذرات مس در قطر ۱۰ نانومتری بر روی اسانس روغنی بادرنجبویه دارای اثرات سینرژیک نبود. در حالی که بر روی باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* در غلظت ۲۵ و ۵۰ درصد اسانس تأثیر کمکی در اثر ضد میکروبی اسانس بادرنجبویه بر روی این باکتری داشته است. به عبارت دیگر دارای اثرات هم افزایی بوده است.Kennedy در سال ۲۰۰۴ مطالعـات زیادی روی اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی اسانـس روغنی بادرنجبویه انجـام داد. یـافته هـای به دست

Archive
www.SID.ir

آمده نشان می دهد که این روغن دارای اثرات سیتوتوکسیک در مقابل برخی از رده های سلول های سرطانی انسان مانندMCF-7 ،A569 ،Caco-2 ،Hl-60 و K562 و یک سری از رده های موشی(B16F10) می باشد. همچنین این روغن دارای فعالیت آنتی اکسیدانی است و مکانیسم عملکرد این عصاره از طریق تاثیر بر روی رادیکال های آزاد(Free radicals) می باشد. در تحقیق حاضر نیز ممکن است مکانیسم اثرات اسانس روغنی بادرنجبویه بر روی باکتری *اشرشیاکلی* و *استرپتوکوکوس موتانس* نیز از طریق فعال سازی رادیکال های آزاد و ایجاد آپوپتوزیس باشد. این نتایج اشاره دارد به اینکه از بادرنجبویه به عنوان یک عامل ضد میکروبی می توان استفاده نمود(۱۲). گزارش افزایش میزا MIC کلرهگزیدین و آنتی بیوتیک های بتالاکتام و ماکرولیدی در مورد S.mutans نشان دهنده ی افزایش مقاومت بوده و این مقاومت در ارتباط با مصرف آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت های دندانی است(۱۳ ،۱۴). طبق گزارشی تمام سویه های جدا شده ی استرپتوکوکوس گروه ویریدانس به ترتیب ۲۵ و ۳۳ درصد نسبت به پنی سیلین و اریترومایسین مقاوم بودند(۱۵). در این تحقیق از گیاه بادرنجبویه استفاده شده که از قدیم آن را به عنوان یک آرام بخش ملایم، تقویت کننده قلب و تقویت کننده ذهن و هوش و...استفاده می کردند(۳). با توجه به اثر گذاری اسانس گیاه بادرنجبویه بر روی باکتری *استرپتو کوکوس موتانس* و مقاومت های این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها و محلول هایی مثل کلروهگزیدین شاید به توان از اسانس این گیاه در شرایط *In vivo* استفاده نمود. Ruparelia و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثرات نانو ذرات نقره به قطر ۳ نانو متر و نانو ذرات مس به قطر۹ نانو متر را بر روی باکتری ها بررسی کردند. آنها نشان دادند که باکتری ها نسبت به نانو ذرات نقره بیشتر حساس هستند(۱۶). مطالعاتMimica-Dukic و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مورد اسانس این گیاه نشان داد که باکتری های گرم منفی مانند *سودموناس آئروژینوزا*، *اشرشیاکلی*، *سالمونلا انتریدیس*، *سالمونلا تیفی* و *سویه های شیگلا* که مقاومت های چند گانه در برابر آنتی بیوتیک ها دارند نسبت به اسانس این گیاه حساس هستند به ویژه که بالاترین حساسیت به روغن اصلی بادرنجبویه در سویه استاندارد *E.coli*ATCC 25922(۳۹/۸ mm و۳۰/۲)و چندین سویه حساس از *شیگلاسونئی*(PH-MR) با قطر هاله عدم رشدی معادل(۳۸/۴ mm و ۳۷/۴) به ترتیب در غلظت های ۵۰ درصد و ۲۰ درصد مشاهده شد(۱۷). در این بررسی، سویه باکتری هایی که مورد مطالعه قرار گرفته متفاوت بوده و همچنین غلظت هایی که مورد استفاده قرار گرفته تا حدودی متفاوت می باشند. Sondi وSalopek خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره را در مقابل *E.coli* و Hsiao و همکاران فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مس را تحقیق کردند(۱۸،۱۹). آنها اثبات کردند که نانوذرات نقره و مس روی غشای باکتری ها اثر می کند، به خاطر تغییرات ساختمانی که اتفاق می افتد باعث می شود که پمپ های پروتونی در غشا کارشان کم شود و سرانجام سلول بمیرد. در تحقیق حاضر با توجه به اینکه قطر نانو ذرات متفاوت از تحقیقات دیگر بوده است اثرات ضد باکتریایی آن نیز خیلی کم و قطر هاله عدم رشد در باکتری ها مورد مطالعه در استفاده نانو ذرات به تنهایی نزدیک به صفر می باشد. از طرفی Yoon و همکاران اثرات ضد میکروبی نانو ذرات نقره و مس را بر روی یک سویه از *اشرشیاکلی* و *باسیلوس سوبتیلیس* بررسی کردند. این دانشمندان نشان دادند که اثر گذاری نانو ذرات مس بیشتر است(۲). در این تحقیق قطر، شکل و غلظت نانو ذات و احتمالاً روش تهیه نانو ذرات از تحقیق های قبلی متفاوت بوده است. احتمال دارد با کوچکتر شدن سایز نانوذرات مس در این تحقیق اثر گذاری آنها بر روی غشای باکتری های مذکور کمتر شده باشد. طی تحقیقاتی که دانشمندان بر روی موش ها انجام دادند متوجه شدند که نانو ذرات اثرات زیادی بر روی کبد، طحال وکلیه ها می گذارد نتایج نشان می دهد چندین عامل مانند سطح بسیار بزرگ، واکنش پذیری بالا و مصرف

Archive of SID

www.SID.ir

خـــیلی زیادH^+ باعث افزایش سمیت نانوذرات مس(17mμ) می شود(۲۰). در این تحقیق قطر نانوها در حدود ۱۰ نانومتر است که با انجام آزمایش های بیشتر در محیـط *In vivo* بر روی مـوش ها و اثبات عدم اثرات زیانبار در این غلظت و قطر بر روی سلول های موش، می توان از این نانوذرات در سنتز نانوترکیبات گیاهی برای موش و انسان کمک گرفت. یکی دیگر از مکانیسم های بی تاثیر بودن نانوذرات مس بر روی باکتری را می توان به وجـود ژن هـای مـقاومـت بـه یـون ها بـــر روی پـلاســمـیـد در بـاکـتـری هـا نـسبـت داد(۲۱). مـمکن اســـت که این ســویه مورد مطالعه در این تحقیق با مکانیسم هایی که گفته شد مانع اثر گذاری نانو ذرات مس شده باشد.

نتیجه گیری

از اسانس گیاه بادرنجبویه با انجام تحقیقات بیشتر در شرایط*in vivo* می توان برای درمان بیماری های عفونی حاصل از این باکتری ها در انسان استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از زحـمات کلیه کارکنان پژوهشی دانشگاه آزاد اسـلامی واحـد فـلاورجـان کـمـال تشـکر را داریـم.

References

1. Braydich-Stolle L, HussainSSchlager JJ, Hofmann M. *In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells*. Toxocological Sciences. 2005; 88(2): 412–419.

2. Yoon KY, Hoon Byeon J, Park JH, Hwang J. *Susceptibility constants of Escherichiacoli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles*. Science of the Total Environment. 2007; 373(2-3): 572–575.

3. Keskin D, OskayD, Oskay M. *Antimicrobial activity of selected plant spices marketed in the West Anatolia*. Int J Agric Biol. 2010; 12(6): 916–920.

4. Bahtiyarca Bagad R. *These Essential Oilof Lemon Balm(Melissa officinalis L.), Its component and using fields*. J of Fac of Agric, OMU. 2006; 21(1): 116-121.

6. Eley BM. *Antibacterial agents in the control of supragingival plaque: a review*. Br Dent J 1999; 186(6): 286-96.

7. Dever JG, Beck DJ, Tagg JR. *Oral changes associated with six months' exposure to chlorhexidine*. J Dent Res. 1982; 61: 529.

8. Biswas S, Biswas I. *Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by Streptococcus mutans*. InfecImmun. 2005; 73(10): 6923-6934.

9. Moradkhani H, Sargsyan E, Bibak H, Naseri B, Sadat-Hosseini M, Fayazi-Barjin A, et al. *Melissa officinalis L., a valuable medicine plant: A review*. Journal of Medicinal Plants Research. 2010; 4(25): 2753-2759.

10. Talan DA. *Treatment of complicate Urinary Tract infection Emerging Role of extended-release Ciprofloxacin*. Business Briefing: Long – term healthcare Techonoloy&Services. 2004.

11. Moaddab S, Ahari H, Shahbazzadeh D, Motallebi AA, Anvar AA, Rahman-Nya J, et al. *Oxicity Study of Nanosilver on Osteoblast Cancer Cell Line*. Int Nano Lett. 2011; 1(1): 11-16.

12. Kennedy DO, Little W, Scoley AB. *Attenuation of laboratory – induced stress in humans after acute administration of Melissa officinalis(lemonbalm* Psychosom Med. 2004; 66(4): 607-13.

13. Castillo A, Li´ebana J, L´opez E, Baca P,Jos´e M, Li´ebana M, Li´ebana J. *Interference of antibiotics in the growth curves of oral streptococci*. Internat J Antimicrob Agent. 2006; 27(3): 263-266.

14. Castillo A, Li´ebana J, L´opez E, Baca P,Jos´e M, Li´ebana M, Li´ebana J. *Interference of antibiotics in the growth curves of oral streptococci*. Internat J Antimicrob Agent,
2006; 27(3): 263-266.

15. Wayne A, Little Thomson L, Bowen WH. *Antibiotic susceptibility of streptococcus mutans: comparison of serotype profiles*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1979; 15(3): 440-443.

16. Ruparelia JP, ChatterjeeAK, Duttagupta SP, Mukherji *S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles*. Acta Biomater. 2008; 4(3): 707-16.

17. Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, and Simin N. *Antimicrobial and Antioxidant Activities of Melissa officinalis L. (Lamiaceae) essential Oil*. J Agric Food Chem. 2004 ; 52(9): 2485-9.

18. Sondi I and Salopek-Sondi B. *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteri*. Journal of Colloid and Interface Science. 2004; 275(1): 177–182.

19. Hsiao MT, ChenSF, Shieh DB, Yeh CS. One-pot synthesis of hollow Au3Cu1 spherical-like and biomineralbotallackite Cu2(OH)3Cl flowerlike architectures exhibiting antimicrobial activity. J Phys Chem B. 2006;110(1): 205-210.

20. Ojo AO, Heerden EV, Piater LA. *Identification and initial characterization of a copper resistant south afican mine isolate*. African Journal of Microbiology Research. 2008; 2: 281-287.

21. Chen Z, Menga H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G. *Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo*. Toxicology Letters. 2006; 163: 109–120.

Archive of SID

www.SID.ir