ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی نانوذره دی اکسید تیتانیوم، EDTA و سیر بر سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از روش استاندارد میکرودایلوشن

مینا سعادت[۱*]، شهلا رودبارمحمدی[۲]، رمضانعلی خاوری‌نژاد[۳]، الهام تقوی[٤]

چکیده

فساد میکروبی یکی از مسائل دارای اهمیت در صنعت غذا بوده که در افراد مستعد مانند کودکان و کهنسالان این مسئله نمود بیشتری دارد. در این مطالعه خواص ضد باکتریایی دی اکسید تیتانیوم به عنوان یک عامل شیمیایی خود تمیز شونده و EDTA و سیر با استفاده از روش استاندارد میکرودایلوشن (رقت‌سازی) ارزیابی گردید.

نانوذره TiO_2 از طریق هیدرولیز $TiCl_4$ بدست آمد. پس ازافزودن آب مقطر دیونیزه و ۵ ساعت گردش محلول در دمای ºC ۱۰۰–۸۰ خشک شد و در ۵۵۰ºC به فرم کریستالی در آمد. اندازه و نوع ذرات بوسیله میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) و X-Ray-Diffraction (XRD) تعیین شد. سودوموناس آئروژینوزا سویه(ATCC۲۷۸۵۳) بر روی محیط نوترینت آگار(NA) کشت داده شد و پس از 24 ساعت نگهداری در ۳۷ºC سوسپانسیونی با غلظت 1×10^6 cell/ml تهیه گردید. تست حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) آن روی TiO_2 ، سیر ، EDTA , ایمی پنم بر روی سودوموناس ارزیابی شد.

بررسی شکل و قطر نانوذره با SEM نشان داد که ذرات کروی ، با قطر 40-65nm می‌باشند. MIC عوامل TiO_2 و EDTA و سیر و ایمی پنم به ترتیب ٤٠و۲٤/۹۲ و۲/۲ و ۰/٤۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در این مطالعه نانوذره TiO_2 با روش شیمیایی سنتز و نشان داده شد که دارای خاصیت ضد باکتریایی مطلوبی نسبت به سایر مهار کننده‌های معمول است. لذا نانو ذره می‌تواند ترکیب مناسبی جهت حذف سودوموناس در صنعت غذا به ویژه در ارتباط با بسته بندی و پوشش مواد غذایی باشد.

واژگان کلیدی: *عامل ضد باکتریایی، سودوموناس آئرژینوزا، نانوذره دی اکسید تیتانیوم*

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۱٤

مقدمه

امروزه فناوری نانو در عرصه‌های مختلف صنعتی، بهداشتی، پزشکی و غذایی تاثیر با اهمیتی بر جای گذاشته است. قاعدتا یکی از تاثیرگذارترین اثر فناوری نوین در زندگی بشر، به مقوله صنعت غذا بر می‌گردد. به دلیل نیاز روزمره انسان به مواد غذایی هرگونه تغییر در کیفیت و کمیت موادغذایی تاثیر بسزایی در بهداشت و سلامت جامعه خواهد داشت. زدودن آلودگی‌های میکروبی از مواد غذایی در هر یک از مراحل تولید، نگهداری و عرضه موادغذایی قابل اهمیت است(١٦). وجود مواد اولیه سالم به ویژه مواد پر مصرفی مانند انواع پروتئین‌ها از اهمیت تغذیه‌ای و بهداشتی فراوانی برخوردار است، چرا که در صورت آلوده بودن مواد غذایی بروز اپیدمی‌های خطرناکی قابل انتظار است. آشناترین مثال، آلودگی سطح خارجی ماهیان و سایر فراورده‌های دریایی، با باکتری‌های گرم منفی از جمله سودوموناس می‌باشد که میزان آلودگی با رشد سودوموناس شدیدا افزایش یافته و به دنبال آن پروتئولیز و تجزیه پروتئین‌های ماهی و فساد مواد غذایی اتفاق می‌افتد(١٤). سودوموناس آئروژینوزا ارگانیسمی متحرک با ابعاد ۲–۰/٦ میکرون است که بـه سهولت در انواع محیط‌های کشت رشد می‌کند. سودوموناس آئروژینوزا عامل عفونت‌های ریـه در افراد

۱*- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهـران، ایران Email:saadat.mina@gmail.com

۲- گروه قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

٤- دانش آموخته کارشناسی‌ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، سبزوار، ایران

Archive of SID

www.SID.ir

مبتلا به سیستیک فیبروزیس و همچنین افرادی که از دستگاه تنفس مصنوعی استفاده می‌کنند، است. این باکتری عامل عفونت‌های پوستی در افراد دچار سوختگی، عامل سپتی سمی در بیماران با سیستم ایمنی ضعیف می‌باشد. ایجاد عفونت‌های موضعی و منتشر بعد از عمل جراحی و عفونت‌های انسداد مجرای ادراری در افراد دارای کاتتر از دیگر اشکال بالینی عفونت می‌باشد. این باکتری به طور وسیع در طبیعت وجود داشته و به طور شایع از محیط‌های مرطوب بیمارستانی جدا شده‌اند(۱۸و۱). در این تحقیق خاصیت ضد میکروبی نانوذره اکسید تیتانیوم در مقایسه با عامل گیاهی سیر و عامل شیمیایی EDTA و آنتی بیوتیک وسیع الطیف ایمی پنم جهت مهار رشد باکتری شایع سودوموناس مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

۱ـ کشت نمونه باکتری

سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ در محیط کشت نوترینت آگار به منظور رسیدن به تک کلنی به مدت ۲۴–۱۸ در دمای ۳۵ درجه کشت داده شد.

۲ـ تهیه سوسپانسیون میکروبی

از کشت ۲۴–۱۸ساعته باکتری، تک کلنی به سرم فیزیولوژی استریل افزوده و ورتکس گردید تا سوسپانسیونی با کدورت نیم مک فارلند حاصل گردد، سپس سوسپانسیون حاصله به نسبت ۱ به ۱۰۰ با سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد تا سوسپانسیونی با غلظت ۱×۱۰۶ باکتری در هر میلی لیتر به دست آید.

۳ـ تهیه رقت‌های مختلف از EDTA دی پتاسیک

از پودر EDTA دی پتاسیک، استوک آبی تهیه و رقت های مختلف آن جهت انجام تست میکرودایلوشن تهیه و فیلتر گردید. رقت‌های تهیه شده عبارت بودند از (بر حسب گرم بر میلی‌لیتر):

۰/۱۶۱۷، ۰/۱۴۱۵، ۰/۱۲۱۳، ۰/۱۰۱۱، ۰/۰۸۰۸، ۰/۰۶۰۶، ۰/۰۴۰۴، ۰/۰۲۰۲، ۰/۰۰۸۰۹، ۰/۰۰۴۰۴، ۰/۰۰۳۲۳، ۰/۰۰۲۴۳

۴ـ تهیه رقت‌های مختلف از سیر

ابتدا سیر را به صورت پودر در آورده سپس از آن استوک آبی در رقت‌های مختلف تهیه می‌کنیم.

۵ـ تهیه رقت‌های مختلف ازآنتی بیوتیک وسیع الطیف ایمی پنم

با توجه به حلالیت مناسب این آنتی بیوتیک در آب مقطر استریل، استوک آبی آن تهیه شد و رقت‌های مختلف آن جهت انجام آزمون استفاده شد. رقت‌های تهیه شده برحسب گرم بر میلی‌لیتر عبارت بودند از:

۰/۰۰۸، ۰/۰۱۰، ۰/۰۱۲۵، ۰/۰۱۶، ۰/۰۲۵

۶ـ آماده سازی نانوذره TiO_2

۱۰ میلی لیتر از پیش ماده $Ticl_4$ در آب مقطر دیونیزه و اتانول به نسبت ۵ به ۱ حل شده پس از انجام واکنش هیدرولیزاسیون و پلیمریزاسیون ، TiO_2 کلوئیدی (TiO_2 سُل) بدست می‌آید. این محصول در کوره با حرارت 550^{oC} به مدت ۲ ساعت قرار گرفته تا پودر سفید TiO_2 حاصل شود.

۷ـ تهیه رقت های مختلف از نانوذره TiO_2

جهت انجام تست میکرودایلوشن ابتدا رقت‌های متوالی ۲۰۰ ..... ،۱۰،۲۰،۳۰،۴۰،۵۰،۶۰، ۱،۳،۵ میکرولیتر را از محلول کلوئیدی TiO_2 (سل) در آب مقطر تهیه و سپس با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل گردید.

بررسی با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ(SEM)

در این مطالعه جهت بررسی ساختار نانو ذره، میکروگرافی توسط میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) مدل XL30 ساخت شرکت فیلیپس هلند تهیه گردید.بدین منظور ابتدا پودر TiO_2 بر روی سطوح مسی مخصوصی چسبانیده، لایه نازکی از طلا روی سطح آن توسط دستگاه Sputer coater مدل SCDOOS نشانیده شد. سپس توسط میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ بررسی گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

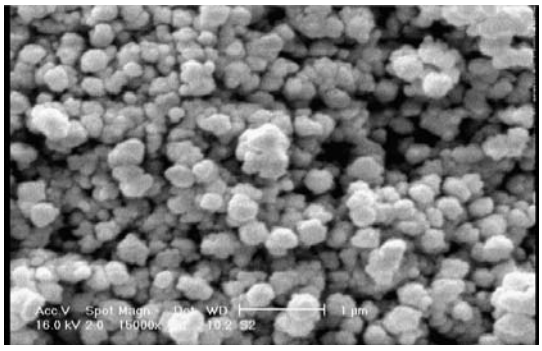
آزمایش XRD

به منظور شناخت بیشتر وبررسی ساختار کریستالی دی اکسید تیتانیوم به کار رفته در آزمایشات از دستگاه XRD(-Ray-X- Diffraction)استفاده شد. پراش اشعه X روشی است که بوسیله آن می توان عناصری را که دارای اشکال کریستالی هستند مورد بررسی قرار داد.

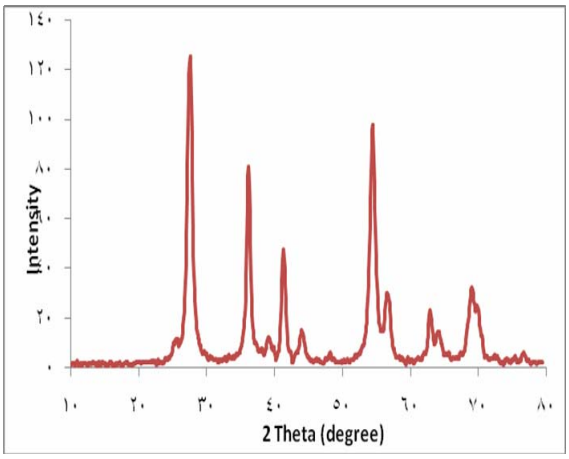
تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(TiO_2(MIC) EDTA ، سیر و ایمی پنم بر روی رشد سودوموناس آئروژینوزا از طریق تست میکرودایلوشن و تعیین تعداد کلنی تشکیل شده (CFU)

پس از تهیه رقت‌های مختلف از عوامل مذکور تست میکرودایلوشن مطابق استاندارد NCCLS انجام گردید. بدین منظور در هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هیلتون براث ریخته شد. سپس رقت‌های مختلف از عوامل مورد آزمون به آن اضافه گردید و هر تست به صورت ۳ بار تکرار انجام شد. پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از طی مدت انکوباسیون از هر چاهک ۱۰ میکرولیتر برداشته وبه منظور تایید و تعیین تعداد کلنی بر روی محیط نوترینت آگار تلقیح گردید. سپس پلیت‌ها در انکوباتور ۳۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و بعد از آن تعداد کلنی‌ها شمارش و CFU تعیین گردید.

نتایج



نگاره ۱- تصویر میکروسکپ الکترونی اسکنینگ از نانو ذره TiO_2



نگاره ۲- تصویر XRD از نانوذره TiO_2

جدول۱- تعیین حداقل غلظت مهارکننده EDTA نانوذره TiO_2 (محلول کلوئیدی) و سیر برای سوش استاندارد سودوموناس آئروژینوزا (ATCC27853)

مهار کننده‌ها	میزان MIC برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر
TiO_2	۲/۲
EDTA	۲۴/۹۲
قرص سیر	۴۰
ایمی‌پنم	۰/۴۳

نتایج مربوط به شمارش کلنی‌ها

پس از تعیین MIC با برداشت از مایع رویی هر چاهک مورد آزمون و تلقیح آن به محیط کشت جامد تعداد کلنی‌ها جهت تعیین CFU بررسی گشت و مشاهده شد که در رقت ۲/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از TiO_2 هیچ کلنی از سودوموناس رشد نکرده بود و بیشترین تعداد کلنی مربوط به چاهک کنترل منفی بود. این نتایج در رقت ۲۴/۹۲µg/ml EDTA، ۴۰µg/ml سیر و ۰/۴۳µg/ml ایمی‌پنم دیده شد(جدول ۱). پس می‌توان گفت TiO_2 در مقایسه با EDTA توان مهار کنندگی رشد سودوموناس را در غلظت ۱۲ برابر کمتر و در مقایسه با قرص سیر این قدرت خود را در غلظت نزدیک ۲۰ برابر کمتر القا نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

بالا بودن کیفیت مواد غذایی و رعایت بهداشت از اهداف همیشگی متخصصین علوم تغذیه است. تغییرات ترکیب اولیه موادغذایی موجب فساد غذا گشته و می‌تواند به عنوان منبع عفونت اپیدمی‌های مهلکی را ایجاد می‌کند. این گونه انتقال و سرایت بیماری در افراد مستعد مانند کودکان، بیماران دچار نقص سیستم ایمنی و سالخوردگان که دارای سیستم ایمنی ضعیف می‌باشند از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد. میکروب‌ها از جمله سودوموناس آئروژینوزا قادرند به سطوح آلی اتصال یافته و روی آن لایه‌ای میکروبی ایجاد نمایند و بدین طریق منبع اولیه آلوده کننده‌ی محیط را به وجود آورند. این باکتری به طور وسیع در طبیعت وجود داشته و اغلب از محیط‌های مرطوب جدا می‌شود(۱۰و۲). سودوموناس آئروجینوزا یکی از اصلی ترین عوامل میکروبی درگیر در عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. عفونت‌های بیمارستانی امروزه یکی از معضلات اصلی در پزشکی به ویژه در افراد دچار سرکوب سیستم ایمنی می‌باشد (۱۸و۱).از جمله مواد غذایی درگیر با آن می‌توان مواد پروتئینی شامل تخم مرغ، نرم تنان، و ماهیان را نام برد. بدین منظور دراین مطالعه از عوامل مختلف گیاهی و شیمیایی و نانوذره اکسید تیتانیوم برای مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا و از آنتی بیوتیک ایمی‌پنم به عنوان کنترل مثبت در مقایسه با آن‌ها استفاده شد. ایمی‌پنم یکی ازقویترین آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده در عفونت‌های سودوموناسی و آنتی بیوتیکی با حلقه بتالاکتام از دسته کارباپنم‌ها است و اغلب در بیماران به شدت بدحال و همچنین در درمان عفونت‌های چند میکروبی و عفونت‌های حاصل از میکروارگانیسم‌های مقاوم به کار می‌رود(۳). اما از آن جایی که ایمی‌پنم مانند سایر بتالاکتام‌ها موجب ضایعات CNS و اختلالاتی مانند تشنج می‌گردد لذا جایگزین‌های ایمن‌تر با خاصیت ضد میکروبی توصیه می‌شود(۸).

EDTA کلات کننده فلزات است که بر نفوذپذیری غشای خارجی سلول‌های پلانکتونیک موثر است. این ترکیب با کلات کردن کاتیون‌های دوظرفیتی از غشای خارجی باعث جداشدن LPS از سطح سلول می‌شود و نفوذپذیری غشای خارجی را بالا می‌برد(۱۳و۵).

در این مطالعه ازعوامل گیاهی موثر بر مهار رشد سودوموناس نیز استفاده گردید. خاصیت ضد میکروبی گیاهان معمولا به دلیل ترکیبات فنولی، ساپونین و فلاونوئیدهای موجود در ساختار آن‌ها می‌باشد. این عوامل معمولا روی نفوذ پذیری غشای سیتوپلاسمی و آنزیم های ساختاری آن موثر هستند.

سیر از زمان‌های قدیم و قبل از دستیابی به آنتی‌بیوتیک‌های جدید در درمان بعضی بیماری‌های عفونی و اپیدمی‌های تیفوس، وبا، اسهال خونی، دیفتری و سل استفاده می‌شده است. از جمله ترکیبات موجود در سیر، آلینین آلیل متیل تیوسولفینات را می‌توان نام برد که خاصیت ضد ویروسی آن به اثبات رسیده است(۹). گفته می‌شود. این ترکیب از جذب یا نفوذ ویروس ممانعت می‌کند. خاصیت ضد میکروبی سیر بر رشد باکتری‌های گرم منفی و مثبت نظیر ویبریو کلرا و استافیلوکوک و استرپتوکوک به اثبات رسیده است(۱۷). با بررسی که روی خصوصیات شیمیایی سیر انجام شده مشخص شده عملکرد ضد باکتریایی آن به طور عمده به دلیل آلیسین موجود در آن است .لذا در این مطالعه از سیر با غلظت ۱۲۰۰۰ µg/m l آلیسین استفاده شد تا خواص ضد میکروبی آن بررسی شود.

هم چنین از جمله مواد دارای خاصیت ضد میکروبی، نانو ذرات می‌باشد. این مواد امروزه جایگاه ویژه‌ای در بهداشت و صنعت پیدا کرده اند(۱۶). از سه دهه گذشته تاکنون دی اکسید تیتانیوم به دلیل خواص متعدد فیزیکی فتوکاتالیستی و سمیت پایین و عدم واکنش آلرژیک یا درماتیت تماسی مورد توجه محققین علوم مختلف بهداشتی و صنعتی قرار گرفته است. نانو ذره دی اکسید تیتانیوم از ذوب تیتانیوم در دمای ۷۰۰ درجه سانتی‌گراد و یا از حل شدن این ماده در اسید نیتریک گرم و

Archive of SID

www.SID.ir

غلیظ تهیه می‌شود. خواص دی اکسید تیتانیوم وابسته به اندازه ذرات و روش سنتز آن و در نهایت ساختار بلوری ایجاد شده است (٦و٤)

Pavasupree و همکارانش از روش سل ـ ژل با استفاده از یک ماده ی فعال کننده ی سطحی ، Colon و همکارانش از روش سل- ژل بر روی یک بستر از جنس کربن فعال شده جهت سنتز TiO_2 استفاده کردند (١٦و٤). Yung و همکارانش از روش هیدروترمال تحت حرارت و فشار، Murugan و همکارانش از روش مایکرو هیدروترمال، Aymonier وهمکاران از روش هیدروترمال به کمک امواج صوتی برای سنتز TiO_2 استفاده کردند(١٩و١٢و١١). در این تحقیق از $TiCl_4$ جهت تهیه نانوذره دی اکسید تیتانیوم استفاده شد(٩)

Rajagapal و همکاران با بررسی اثر تابش uv بر سطح شیشه پوشش داده شده با اکسیدتیتانیوم کاهش پنج برابری باکتری‌ها را پس از تاثیر فتوکاتالیستی مشاهده نمودند(٧).

نتایج XRD وSEM نشان داد که نانوذره TiO_2 ذراتی کروی، با قطر 40-65nm می باشند که تاییدی بر ساختار نانوذره TiO_2 بود (نگاره ١و٢). نانو ذره دی اکسید تیتانیوم با قدرت مهار کنندگی ٢/٢ µg/ml ، توان مطلوب ضد باکتریایی علیه سودوموناس آئروژینوزا را نشان داد. از آن جایی که این باکتری می‌تواند به طور وسیع بر روی مواد غذایی به ویژه آبزیان و پروتئین‌های دریایی رشد کند، لذا با توجه به خاصیت ضد باکتریایی و خود پاک شوندگی این نانو ذره می‌توان از آن در پوشش و نگهداری مواد غذایی چه در سطح محدود و چه در سطح وسیع در سردخانه‌های نگه‌داری مواد غذایی استفاده نمود. در این مطالعه سیر نیز به عنوان یک عامل گیاهی توان مهار کنندگی مناسب رشد سودوموناس را داشت که با توجه به قابل دسترس بودن این ماده گیاهی می‌توان از هر یک از دو عامل نانوذره و سیر در نگهداری و بهبود بخشیدن به حفظ سلامت مواد غذایی استفاده نمود.

فهرست منابع

1- Baron, E .J, Peterson, L.R, Finegold, S M, (1994), Diagnostic microbiology. 9thed, USA: Mosby Company.41-49/321-333.

2- Brooks, G.F .Butel, J .S, Morse, S.A. Jawets, M, manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, (2001), Baltimore :141-219.

3- Chernish, R.N, Aaron ,Sh.D,(2003) Approach to resistant gram- negative bacterial pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. Curt Opin in Pul Med; 9(6): 509-15.

4- Colón, G, Hidalgo, M.C, Nav´ıo, J.A, (2002), A Novel Preparation of High Surface Area TiO_2 Nanoparticles from Alkoxide Precursor and Using Active Carbon as Additive. Cata. Today, vol.76: 91–101.

5- Ehud, B, Keith, M .Brady,E, Greenberg P, (2006), Chelator-Induced Dispersal and Killing of Pseudomonas aeruginosa Cell in a biofilm, Applied and Enviromental Microbiology, 2046-2069

6- Gao, Y, Masuda Y, Seo W.S, Ohta H, Koumoto K, (2004), TiO_2 Nanoparticles Prepared Using an Aqueous Peroxotitanate Solution. Ceramics International 30,1365–1368.

7- Colón G, M.C. Hidalgo, J.A. Nav´ıo, (2002) "A Novel Preparation of High Surface Area TiO_2 Nanoparticles from Alkoxide Precursor and Using Active Carbon as Additive", Cata. Today, vol.76: 91–101.

8- Hantson P, Leonard F, Maloteaux JM, Mahieu P, (1999). How epileptogenic are the recent antibiotics? Acta Clin Belg; 54: 80-7

9- Liao D.L, Liao B.Q, (2007), Shape, size and photocatalytic activity control of TiO_2 nanoparticles with surfactants. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 187: 363–369.

10- Marr K .A, Sexton D .J, Conlon P .J Corey G . R, (1997) .Catheter -related bacteremia and outcome of attempted catheter salvage in patients undergoing hemodialysis, AnnIntern Med, 127:275-280.

11- Meskin P.E, Ivanov V.K, Barantchikov A.E, Churagulov B.R, Tretyakov Y.D, (2006), Ultrasonically Assisted Hydrothermal Synthesis of Nanocrystalline ZnO_2-TiO_2-$NiFe_2O_4$ and NiO.5ZnO.5Fe2O4 Powders. Ultrason. Sonochem., vol.13: 47–53.

Archive of SID

www.SID.ir

12- Murugan A. V, Samuel V, Ravi V,(2006). Synthesis of Nanocrystalline Anatase TiO_2 by Microwave Hydrothermal Method. Mater. Letters, vol.60: 479–480.
13- Nikaido, H, and M .Vaara, (1985) .Molecular basis of bacterial outer membrane permeability, Microbial. Rev .49:1-35.
14- Okonko I.O, Ogun A.A, Adejoye O.D, Ogunjobi A.A, Nkang A.O, Adebayo-Tayo B.C,(2009),Hazards analysis critical control points (HACCP) and Microbiology qualities of Sea-foods as affected by Handler's Hygiene in Ibadan and Lagos, Nigeria. African Journal of Food Science, a; 3(1):035-050.
15- Pavasupree S, Suzuki Y, Art S.P,Yoshikawa S,(2005), Synthesis and Characterization of Nanoporous. Nanorods, Nanowires Metal Oxides", Sci. Tech. Adv. Mater., vol.6: 224–229.
16- Shi L, Zhao Y, Zhang X, Su H, and Tan T, (2008), Antibacterial and anti-mildew behavior of chitosan/nano-TiO2 composite emulsion. Korean J. Chem. Eng., 25(6), 1434-1438.
17- Vato P, Tursil E, Vitali C, Miccolis V, Candido V,(2000). Allyl sulfide constituents of garlic volatile oil as antimicrobial agents,.Phytomedicine: 7,3:239-243
18- Watson S.K, (2000), the most common nosocomial infection. Infection control today. 8:1-9.
19- Yang J، Mei S، Ferreira J.M.F, (2001), Hydrothermal Synthesis of TiO_2 Nanopowders from Tetra alkylammonium Hydroxide Peptized Sols. Mater. Sci. Eng., vol.15: 183–185.

Archive of SID

www.SID.ir