مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۴، شماره۶ ویژه نامه۳، زمستان ۱۳۹۰، ۷۰-۶۴

اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره علیه بروسلا ملی تنسیس ۱۶M در شرایط آزمایشگاهی مدل حیوانی

حامد علیزاده[۱]، مجتبی صلوتی[۲*]، رضا شاپوری[۳]، پیمان عبداله زاده[۱]، جواد ناصریان[۴]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران
۲- دانشیار، دکترای فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۳- استادیار، دکترای میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۴- مربی، گروه آمار و ریاضی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت ۹۰/۷/۱۳، تاریخ پذیرش ۹۰/۱۰/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: بروسلوزیس یکی از رایج‌ترین عفونت مشترک بین انسان و حیوان در جهان می باشد. میزان شیوع این عفونت بسیار بالا و در بسیاری از کشورها اندمیک است. طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت، شیوع بروسلوزیس مشترک بین انسان و حیوان در کشورهای منطقه مدیترانه، خاورمیانه و کشورهای آسیای غربی در حال گسترش است. هدف از این مطالعه، بررسی استفاده از نانو ذرات نقره در مقابله با بروسلوزیس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، فعالیت نانو ذرات نقره علیه بروسلا ملی تنسیس ۱۶M با استفاده از روش انتشار چاهکی در آگار بررسی گردید. حداقل غلظت مهار کننده رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری به روش ماکرودیلوشن تعیین گردید. هم چنین اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره در مدل موشی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که نانو ذرات نقره باعث مهار باکتری حتی در غلظت‌های پایین می‌گردند. حداقل غلظت مهار کننده رشد و حداقل غلظت کشنده نانو ذرات نقره به ترتیب ۴ppm و ۶ppm در روش ماکرودیلوشن بود. اثر ضد بروسلایی نانو ذرات نقره در مدل موش نیز مشاهده گردید.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که نانو ذرات نقره می‌توانند در مقابله با بروسلوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اثر ضد میکروبی، بروسلوزیس، بروسلا ملی تنسیس ۱۶M، نانوذرات نقره

***نویسنده مسئول:** زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، مرکز تحقیقات بیولوژی

Email: saloutim@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بروسلوزیس رایج‌ترین بیماری مشترک بین انسان و حیوان با گسترش جهانی است که توسط باکتری‌های گرم منفی بی‌هوازی اختیاری و درون سلولی جنس بروسلا ایجاد می‌شود(۳-۱). درمان بروسلوزیس انسانی با آنتی بیوتیک‌های رایج، بسیار طولانی مدت و پر هزینه است(۲). بروسلا ملی تنسیس به طور وسیعی در کشورهای خاورمیانه منتشر شده است(۲). بروسلوزیس به صورت یک مشکل عمومی در سلامت انسان و دام و نیز به عنوان یک مشکل اقتصادی در دامپروری در بسیاری از کشورهای توسعه نیافته و در حال توسعه باقی مانده است(۳). این بیماری به طور معمول منجر به سقط جنین در پستانداران باردار و التهاب بیضه در پستانداران نر می‌گردد. این بیماری با تب مواج، آرتریت، اندوکاردیت و استئومیلیت در انسان همراه است(۳ ،۴). بروسلا ملی تنسیس بیماری‌زایی بیشتری نسبت به سایر گونه‌های بروسلا در انسان دارد(۵). امروزه درمان دو آنتی بیوتیکی برای بروسلوزیس مورد استفاده است که علاوه بر عود مجدد بیماری پس از درمان با آنتی بیوتیک‌ها و مقاومت‌های دارویی، عوارض ناخواسته در کودکان زیر ۸ سال و زنان باردار را در پی‌دارد(۶). سازمان بهداشت جهانی تعداد موارد جدید بیماری بروسلوزیس را ۵۰۰ هزار مورد در هر سال گزارش نموده است و این در حالی است که این مقدار بسیار کمتر از میزان واقعی محاسبه شده برای بروز بروسلوزیس انسانی است(۷). نیاز به درمان چند دارویی، طولانی مدت بودن دوره درمان و شکست‌های درمانی، دانشمندان را مجبور به یافتن راه‌های درمانی جدید برای بروسلوزیس نموده است(۸).

نانو ذرات نقره خواص ضد میکروبی قوی دارند به طوری که ثابت شده است نانو ذرات نقره علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها اثر ضد میکروبی دارند(۹). با این که مکانیسم اثر نانو ذرات نقره بر روی میکروب‌ها کاملاً مشخص نشده است اما در مورد باکتری‌ها، احتمال می‌رود که یون‌های نقره باعث ایجاد آسیب‌هایی در غشای سلولی باکتری‌ها می‌گردند(۹). نانو ذرات نقره، ذراتی با اندازه ۱۰۰-۱ نانومتر هستند که استفاده از آنها در مقابله با عفونت‌ها روز به روز در حال افزایش است به طوری که نانو ذرات نقره امروزه به طور وسیعی در پزشکی جهت مقابله با میکروب‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۲-۱۰). با این که اثرات ضد میکروبی نانو ذرات نقره بر روی باکتری بروسلا ملی تنسیس ۱۶M بررسی نشده است، اما مطالعات مشابهی بر روی میکروب‌های مختلف نظیر باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و مخمرها انجام شده است(۱۳). هدف از مطالعه حاضر، بررسی فعالیت آنتی باکتریال نانو ذرات نقره بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی برای یافتن راه درمانی جدید جهت مقابله با بروسلوزیس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سویه باکتریایی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M از بانک میکروبی مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان تهیه گردید. موش‌های بالب سی (Balb/c) ماده ۸-۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. نانو ذرات نقره با اندازه ۱۸-۳ نانومتر با نام تجاری Nanocolloid از شرکت نانوسید (Nanocide) تهیه شد. تمامی محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت مرک تهیه گردید.

جهت بررسی اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره با روش انتشار چاهکی (Well Diffusion Method) ابتدا از باکتری بروسلا ملی تنسیس تهیه شده، روی محیط کشت بروسلا آگار کشت داده شد. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد CO_2 از کلونی‌های سطح محیط کشت برداشته شد و از آن سوسپانسیون باکتریایی با کدورت معادل نیم مک فارلند در نرمال سالین استریل تهیه شد. پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار آماده گردید و در وسط هر کدام از آنها یک چاهک به قطر حدود ۶ میلی‌متر حفر شد. از سوسپانسیون بروسلای تهیه شده، با سوآپ استریل یک بار برداشته و در سه جهت بر روی پلیت‌های مذکور کشت

Archive of SID

www.SID.ir

داده شد. غلظت‌های صفر، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۴۰۰۰ ppm(قسمت در میلیون) از نانو ذرات نقره در آب مقطر دیونیزه در داخل میکروتیوب‌های استریل تهیه گردید. به طور جداگانه به مقدار ۸۰ میکرولیتر از نانو ذرات نقره فوق با غلظت‌های مذکور در چاهک‌ها ریخته شد. یک پلیت با چاهک حاوی آب مقطر دیونیزه استریل به عنوان پلیت کنترل در نظر گرفته شد. پلیت‌ها در انکوباتور به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید و پس از آن قطر هاله‌های عدم رشد باکتری با کم کردن قطر چاهک از قطر هاله عدم رشد محاسبه گردید. تمامی مراحل فوق به منظور کاهش خطا با ۳ بار تکرار انجام شد(۱۴، ۱۵).

به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (Minimum Inhibitory Concentration- MIC) و حداقل غلظت کشنده باکتری (Minimum Bactericidal Concentration-MBC) نانو ذرات نقره که برای مهار رشد بروسلا ملی تنسیس ۱۶M مورد نیاز است، از روش براث دیلوشن (Broth Dilution Method) استفاده شد. نانو ذرات نقره با غلظت‌های صفر، ۱، ۲، ۵،۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۴۰۰۰ ppmدر محیط کشت مولر هینتون براث تهیه گردید. باکتری‌های مذکور با غلظت 5×10^5 CFU/ml (باکتری در هر میلی‌لیتر) در محیط دارای غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره تنظیم شدند. یک لوله فاقد نانو ذرات نقره به عنوان لوله کنترل در نظر گرفته شد. تمامی لوله‌ها با پنبه استریل پوشانده شدند. لوله‌های آماده شده به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. تعیین MIC بدین صورت بود که ابتدا لوله‌ها در روی شیکر کاملاً مخلوط شدند و پس از آن از مایع داخل هر یک از لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سمپلر برداشته و بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل گردید و با استفاده از آنس استریل بر روی محیط کشت پخش گردید. پلیت‌های تهیه شده به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با شرایط مذکور انکوبه شدند. اولین لوله از غلظت‌های پایین نانو ذرات نقره که فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بود به عنوان غلظت MIC و اولین لوله از غلظت‌های نانو ذرات نقره که در آنها ۹۹/۹ درصد از مقدار اولیه باکتری‌های اضافه شده از بین رفته و در ساب کالچر فقط ۰/۱ درصد از باکتری‌ها رشد کرده بودند به عنوان غلظت MBC برای نانو ذرات نقره محاسبه گردید. تمام مراحل فوق با ۳ بار تکرار انجام گردید(۱۴، ۱۶).

برای بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره در مدل حیوانی، از موش‌های بالب سی ماده ۸-۶ هفته‌ای استفاده شد. ۱۵ سر موش ماده بالب سی به ۳ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول تیمار با جنتامایسین، گروه دوم تیمار با نانو ذرات نقره و گروه سوم به عنوان گروه شاهد، با نرمال سالین استریل تیمار گردیدند. به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی جهت ایجاد عفونت در موش‌ها، از کشت ۴۸ ساعته بروسلا ملی تنسیس ۱۶M، سوسپانسیون ۰/۵ مک‌فارلند که حاوی $1/5\times10^8$ باکتری در هر میلی‌لیتر بود، تهیه شد. سوسپانسیون مذکور با نسبت ۱:۳۰۰ در نرمال سالین استریل رقیق شد تا میزان باکتری‌های موجود در سوسپانسیون میکروبی جهت تزریق، به تعداد 5×10^5 باکتری در هر میلی‌لیتر برسد. در روز اول به تمام گروه‌ها، تعداد 5×10^5 باکتری به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در روز دوم، ۵۰۰ میکرولیتر آنتی بیوتیک جنتامایسین با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به موش‌های گروه اول، ۵۰۰ میکرولیتر از نانو ذرات نقره معادل با غلظت MBC به صورت داخل صفاقی به موش‌های گروه دوم و ۵۰۰ میکرولیتر نرمال سالین به گروه سوم به صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از ۷ روز، موش‌ها با بیهوشی در دسیکاتور حاوی اتر کشته شدند و طحال حیوانات در شرایط استریل خارج گردید. سپس طحال حیوانات در بافر فسفات سالین استریل به مقدار ۵ میلی‌لیتر هموژنیزه شد. از سوسپانسیون هموژنیزه طحالی، با پورپلیت کردن بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت انجام گردید. پلیت‌های مذکور در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵ درصد CO_2 به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از آن شمارش کلونی‌های بروسلا با استفاده از شمارش‌گر کلونی انجام گردید(۱۷).

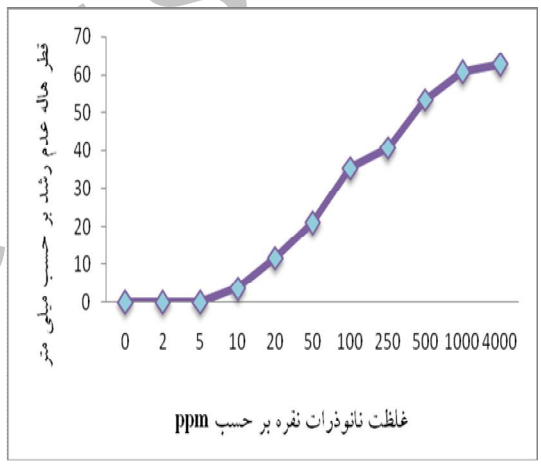
Archive of SID

www.SID.ir

به منظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل، تست کروسکال والیس در نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ مورد استفاده قرار گرفت. در این آزمون $p< ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

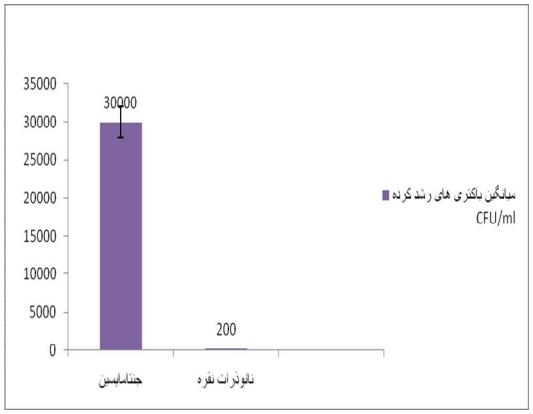
نتایج بررسی روش انتشار چاهکی در آگار نشان داد که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره در داخل چاهک‌ها، قطر هاله عدم رشد باکتری بروسلا ملی تنسیس ۱۶M بیشتر شده است. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری و مقایسه آن در نمودار ۱ آمده است.



نمودار۱. مقایسه میانگین و انحراف معیار قطر هاله عدم رشد بروسلا ملی تنسیس ۱۶M در مجاورت غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره

میزان MIC برای بروسلا ملی تنسیس ۱۶M برابر ppm ۴ می‌باشد و میزان MBC برای این باکتری ۶ ppm تعیین گردید.

در مدل حیوانی، آنالیز آماری نتایج مربوط به بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M در موش‌های بالب سی نشان داد که، اختلاف معنی‌داری در بین سه گروه تیماری مختلف مورد مطالعه وجود دارد. در نمودار ۲ نتایج مربوط به مدل حیوانی گروه‌های تیماری مورد آزمایش با هم مقایسه گردیده است. همان طور که مشاهده می‌شود نانو ذرات نقره به طور قابل توجهی اثر قوی‌تری در از بین بردن بروسلا ملی تنسیس ۱۶Mنسبت به جنتامایسین دارد. گروه‌های تیماری نانوذرات نقره و جنتامایسین، تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل که با نرمال سالین تیمار شده بودند، نشان دادند. البته در گروه تیمار با نرمال سالین (کنترل) بیش از 5×10^{10} cfu/ml باکتری رشد کرده بود که در نمودار ۲ نشان داده نشده است.



نمودار۲. مقایسه اثر نانو ذرات نقره بر بروسلا ملی تنسیس ۱۶M در مدل حیوانی

بحث

امروزه مدیریت درمان بروسلوزیس بسیار بحث برانگیز است به طوری که سازمان‌های بهداشتی در سراسر دنیا درمان بروسلوزیس را همواره جز اولویت‌های خود قرار می‌دهند. از سوی دیگر، طبق گزارشات منتشر شده، افزایش مقاومت‌های آنتی بیوتیکی باکتری‌های جنس بروسلا می‌تواند یکی از دلایل شکست‌های درمانی بروسلوزیس باشد(۱۸، ۱۹).

در تحقیق حاضر اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج حاصل از انتشار چاهکی ملاحظه می‌شود که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره، قطر هاله عدم رشد باکتری، افزایش یافته است. از سوی دیگر، تفاوت قطر هاله‌های عدم رشد از غلظت ۱۰ppm تا ۵۰۰ppm با افزایش و یا کاهش غلظت نانوذرات نقره تفاوت زیادی نسبت به غلظت‌های خارج از این محدوده دارد به طوری که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره از ۵۰۰ppm قطر هاله عدم رشد باکتری چندان افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

نمی‌یابد ولی با این حال قطر هاله عدم رشد کاملاً وابسته به دوز مصرفی نانو ذرات نقره است که نشان دهنده تاثیر نانوذرات نقره بر روی بروسلا ملی تنسیس M ۱۶ است. این یافته‌ها با نتایج حاصل از پژوهش کیم و همکاران که مطالعه مشابهی بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی و نیز با مخمر انجام داده‌اند، مطابقت دارد(۱۲). نتایج روش ماکرودیلوشن نشان داد که نانو ذرات نقره در غلظت‌های پایین می‌توانند از رشد باکتری بروسلا ملی تنسیس ۱۶M جلوگیری کنند که این نتایج با یافته‌های حاصل از تحقیقات سوندی و همکاران که بر روی اشریشیاکلی کار می‌کردند هم خوانی دارد(۲۰).

در سال ۲۰۰۹ آیلا نیلدا و همکاران توانستند باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را با استفاده از نانو ذرات نقره مهار نمایند. آنها با استفاده از روش انتشار چاهکی در آگار اثر ضد باکتریایی نانوذره نقره را ثابت کردند سپس با روش ماکرودیلوشن توانستند حداقل غلظت ممانعت کننده رشد یا همان MIC را برای آن تعیین نمایند(۱۳). در پژوهش دیگری رفیعی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مصر توانستند باکتری‌های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس را با استفاده از نانو نقره در محصول پنبه کنترل نمایند(۲۱). هومبرتو و همکاران(۲۲) در سال ۲۰۱۰ در مکزیک اثر مهاری نانو ذرات نقره را بر روی باکتری‌هایی که مقاومت‌های دارویی زیادی از خود نشان می‌دهند (باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی مقاوم به آمپی سیلین، استرپتوکوکوس پایوژنز مقاوم به اریترومایسین) بررسی نمودند و مشاهده کردند که نانوذرات نقره اثر باکتریوستاتیک قابل ملاحظه‌ای بر روی این باکتری‌ها دارند. هم چنین مورونس و همکاران در سال ۲۰۰۵، اثرات آنتی باکتریال نانو ذرات نقره را علیه باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی، ویبریو کلرا، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی را ثابت نمودند و اظهار داشتند که نانو ذرات نقره به سطح غشای سلول باکتری متصل می‌شوند و پس از آن به درون باکتری نفوذ نموده و با رها سازی یون‌ها خاصیت آنتی میکروبی خود را نشان می‌دهند. تا کنون اثرات ضد باکتریایی نانو ذرات نقره در مدل حیوانی چندان مطالعه نشده است اما در مطالعه حاضر، نتایج اثرات آنتی باکتریال نانو ذرات نقره در موش‌های بالب سی نشان داد که این ذرات می‌توانند در مدل حیوانی نیز آثار ضد باکتریایی خود را حفظ کنند. آنالیز آماری نتایج مدل حیوانی نشان داد که نانو ذرات نقره اثر ضد بروسلایی بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک جنتامایسین دارند.

نتیجه گیری

نانو ذرات نقره اثر ضد میکروبی بر روی بروسلا ملی تنسیس ۱۶M دارد و می‌توان با انجام مطالعات کامل‌تر از آن در مقابله با بروسلوزیس استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از کارکنان مرکز تحقیقات بیولوژی و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان که امکان اجرای این مطالعه را فراهم آورده‌اند و هم‌چنین آقایان حسین حمزه‌ای و محسن اجلی کمال تشکر و قدردانی را به جا می‌آورند.

منابع

1. Ohishi K, Zenitani R, Bando T, Goto Y, Uchida K, Maruyama T, et al. Pathological and serological evidence of Brucella-infection in baleen whales (Mysticeti) in the western North Pacific. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases.2003; 26(2): 125-36.
2. Covert J, Eskra L, Splitter G. Isolation of Brucella abortus total RNA from B. abortus-infected murine RAW macrophages. Journal of microbiological methods. 2005;60(3):383-93.
3. Erdogan S, Celik S, Aslantas O, Kontas T, Ocak S. Elevated cAMP levels reverse Brucella melitensis-induced lipid peroxidation and stimulate IL-10 transcription in rats. Research in veterinary science. 2007;82(2):181-6.

Archive of SID

www.SID.ir

4. Skendros P, Pappas G, Boura P. Cell-mediated immunity in human brucellosis. Microbes and Infection. 2011;13(2):134-42.
5. Zygmunt MS, Hagius SD, Walker JV, Elzer PH. Identification of Brucella melitensis 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. Microbes and Infection. 2006;8(14-15):2849-54.
6. Ravanel N, Gestin B, Maurin M. In vitro selection of fluoroquinolone resistance in Brucella melitensis. International journal of antimicrobial agents. 2009;34(1):76-81.
7. WHO. Fact sheet N 173. Geneva Switzerland: World Health Organization. July 1997.
8. Trujillano-Martín I, García-Sánchez E, Martínez IM, Fresnadillo MJ, García-Sánchez JE, García-Rodríguez JÁ. In vitro activities of six new fluoroquinolones against Brucella melitensis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1999;43(1):194-5.
9. Marambio-Jones C, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. Journal of Nanoparticle Research. 2010;12(5):1531-51.
10. Ahamed M, AlSalhi MS, Siddiqui M. Silver nanoparticle applications and human health. Clinica Chimica Acta. 2010;411(23-24):1841-8.
11. Choi O, Yu CP, Esteban Fernández G, Hu Z. Interactions of nanosilver with Escherichia coli cells in planktonic and biofilm cultures. Water research. 2010;44(20):6095-103.
12. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2007;3(1):95-101.
13. Ayala-Núñez NV, Lara Villegas HH, del Carmen Ixtepan Turrent L, Rodríguez Padilla C. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant staphylococcus aureus: Nanoscale does matter. Nanobiotechnology. 2009; 5(1):2-9.
14. Kora AJ, Arunachalam J. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on Pseudomonas aeruginosa and its mechanism of action. World journal of microbiology & biotechnology. 2011;27(5):1209-16.
15. Kora AJ, Manjusha R, Arunachalam J. Superior bactericidal activity of SDS capped silver nanoparticles:Synthesis and characterization.Materials Science and Engineering: C.2009;29(7):2104-9.
16. Trujillano MI, Garcia SE, Martinez IM, Fresnadillo MJ, Garcia SJE, Garcia RJA. In vitro activities of five new antimicrobial agents againts Brucella melitensis. Int J Antimicrob Agxents.1999;12(2):185-6.
17. Naeini A, Khosravi A, Tadjbakhsh H, Ghazanfari T, Yaraee R, Shokri H. Evaluation of the immunostimulatory activity of Ziziphora tenuior extracts. Comparative Clinical Pathology. 2010;19(5):459-63.
18. Godfroidand Annemarie J. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. Veterinary microbiology. 2002; 90(1-4):135-45.
19. Kilic S, Dizbay M, Hizel K, Arman D. In vitro synergistic activity of antibiotic combinations against Brucella melitensis using E-test methodology. Brazilian Journal of Microbiology. 2008;39(2):233-7.
20. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science. 2004;275(1):177-82.
21. Rafie M, Mohamed AA, Shaheen A. Hebeish. Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles Produced by Fungal Process on Cotton Fabrics. Carbohydrate Polymeris. 2010; 80:779-82.
22. Lara HH, Ayala-Núnez NV, Ixtepan Turrent LC, Rodríguez Padilla C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology.2010; 26(4):615-21.

Archive of SID

www.SID.ir