Quality and Durability of Agricultural Products and Food Staffs

e ISSN: 2783-3410

Journal Homepage: https://sanad.iau.ir/journal/qafj/

Research Paper

Biocompatible Synthesis of Porous Alumina Nanoparticles Using Thyme Extract and Evaluation of Their Antibacterial Activity Against Clinical Isolates of *Staphylococcus Aureus*

Fatemeh Sadeghi[1,2], Mohamadhassan Tadayon-Tajabadi[1*]

[1]Department of Microbiology, Ke.C., Islamic Azad University, Kerman, Iran

[2]Food and Agricultural Safety Research Center, Ke.C., Islamic Azad University, Kerman, Iran

Received: 05/07/2025, **Accepted:** 29/07/2025

Abstract

Given the significant increase in bacterial resistance to antibiotics and growing concerns over the rising costs of healthcare, extensive research is underway to develop novel, effective, and low-cost antimicrobial agents that lack the potential to induce resistance. Among these efforts, *Staphylococcus aureus* holds a special position as one of the primary pathogens responsible for human infections. The increasing prevalence of infections caused by this bacterium, along with the emergence of antibiotic-resistant strains, has turned this pathogen into a serious public health challenge. The aim of this study was to investigate the antibacterial effects of alumina nanoparticles on beta-lactamase-producing *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples. The alumina nanoparticles were synthesized using a green synthesis method with thyme plant extract. Ten clinical isolates of *Staphylococcus aureus* resistant to beta-lactam antibiotics were identified using biochemical tests. The extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates were identified using phenotypic testing. The antibacterial activity of the synthesized nanoparticles was evaluated using the well diffusion method on Mueller-Hinton agar. Various concentrations of alumina nanoparticles were prepared in solvents of dimethyl sulfoxide and methanol in equal volume proportions. After incubating the samples for 24 hours at 37°C, the diameters of the growth inhibition zones were measured, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. The results indicated that the synthesized nanoparticles, with an average diameter of 20 nanometers, exhibited significant inhibitory effects on all tested isolates. The average MIC for this nanoparticle was found to be 20 mg/mL. These findings suggest the high potential of alumina nanoparticles as an effective antibacterial agent against resistant *Staphylococcus aureus* strains and their potential application in combating drug-resistant bacterial infections.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Alumina nanoparticles, Thyme, Antibacterial activity

Citation: Sadeghi F, Tadaion-Tajabadi M, Biocompatible Synthesis of Porous Alumina Nanoparticles Using Thyme Extract and Evaluation of Their Antibacterial Activity Against Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Quality and Durability of Agricultural Products and Food Stuffs*, 2025; 4(4): 80-90.

DOI: https://doi.org/10.71516/qafj.2025.1211137

© The Author(s) **Publisher:** Islamic Azad University of Kerman, Iran

[*]**Corresponding Author:** Mohamadhassan Tadayon-Tajabadi, **Email:** mh.tadayon@iau.ir

Extended Abstract

Introduction

The escalating threat of antibiotic resistance has emerged as a critical public health concern globally, with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) being one of the most dangerous pathogens in both hospital and community settings. MRSA is associated with a variety of severe infections, including sepsis, pneumonia, endocarditis, and complicated skin infections. Its resistance to a broad spectrum of β-lactam antibiotics and the reduced sensitivity to last-resort agents like vancomycin necessitate the exploration of alternative, sustainable, and biocompatible antimicrobial strategies. One promising avenue in this context is the application of green nanotechnology using medicinal plant extracts for the biosynthesis of nanomaterials. This approach leverages the reducing and stabilizing power of phytochemicals such as polyphenols, flavonoids, and terpenes to fabricate metal oxide nanoparticles with intrinsic antimicrobial properties. Among these, alumina (Al_2O_3) nanoparticles have garnered interest due to their notable biocompatibility, thermal stability, and surface functionality, making them suitable candidates for both therapeutic and industrial applications. This study aimed to develop porous alumina nanoparticles through a green synthesis method employing *Zataria multiflora* (thyme) extract, and to investigate their antibacterial efficacy against ten clinical isolates of Staphylococcus aureus, with an emphasis on MRSA strains producing extended-spectrum β-lactamase (ESBL).

Methods

Clinical samples were randomly collected from the upper respiratory tracts (nose and throat) of hospital personnel using sterile swabs. These samples were promptly cultured on blood agar and incubated for 24 hours. Standard biochemical and phenotypic methods, including Gram staining, catalase and coagulase tests, and mannitol fermentation, were employed to confirm the presence of *Staphylococcus aureus*. The production of ESBL enzymes was assessed using a double-disk synergy test with cefotaxime and cefotaxime-clavulanic acid discs, following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. For the green synthesis of alumina nanoparticles, aluminum nitrate and sodium dodecyl sulfate (SDS) were used as precursors, with sodium hydroxide adjusting the pH to 8. The reaction mixture was heated and homogenized before being treated with 2 mL of thyme extract. Subsequent microwave-assisted heating cycles promoted nucleation and growth of the nanoparticles, which were then washed, centrifuged, and dried under vacuum. Characterization of morphology and size distribution was performed using Scanning Electron Microscopy (SEM), revealing mostly spherical particles with a mean size of 20–50 nm. The antibacterial properties were tested using the well diffusion method. Alumina nanoparticles were suspended at various concentrations (0.3–80 mg/mL) in a DMSO-methanol mixture and introduced into agar plates pre-inoculated with *Staphylococcus aureus* suspensions standardized to 0.5 McFarland turbidity. Zones of inhibition were measured after 24 hours of incubation. Additionally, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by serial dilution and culture regrowth assays.

Results and Discussion

All ten isolates were confirmed as ESBL-producing *Staphylococcus aureus* based on their response to the combination disk test, fulfilling the ≥5 mm difference criterion between CTX and CTC inhibition zones. SEM images confirmed successful synthesis of alumina nanoparticles with

uniform morphology and minimal surface irregularities. Over 80% of particles were below 50 nm, and the presence of porous structures was noted, indicating their potential for biomedical loading or adsorption applications. The antibacterial activity of the nanoparticles showed a clear dose-dependent response. At higher concentrations (40 and 80 mg/mL), the nanoparticles inhibited all S. aureus isolates effectively, with inhibition zones reaching up to 45 mm. MIC values ranged between 0.3 to 20 mg/mL across different strains. ANOVA and Tukey's post hoc analysis indicated a statistically significant difference ($p < 0.05$) among inhibition zones across the concentration gradient, confirming the efficacy of higher nanoparticle doses. The study also observed that the nanoparticles retained their bactericidal effect even at lower concentrations against several isolates, suggesting strong antimicrobial potency. The MBC values aligned closely with MICs, further validating their killing potential. The current findings are consistent with previous literature indicating that green-synthesized alumina nanoparticles exert antimicrobial effects primarily by disrupting bacterial cell walls and membranes. In this study, the integration of thyme extract enhanced the antibacterial potency, likely due to the synergistic effects of thymol, carvacrol, and other bioactive phytochemicals present in the extract. The results also demonstrate innovation in combining green synthesis techniques with nanomedicine. Previous studies utilizing silver or zinc oxide nanoparticles with plant extracts have shown similar efficacy, but alumina presents a lower toxicity profile and superior thermal stability, making it a more biocompatible alternative for medical applications. Given the multi-drug resistance profiles of MRSA and VRSA, novel agents that bypass traditional resistance mechanisms such as cell wall synthesis inhibition or efflux pump circumvention are essential. The thyme-mediated alumina nanoparticles offer such a strategy by leveraging multiple antibacterial mechanisms simultaneously.

Conclusion

This research provides strong evidence supporting the development of biocompatible, porous alumina nanoparticles synthesized via green methods as potent antibacterial agents against multidrug-resistant Staphylococcus aureus. The use of *Zataria multiflora* extract not only facilitates a non-toxic synthesis process but also enhances the antimicrobial efficiency of the final nanomaterial. While the in vitro results are promising, further in vivo studies are essential to determine the cytotoxicity, pharmacokinetics, and therapeutic index of these nanoparticles. Additionally, evaluating their synergistic potential with existing antibiotics may lead to more effective combinatory therapies for resistant bacterial infections. The outcomes of this study mark an important step toward sustainable nanomedicine, merging traditional herbal knowledge with modern nanotechnology to address one of today's most pressing medical challenges.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Alumina nanoparticles, Thyme, Antibacterial activity.

Funding: There was no external funding in this study.

Authors' contribution: All authors contributed equally to the writing and preparation of this manuscript.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

کیفیت و ماندگاری تولیدات کشاورزی و مواد غذایی

شاپا الکترونیکی: ۳۴۱۰-۲۷۸۳

Journal Homepage: https://sanad.iau.ir/journal/qafj/

واحد کرمان

مقاله پژوهشی

سنتز زیست‌سازگار نانوذرات متخلخل آلومینا با عصاره آویشن و ارزیابی اثر ضدباکتریایی آن‌ها بر ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس*

فاطمه صادقی[۱و۲]، محمدحسن تدین تاج‌آبادی[۱*]

[۱]گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

[۲]مرکز تحقیقات ایمن سازی مواد غذایی و کشاورزی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۱۴ **پذیرش:** ۱۴۰۴/۰۵/۰۷

چکیده

با توجه به افزایش چشم‌گیر مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و نگرانی‌های فزاینده پیرامون هزینه‌های فزاینده مراقبت‌های بهداشتی، پژوهش‌های گسترده‌ای با هدف توسعه عوامل ضدمیکروبی نوین، مؤثر و کم‌هزینه که فاقد پتانسیل ایجاد مقاومت باشند، در حال انجام است. در این میان، *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین پاتوژن‌های مولد عفونت در انسان، جایگاه ویژه‌ای دارد. افزایش شیوع عفونت‌های ناشی از این باکتری، همراه با گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، این پاتوژن را به یک چالش جدی در حوزه بهداشت عمومی بدل کرده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذره آلومینا بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولیدکننده بتالاکتاماز، جداشده از نمونه‌های بالینی بود. نانوذره آلومینا به روش سنتز سبز و با استفاده از عصاره گیاه آویشن تهیه شد. ده ایزوله بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام، با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. تست جدایه‌های مواد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف به روش فنوتیپی شناسایی گردیدند. فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات سنتز شده با استفاده از روش انتشار چاهک در محیط کشت مولر هینتون آگار بررسی شد. غلظت‌های مختلفی از نانوذره آلومینا در حلال‌های دی‌متیل‌سولفوکساید و متانول با نسبت حجمی مساوی تهیه گردید. پس از انکوباسیون نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌های بازدارندگی رشد اندازه‌گیری و حداقل غلظت بازدارنده رشد تعیین شد. نتایج نشان داد که نانوذرات سنتز شده با قطر میانگین ۲۰ نانومتر، دارای اثر مهارکننده قابل‌توجهی بر روی تمام ایزوله‌های مورد بررسی بودند. میانگین حداقل غلظت بازدارنده رشد برای این نانوذره برابر با ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. این یافته‌ها بیانگر پتانسیل بالای نانوذره آلومینا به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی مؤثر علیه سویه‌های مقاوم *استافیلوکوکوس اورئوس* و کاربرد بالقوه آن در مقابله با عفونت‌های باکتریایی مقاوم به دارو است.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، نانوذره آلومینا، آویشن، فعالیت ضدباکتریایی

استناد: فاطمه صادقی، محمدحسن تدین تاج‌آبادی، سنتز زیست‌سازگار نانوذرات متخلخل آلومینا با عصاره آویشن و ارزیابی اثر ضدباکتریایی آن‌ها بر ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس*، کیفیت و ماندگاری تولیدات کشاورزی و مواد غذایی، (۱۴۰۴)، دوره۴، شماره ۴، صفحات ۹۰-۸۰.

DOI: https://doi.org/10.71516/qafj.2025.1211137

© نویسندگان

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، ایران

* **نویسنده مسئول:** محمدحسن تدین تاج‌آبادی، **پست الکترونیک:** mh.tadayon@iau.ir

مقدمه

امروزه مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج به یک بحران جهانی در حوزه سلامت تبدیل شده است. *استافیلوکوکوس اورئوس*، به‌ویژه سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA[1]) یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی و جامعه‌ای است که می‌تواند منجر به بیماری‌های خطرناکی مانند سپسیس، پنومونی، اندوکاردیت و عفونت‌های پوستی شدید شود(۱). این باکتری به‌دلیل توانایی بالا در ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتا-لاکتام مانند پنی‌سیلین و سفالوسپورین‌ها، درمان را با مشکل مواجه کرده است. حتی آنتی‌بیوتیک‌های قوی مانند ونکومایسین نیز در برخی موارد با کاهش حساسیت باکتری روبه‌رو شده‌اند. این مسئله لزوم یافتن راهکارهای جدید برای مقابله با عفونت‌های باکتریایی را بیش از پیش آشکار می‌سازد(۲). در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان دارویی به‌عنوان منابع طبیعی ترکیبات ضدباکتری مورد توجه قرار گرفته است. این ترکیبات به‌دلیل تنوع ساختاری و مکانیسم‌های عمل متفاوت، می‌توانند راهکارهای مؤثری علیه باکتری‌های مقاوم ارائه دهند. علاوه بر این، سنتز سبز نانوذرات با استفاده از عصاره گیاهان، یک روش پایدار و دوستدار محیط‌زیست است که از مواد شیمیایی سمی و خطرناک اجتناب می‌کند. در این روش، ترکیبات فعال گیاهی مانند پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها و ترپن‌ها به‌عنوان عوامل کاهنده و پایدارکننده عمل می‌کنند و نانوذراتی با خواص ضدباکتریایی و زیست‌سازگاری بالا تولید می‌شوند(۳). آویشن (*Zataria multiflora*) یکی از گیاهان دارویی ارزشمند است که به‌دلیل دارا بودن ترکیباتی مانند تیمول، کارواکرول و پاراسیمن، اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدالتهابی قوی دارد(۴). مطالعات نشان داده‌اند که این عصاره می‌تواند به‌طور مؤثری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، حتی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، فعالیت کند(۴)؛ بنابراین، استفاده از این عصاره در سنتز نانوذرات نه‌تنها روشی سبز و ایمن است، بلکه ممکن است خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات را نیز افزایش دهد. نانوذرات اکسید آلومینیوم (Al_2O_3)، معروف به آلومینا، از مهم‌ترین نانوذرات اکسیدی هستند که به‌دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی منحصربه‌فرد، کاربردهای گسترده‌ای در صنایع پزشکی، کاتالیستی، الکترونیکی و مهندسی مواد دارند(۵). این نانوذرات در اشکال مختلفی مانند آلفا-آلومینا (α-Al_2O_3)، گاما-آلومینا (γ-Al_2O_3) و بتا-آلومینا (β-Al_2O_3) وجود دارند که هر کدام ویژگی‌های متمایزی دارند. نانوذرات آلومینا به دلیل دارا بودن ویژگی‌های منحصربه‌فرد، کاربردهای گسترده‌ای در حوزه‌های پزشکی و صنعتی پیدا کرده‌اند. این نانوذرات به علت سمیت کم و سازگاری بالا با سیستم‌های بیولوژیکی، در ساخت ایمپلنت‌ها و سیستم‌های دارورسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. نانوذرات آلومینای متخلخل با اندازه حفره‌های ۲ تا ۵۰ نانومتری، توانایی جذب و رهایش کنترل‌شده داروها را دارند. همچنین، پایداری حرارتی و مقاومت در برابر اکسیداسیون، آن‌ها را به گزینه‌ای مناسب برای کاربردهای کاتالیستی و پوشش‌دهی صنعتی تبدیل کرده است(۶). تحقیقات نشان داده که این نانوذرات می‌توانند با آسیب رساندن به دیواره سلولی باکتری‌ها، خاصیت ضدباکتریایی از خود نشان دهند. در روش‌های سنتز این نانوذرات، علاوه بر روش‌های شیمیایی متداول مانند سل-ژل، هیدروترمال و رسوب‌دهی، از روش‌های سبز و دوستدار محیط‌زیست نیز استفاده می‌شود. در این روش‌ها، از عصاره گیاهانی مانند آویشن به‌عنوان عامل کاهنده و تثبیت‌کننده استفاده می‌شود که علاوه بر کاهش خطرات زیست‌محیطی، ممکن است خواص ضدباکتریایی نانوذرات را نیز تقویت کند. نانوذرات آلومینای متخلخل[2] به دلیل ساختار متخلخل، سطح فعال بالا و پایداری شیمیایی، گزینه ایده‌آلی برای انتقال هدفمند داروها محسوب می‌شوند. این نانوحامل‌ها قادرند مقدار قابل‌توجهی دارو را در حفره‌های خود ذخیره کرده و آن را به‌صورت کنترل‌شده در بدن آزاد کنند. همچنین، گروه‌های هیدروکسیل موجود روی سطح این نانوذرات امکان اتصال لیگاندهای هدفمند را فراهم می‌کنند که این ویژگی، دقت دارورسانی را افزایش می‌دهد. روش‌های سنتز سنتی نانوذرات آلومینا معمولاً از مواد شیمیایی سمی مانند سورفکتانت‌ها و حلال‌های آلی استفاده می‌کنند که هم برای محیط‌زیست مضر هستند و هم در کاربردهای

[1] Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

[2] Mesoporous Alumina Nanoparticles

پزشکی نامطلوب محسوب می‌شوند. در مقابل، سنتز سبز این نانوذرات با استفاده از عصاره گیاه آویشن می‌تواند جایگزین ایمن‌تر و سازگارتری باشد. این روش نه‌تنها از مواد طبیعی و غیرسمی بهره می‌برد، بلکه ممکن است به بهبود خواص ضدباکتریایی نانوذرات نیز کمک کند. این تحقیق با تلفیق فناوری نانو و گیاهان دارویی، راهکار جدیدی برای مقابله با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف آنتی‌بیوتیک ارائه می‌دهد. ارزیابی عملکرد این نانوحامل‌ها علیه ۱۰ نمونه بالینی از این باکتری می‌تواند نقش مؤثری در توسعه نسل جدید داروهای نانویی داشته باشد که هم از ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی جلوگیری می‌کنند و هم از نظر زیست‌محیطی پایدار هستند.

روش کار

جمع‌آوری و کشت نمونه‌های بالینی

در این مطالعه، نمونه‌های بالینی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از مجاری تنفسی فوقانی (بینی و حلق) پرسنل بیمارستانی به‌صورت تصادفی و با استفاده از سوآپ استریل مرطوب جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها بلافاصله در لوله‌های حاوی سرم فیزیولوژی استریل (۰/۹٪) قرار داده شدند و ظرف مدت ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل گردیدند. سپس نمونه‌ها بر روی محیط کشت بلاد آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط مناسب انکوبه شدند. باکتری‌های *استافیلوکوکوس* بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی اولیه شناسایی و برای انجام آزمایش‌های بعدی ازجمله آنتی‌بیوگرام و تست‌های تخصصی مورد استفاده قرار گرفتند. برای تأیید هویت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر قند مانیتول و همولیز انجام شد(۷).

تست تشخیص بتالاکتاماز به روش فنوتیپی

برای شناسایی جدایه‌های مولد بتالاکتاماز (ESBL) وسیع‌الطیف[1] از روش آزمون دیسک ترکیبی[2] استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل سفوتاکسیم و ترکیب سفوتاکسیم-کلاولونیک اسید پس از رسیدن به دمای محیط، با پنس استریل بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار قرار داده شدند. فاصله بین دیسک‌ها ۲۰ میلی‌متر در نظر گرفته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، قطر هاله‌های عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد. اگر قطر هاله‌ی بازدارندگی اطراف دیسک ترکیبی (سفوتاکسیم-کلاولونیک اسید) حداقل ۵ میلی‌متر بیشتر از دیسک ساده باشد، نشان‌دهنده‌ی وجود آنزیم ESBL در جدایه است(۸).

سنتز سبز نانوذرات آلومینا با آویشن

برای سنتز نانوذرات آلومینا به روش سبز، ابتدا ۰/۰۵ گرم آلومینیوم نیترات و ۰/۰۱ گرم سورفکتانت سدیم دودسیل سولفات توزین شدند و به یک بشر ۵۰ میلی‌لیتری اضافه گردیدند. سپس ۰/۲ گرم سود سوزآور (۲٪ وزنی/حجمی) به محلول افزوده شد. پس از همگن‌سازی کامل روی هیتراستیرر، حجم محلول با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تحت همزدن نگه داشته شد. pH محلول با استفاده از محلول‌های بافر به ۸ تنظیم گردید. در مرحله بعد، ۲ میلی‌لیتر عصاره آویشن به‌عنوان عامل پایدارکننده طبیعی به محلول اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تحت همزدن مداوم قرار گرفت. سپس محلول از فیلتر سانتریفیوژ عبور داده شد و با آب مقطر و اتانول شستشو گردید. فرآیند سنتز در pH برابر ۷ و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تحت همزدن شدید ادامه یافت. برای تکمیل فرآیند هسته‌زایی و رشد نانوذرات، محلول ابتدا به مدت ۱ ساعت تحت سیستم رفلاکس قرار گرفت و سپس به دستگاه مایکروویو (با توان ۶۰ وات) منتقل شد. در این مرحله، سیکل‌های ۳۰ ثانیه روشن و ۶۰ ثانیه خاموش به مدت ۱۰ دقیقه اعمال گردید. پس از خنک‌شدن تا دمای محیط، نانوذرات با افزودن اتانول رسوب داده شده و توسط سانتریفیوژ جدا شدند. محصول نهایی با اتانول شستشو داده شد و در آون خلأ در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. برای بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی و اندازه نانوذرات سنتز شده، از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. این

[1] Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)
[2] Combined Disk Test (CDT)

تکنیک به دلیل قدرت تفکیک بالا و توانایی ارائه تصاویر با بزرگنمایی قابل‌توجه، امکان بررسی دقیق ساختار سطحی و توزیع اندازه ذرات را فراهم می‌کند. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی مناسب (پوشش‌دهی با طلا برای افزایش هدایت سطحی) تحت پرتو الکترونی قرار گرفتند و تصاویر با وضوح نانومتری ثبت شدند. این روش به‌عنوان یکی از دقیق‌ترین تکنیک‌های شناسایی نانومواد شناخته می‌شود و امکان تحلیل کمی و کیفی ویژگی‌های نانوذرات را مهیا می‌سازد(۹، ۱۰).

بررسی خاصیت ضدمیکروبی

غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حلال دی‌متیل سولفوکسید و متانول با حجم برابر از نانوذره آلومینا تهیه گردید. جهت آنتی بیوگرام از روش انتشار چاهک، استفاده گردید. سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل نیم مک‌فارلند در محیط مایع تهیه گردید و به روش یکنواخت بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح گردید. حفرات با فاصله حداقل ۱۵ میلی‌متر از لبه پلیت و ۲۵ میلی‌متر از همدیگر ایجاد گردید. در مرحله بعد از غلظت‌های تهیه شده به‌طور جداگانه مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر در هر حفره ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و قطر هاله ممانعت از رشد اندازه‌گیری شد. حداقل غلظتی از ماده ضدمیکروبی که مانع از رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود به‌عنوان MIC[1] در نظر گرفته شد. همچنین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها (MBC[2]) تعیین گردید(۱۱، ۱۲).

بررسی آماری

برای تحلیل آماری داده‌های حاصل از قطر هاله‌های عدم رشد در غلظت‌های مختلف نانوذرات آلومینا، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد تا معناداری تفاوت بین غلظت‌ها بررسی گردد. در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار، از آزمون تعقیبی توکی (Tukey's HSD) برای مقایسه زوجی میان گروه‌ها استفاده گردید. سطح معنی‌داری برابر با $p \geq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام شد.

نتایج

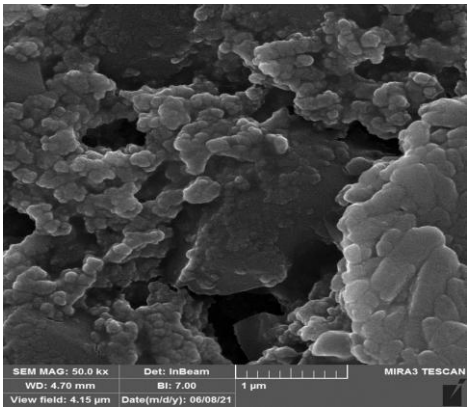
در این تحقیق، ۱۰ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف با مشخصه کوکسی‌های گرم‌مثبت، با آرایش تکی، دوتایی، خوشه‌ای، کاتالاز مثبت و بر اساس نتایج دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفوتاکسیم و دیسک ترکیبی سفوتاکسیم و کلاولونیک اسید شناسایی گردید.

شکل ۱- آزمون دیسک ترکیبی

بررسی نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی

بر اساس تصویر ارائه‌شده در شکل (۲)، مربوط به میکروسکوپ الکترونی روبشی، مشخص شد که نانوذرات آلومینای سنتز شده به روش سبز عمدتاً دارای شکل ظاهری کروی و سطحی نسبتاً یکنواخت و صاف می‌باشند. میانگین قطر ذرات با استفاده از نرم‌افزار تحلیل تصویر حدود ۲۰–۵۰ نانومتر تخمین زده شد که با داده‌های گزارش‌شده از منابع مشابه مطابقت دارد. توزیع اندازه ذرات نسبتاً یکنواخت بود، اگرچه در برخی نواحی خوشه‌بندی و تجمع مشاهده شد که ممکن است ناشی از انرژی سطحی بالا و برهم‌کنش بین ذرات باشد. بررسی‌های دقیق‌تر نشان داد که بیش از ۸۰٪ از ذرات در بازه اندازه کمتر از ۵۰ نانومتر قرار دارند. ساختار متخلخل سطحی نیز در برخی نواحی قابل مشاهده بود که حاکی از پتانسیل مناسب این ذرات برای کاربردهای انتقال دارو یا جذب مولکول‌های زیستی می‌باشد. عدم وجود ترک‌خوردگی یا ناصافی شدید در سطح ذرات بیانگر سنتز موفق و پایدار نانوذرات با استفاده از عصاره آویشن است.

[1] Minimal Inhibitory Concentration
[2] Minimal Bactericidal Concentration



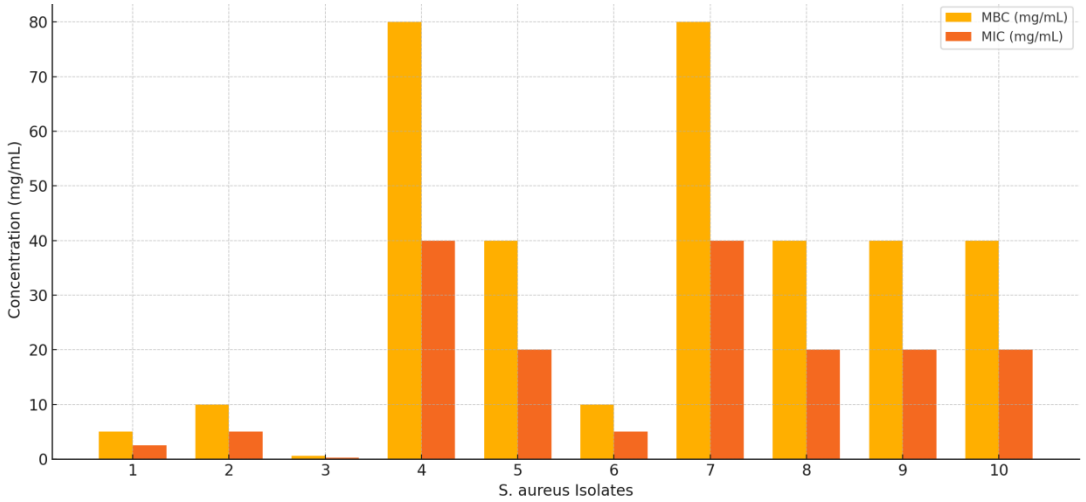
شکل ۲- مرفولوژی نانوذرات بیوسنتز شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی

نتایج اثرات ضدمیکروبی

جدول(۱)، قطر هاله‌های عدم رشد (مناطق بازدارندگی) نانوذرات آلومینا را در برابر ۱۰ ایزوله بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت‌های مختلف (۰.۳ تا ۸۰ mg/mL) نشان می‌دهد. برای تمام ایزوله‌ها، افزایش غلظت نانوذرات منجر به افزایش قطر هاله‌های عدم رشد شد. نانوذرات آلومینا در غلظت‌های بالا (≤۴۰ mg/mL) علیه اکثر ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثر هستند. شکل(۳)، مقایسه نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات آلومینا بیوسنتز شده با آویشن را علیه جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان می‌دهد. فاصله نسبتاً کم بین MIC و MBC نشان می‌دهد که نانوذرات آلومینا نه‌تنها بازدارنده‌ی رشد هستند، بلکه با افزایش جزئی در غلظت، خاصیت کشندگی نیز دارند. این ویژگی برای یک عامل ضدباکتریایی بسیار مطلوب است، چرا که نشان‌دهنده‌ی اثربخشی بالا و احتمال پایین باقی‌ماندن باکتری زنده است. اگرچه بیشتر جدایه‌ها رفتار مشابهی در برابر نانوذره نشان داده‌اند، اما ممکن است اختلافاتی جزئی در MIC و MBC بین آن‌ها وجود داشته باشد که می‌تواند ناشی از تفاوت در مقاومت ذاتی یا سطح آنزیم‌های بتالاکتاماز در آن‌ها باشد. نتایج حاصل از آزمون ANOVA نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین قطر هاله‌های عدم رشد در غلظت‌های مختلف نانوذرات آلومینا وجود دارد ($p<۰/۰۵$). همچنین، نتایج آزمون تعقیبی توکی بیانگر آن بود که غلظت‌های بالاتر (به‌ویژه ۴۰ و ۸۰ mg/mL) به‌طور معنی‌داری قطرهای بازدارندگی بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر ایجاد کرده‌اند. این تفاوت آماری تأییدکننده وابستگی دوز-پاسخ نانوذرات آلومینا در مقابله با ایزوله‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد.

جدول ۱- بررسی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات آلومینا بیوسنتز شده با آویشن علیه ۱۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس*
(اعداد جدول: قطر هاله عدم رشد نانوذرات برحسب میلی‌متر)

غلظت (mg/mL) / باکتری	۸۰	۴۰	۲۰	۱۰	۵	۲/۵	۱/۲۵	۰/۶۲۵	۰/۳
S.aureus (1)	۴۵	۴۲	۴۰	۳۰	۱۵	۱۰	–	–	–
S.aureus (2)	۳۰	۲۸	۱۵	۱۰	۱۰	–	–	–	–
S.aureus (3)	۴۰	۳۷	۳۶	۳۵	۳۴	۳۰	۲۷	۲۵	۲۰
S.aureus (4)	۲۰	۱۰	–	–	–	–	–	–	–
S.aureus (5)	۱۸	۱۵	۱۰	–	–	–	–	–	–
S.aureus (6)	۲۵	۲۰	۱۵	۱۲	۱۰	–	–	–	–
S.aureus (7)	۱۰	۱۰	–	–	–	–	–	–	–
S.aureus (8)	۱۵	۱۰	۱۰	–	–	–	–	–	–
S.aureus (9)	۲۰	۱۸	۱۵	–	–	–	–	–	–
S.aureus (10)	۱۲	۱۰	۱۰	–	–	–	–	–	–



شکل ۳- مقایسه نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات آلومینا بیوسنتز شده با آویشن علیه ۱۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس*

بحث

سویه‌های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس*، به‌ویژه MRSA (مقاوم به متی‌سیلین) و VRSA (مقاوم به وانکومایسین)، به دلیل استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت چندداروی (MDR) نشان می‌دهند. این سویه‌ها به درمان با بتالاکتام‌ها (مانند پنی‌سیلین)، ماکرولیدها (مانند اریترومایسین) و حتی آنتی‌بیوتیک‌های خط آخر مانند وانکومایسین مقاوم هستند(۱۳). مکانیسم‌های مقاومت شامل: تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده آنتی‌بیوتیک (مانند بتالاکتاماز). تغییر در ساختار دیواره سلولی (مانند پروتئین‌های اتصالی پنی‌سیلین) و پمپ‌های افلاکس که آنتی‌بیوتیک‌ها را از سلول خارج می‌کنند(۱۴). گیاهان حاوی ترکیباتی مانند فنول‌ها (تیمول، کارواکرول)، ترپن‌ها و فلاونوئیدها هستند که مکانیسم‌های چندگانه ضدباکتریایی دارند و مقاومت باکتری‌ها را کاهش می‌دهند. همچنین ترکیب عصاره‌ها با آنتی‌بیوتیک‌ها (به‌طور نمونه: آویشن و وانکومایسین) می‌تواند مقاومت را بشکند. اسانس‌های گیاهی با تخریب غشای سلولی و مهار تشکیل بیوفیلم، اثر کشندگی قوی دارند(۱۵). در این پژوهش بر اساس نتایج به‌دست‌آمده مشخص گردید که کلیه جدایه‌های استافیلوکوکی نسبت به نانو آلومینا حساسیت داشتند و نتایج حاصله با توجه به شیوع گسترده مقاومت آنتی‌بیوتیکی از اهمیت خاصی برخوردار است. از سوی دیگر تاکنون تحقیقی در زمینه اثرات ضدباکتریایی نانو آلومینا بر پایه گیاه دارویی انجام نشده است و از این نظر این تحقیق دارای نوآوری می‌باشد. نتیجه به‌دست‌آمده از تعیین خاصیت ضد باکتریایی نانوذره آلومینا که به روش سنتز سبز در حضور عصاره گیاهی آویشن سنتز شده در غلظت ۸۰ mg/mL (۱۰۰ درصد)، ۴۰ mg/mL (۱۰۰ درصد)، ۲۰ mg/mL (۸۰ درصد)، ۱۰ mg/mL (۴۰ درصد)، ۵ mg/mL (۴۰ درصد)، ۲/۵ mg/mL (۲۰ درصد)، ۱/۲۵ mg/mL (۱۰ درصد)، ۰/۶۲۵ mg/mL (۱۰ درصد)، ۰/۳ mg/mL (۱۰ درصد) بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد بتالاکتاماز تأثیر داشته است. در این مطالعه، مشخص گردید که نانوذرات سنتز شده دارای خاصیت ضدباکتریایی قابل‌توجهی هستند و حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) برای بیشتر ایزوله‌ها در محدوده ۲۰-۰/۳ mg/mL متغیر بود. این یافته‌ها حاکی از پتانسیل بالای نانوذرات آلومینا به‌عنوان یک عامل ضدباکتریایی مؤثر علیه سویه‌های مقاوم است. نتایج این پژوهش با مطالعات پیشین که نشان داده‌اند نانوذرات آلومینا می‌توانند با آسیب به دیواره سلولی باکتری‌ها، خاصیت ضدباکتریایی از خود نشان دهند، همسو است. به‌عنوان‌مثال، ترن[1] و همکاران(۲۰۲۳)، نیز گزارش کردند که نانوذرات آلومینای سنتز شده به روش سبز، فعالیت ضدباکتریایی قابل‌توجهی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند(۹). استفاده از عصاره آویشن به‌عنوان عامل کاهنده و پایدارکننده در سنتز نانوذرات، مشابه پژوهش‌های

[1] Tran

دیگری است که از گیاهان دارویی برای سنتز نانوذرات استفاده کردند. این روش نه‌تنها سازگار با محیط‌زیست است، بلکه ممکن است به بهبود خواص ضدباکتریایی نانوذرات نیز کمک کند (۴، ۱۰). در مطالعه دیگری، عصاره آویشن دارای اثرات ضدباکتریایی قوی در برابر *کلبسیلا نومونیه* مقاوم به چند دارو و تولیدکننده ESBL نشان داده شد (۱۶). نتایج این تحقیق با یافته‌های پژوهش حاضر هم‌راستا است. مجموعه داده‌های به‌دست‌آمده، در کنار شواهد ارائه‌شده در سایر مطالعات، حاکی از پتانسیل بالای این نانوذرات در مهار و حذف سویه‌های مقاوم باکتریایی است. بر این اساس، می‌توان ضمن انجام آزمون‌های فراتر، از نانوذرات آلومینا به‌عنوان پوشش‌های آنتی‌میکروبیال بر سطوح مختلف، با هدف کاربرد در حوزه‌های زیست‌پزشکی، تجهیزات پزشکی و سامانه‌های زیست‌محیطی بهره گرفت.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که نانوذرات آلومینای سنتز شده به روش سبز با استفاده از عصاره آویشن، گزینه‌ای امیدوارکننده برای مقابله با عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند. بااین‌حال، برای تعیین مکانیسم دقیق اثر ضدباکتریایی و ارزیابی سمیت این نانوذرات در مدل‌های درون تنی، تحقیقات بیشتری موردنیاز است. همچنین، بررسی اثر سینرژیستی این نانوذرات با آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌تواند راهکارهای جدیدی برای درمان عفونت‌های مقاوم ارائه دهد. این پژوهش گامی مهم در توسعه عوامل ضدباکتریایی جدید و پایدار است که می‌تواند به کاهش بحران مقاومت آنتی‌بیوتیکی کمک کند. برای تحقیقات آینده، بررسی مکانیسم مولکولی اثر ضدباکتریایی نانوذرات آلومینا، ارزیابی سمیت و زیست‌سازگاری این نانوذرات در مدل‌های حیوانی و مطالعه اثر ترکیبی نانوذرات با آنتی‌بیوتیک‌های رایج برای افزایش کارایی درمانی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات ایمن‌سازی مواد غذایی و کشاورزی واحد کرمان بابت همکاری صمیمانه قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

References

1. Alghamdi BA, Al-Johani I, Al-Shamrani JM, Alshamrani HM, Al-Otaibi BG, Almazmomi K, et al. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Saudi Journal of Biological Sciences. 2023;30(4):103604.
2. Mukherjee R, Priyadarshini A ,Pandey RP, Raj VS. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. Insights into drug resistance in *Staphylococcus aureus*: IntechOpen; 2021.
3. Yassin MT, Mostafa AA-F, Al-Askar AA, Sayed SR. In vitro antimicrobial activity of Thymus vulgaris extracts against some nosocomial and food poisoning bacterial strains. Process Biochemistry. 2022;115:152-9.
4. Sheikholeslami S, Mousavi SE, Ashtiani HRA, Doust SRH, Rezayat SM. Antibacterial activity of silver nanoparticles and their combination with *Zataria multiflora* essential oil and methanol extract. Jundishapur Journal of Microbiology. 2016;9(10):e36070.
5. Einafshar E, Khodadadipoor Z, Fazli M, Einafshar N, Mohebbi Zinab J, Asaei S. Preparation of Ag-Al_2O_3 nano structures by combustion method and investigation of photocatalytic activity. International Journal of Applied Ceramic Technology. 2021;18(6):2064-74.
6. Masamura S, Hossain MS, Nakane K. Synthesis of alumina/ferric oxide nanofibers and application to catalysts for ethanol dehydration reaction by adding palladium oxide. Journal of the Korean Ceramic Society. 2025;62(1):65-82.

7. Qodrati M, SeyedAlinaghi S, Dehghan Manshadi SA, Abdollahi A, Dadras O. Antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* isolates from patients at a tertiary hospital in Tehran, Iran, 2018–2019. European Journal of Medical Research. 2022;27(1):152.
8. Singh V, Tuladhar R, Chaudhary M. Beta lactamase producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among uropathogens. Nepal Journal of Science and Technology. 2015;16(1):105-12.
9. Tran GT, Nguyen NTH, Nguyen NTT, Nguyen TTT, Nguyen DTC, Tran TV. Plant extract-mediated synthesis of aluminum oxide nanoparticles for water treatment and biomedical applications: a review. Environmental Chemistry Letters. 2023;21(4):2417-39.
10. Duraisamy P. Green synthesis of aluminium oxide nanoparticles by using *Aerva lanta* and *Terminalia chebula* extracts. International journal for research in applied science and engineering technology, 2018; 45:428-433
11. Baharudin MMA-a, Ngalimat MS, Mohd Shariff F, Balia Yusof ZN, Karim M, Baharum SN, Antimicrobial activities of *Bacillus velezensis* strains isolated from stingless bee products against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One. 2021;16(5):e0251514.
12. Toh SC, Lihan S, Bunya SR, Leong SS. In vitro antimicrobial efficacy of *Cassia alata* (Linn.) leaves, stem, and root extracts against cellulitis causative agent *Staphylococcus aureus*. BMC complementary medicine and therapies. 2023;23(1):85.
13. Mlynarczyk-Bonikowska B, Kowalewski C, Krolak-Ulinska A, Marusza W. Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(15):8088.
14. Dadashi M, Hashemi A, Eslami G, Fallah F, Goudarzi H, Erfanimanesh S, Taherpour A. Evaluation of antibacterial effects of *Zataria multiflora* Boiss extracts against ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* strains. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2016 May;6(3):336.
15. Upadhyay A, Karumathil D, Upadhyaya I, Bhattaram V, Venkitanarayanan K. Controlling bacterial antibiotic resistance using plant-derived antimicrobials. Antibiotic Resistance. 2016:205–26.
16. Dallal MM, Bayat M, Yazdi MH, Aghaamiri S, Mashkani MG, Mohtasab TP, Sadi BS. Antimicrobial effect of *Zataria multiflora* on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from food. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 2012; 17 (2):21-29.