



## Investigation of *changes in algD* and *toxA* gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* under the influence of extract and silver nanoemulsion containing the endemic Iranian species *Nepeta binaludensis* Jamzad

Benyamin Alimardanipur<sup>1</sup>, Golaleh Mostafavi<sup>2</sup> and Seyyedeh Mahdokht Maddah<sup>3\*</sup>

1- M.Sc. graduate, Department of Biological Sciences and Technologies, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Share Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Biological Sciences and Technologies, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Share Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3\*- Corresponding Author, Department of Biological Sciences and Technologies, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Share Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, Email: [s.m.maddah@gmail.com](mailto:s.m.maddah@gmail.com); [SM.Maddah@iau.ac.ir](mailto:SM.Maddah@iau.ac.ir)

Received: November 2024

Revised: August 2025

Accepted: August 2025

### Abstract

**Background and objectives:** *Nepeta binaludensis* Jamzad is a rare, aromatic, and endemic species known for its antibacterial activity, attributed to its phenolic and flavonoid content. Given the rising issue of antibiotic resistance, exploring innovative therapeutic approaches, such as utilizing plant-derived components in conjunction with nanoparticles, is essential. These methods enhance plants' antibacterial properties while reducing the quantity of these valuable resources needed, thereby contributing to their conservation. The current study investigated the antimicrobial properties of a silver nanoemulsion derived from *Nepeta binaludensis* extract. It also investigated its effect on the expression of the *toxA* gene, which is involved in Toxin A secretion, and the *algD* gene, which plays a role in biofilm formation, in *Pseudomonas aeruginosa*.

**Methodology:** The *Nepeta binaludensis* flowering aerial parts were collected from Binaloud Mts in the northeast of Razavi Khorasan Province at an altitude of 2517 m. The ethanolic extract of the species was obtained from 40 g of the plant-dried powder using the maceration method. The extract's flavonoid and phenolic content were measured using an HPLC apparatus. This study used a silver nanoemulsion-loaded plant extract that was previously prepared by the high-energy method. The synthesis accuracy of the nanoemulsion was evaluated using FTIR, SEM, DLS, Zeta potential, and XRD techniques. The antibacterial effects of varying concentrations of silver nanoparticles, crude extract, and silver nanoemulsion were assessed against the standard bacterial strain *Pseudomonas aeruginosa* using the Kirby-Bauer disk diffusion test and the microdilution plate technique. RNA extraction from the bacteria was performed utilizing treatments that included the minimum inhibitory concentration (MIC) and sub-minimum inhibitory concentration (subMIC) of silver nanoparticles, the crude extract, and the silver nanoemulsion containing the extract. Following cDNA synthesis, the expression changes of the *toxA* and *algD* genes were analyzed using Real-time PCR. The outcomes of the Real-time PCR were assessed with REST software. The results were analyzed using one-way ANOVA with Microsoft Excel 2016 and



Copyright: © 2025 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (<http://ijmapr.areeo.ac.ir/>) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

GraphPad Prism 9.5.1, with a P value of less than 0.05.

**Results:** The HPLC analysis of the extract composition indicated that the plant extract did not contain gallic acid, catechin, rutin, or quercetin. Among the phenolic constituents, including chlorogenic acid, caffeic acid, salicylic acid, and rosmarinic acid, rosmarinic acid exhibited the highest abundance, measuring 20.82 mg/g. The evaluation of the synthesized nanoemulsion confirmed that the particles are spherical with a diameter of 270 nm. The surface charge is negative, and the particles are non-crystalline, and the presence of water and ester bonds has been detected. The Kirby-Bauer disk diffusion test results indicated that the smallest inhibition zone (12 mm) was associated with silver nanoparticle treatment. Conversely, the largest inhibition zone (21 mm) was observed with the treatment involving silver nanoemulsion of the extract, which was approximately equivalent to the inhibition zone induced by the antibiotic ceftazidime (CAZ, 30 µg). The minimum values for MBC, MIC, and Sub MIC were 80, 40, and 20 µg/ml, respectively, corresponding to the silver nanoemulsion containing the extract. The *algD* gene expression level decreased by a factor of 0.87 when treated with silver nanoemulsion of the extract (40 µg/ml), compared to the control group ( $P < 0.01$ ). The *toxA* gene expression level was reduced by a factor of 0.78 following treatment with the silver nanoemulsion of the extract ( $P < 0.05$ ). The changes in gene expression induced by varying concentrations of plant crude extract and silver nanoparticles did not show a significant difference when compared to the control group.

**Conclusion:** The nanoemulsion of the plant extract exhibits a greater growth inhibitory effect and enhanced bactericidal activity. Given that the *algD* gene plays a crucial role in biofilm formation and the *toxA* gene is responsible for the secretion of the endotoxin A, it appears that the silver nanoemulsion may effectively inhibit growth by influencing the expression of genes in *Pseudomonas aeruginosa*. The reduction in droplet size within the nanoemulsion enhances the concentration of bioactive compounds and antibacterial properties compared to the crude extract. Consequently, this makes it suitable for applications in the pharmaceutical and food industries.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial, silver nanoemulsion, *Nepeta binaludensis* Jamzad, *toxA*, *algD*.

## بررسی تغییر بیان ژن‌های *algD* و *toxA* در باکتری *Pseudomonas aeruginosa* تحت تأثیر عصاره و نانو امولسیون نقره حاوی عصاره گونه انحصاری ایرانی پونه‌سای بینالودی (*Nepeta binaludensis* Jamzad.)

بنیامین علیمردانی پور<sup>۱</sup>، گلاره مصطفوی<sup>۲</sup> و سیده مهدخت مداح<sup>۳\*</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و فنون زیستی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه علوم و فنون زیستی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم و فنون زیستی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهرری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیک: [SM.Maddah@iau.ac.ir](mailto:SM.Maddah@iau.ac.ir) [s/m.maddah@gmail.com](mailto:s/m.maddah@gmail.com)

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۴

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۳

### چکیده

سابقه و هدف: گونه *Nepeta binaludensis* گیاهی کمیاب، معطر و انحصاری است که به دلیل محتوای فنی و فلاونوئیدی دارای فعالیت ضد باکتریایی است. با توجه به گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بررسی روش‌های درمانی نوآورانه مانند استفاده از ترکیب‌های مشتق شده از گیاهان همراه نانوذرات لازم به نظر می‌رسد؛ زیرا این روش‌ها اغلب ضمن افزایش خواص ضد باکتریایی گیاهان دارویی، مقدار مصرف این گیاهان ارزشمند را کاهش داده و در حفظ آنها مؤثر هستند. در این پژوهش، خواص ضد میکروبی نانوامولسیون نقره حاوی عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی و تأثیر آن بر بیان ژن *toxA* که در ترشح توکسین A و ژن *algD* که در تشکیل لایه نازک زیستی در باکتری سودوموناس آئروژینوزا نقش دارند، مطالعه شد.

مواد و روش‌ها: سرشاخه‌های گلدار پونه‌سای بینالودی از ارتفاع ۲۵۱۷ متری کوه بینالود واقع در شمال شرق استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد. عصاره اتانولی این گیاه با روش خیس کردن، از ۴۰ گرم پودر گیاه خشک شده بدست آمد. مقادیر ترکیب‌های فلاونوئیدی و فنی عصاره به کمک دستگاه HPLC مورد سنجش قرار گرفت. در این مطالعه، نانوامولسیون نقره حاوی عصاره که پیش از این با روش انرژی بالا ساخته شده بود مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از روش‌های FTIR، SEM، DLS، ظرفیت زتا و XRD صحت سنتز نانوامولسیون مورد ارزیابی قرار گرفت. خواص آنتی‌باکتریال غلظت‌های مختلف نانو ذره نقره، عصاره تام و نانوامولسیون نقره حاوی عصاره بر روی سوبه استاندارد باکتری سودوموناس آئروژینوزا با آزمون انتشار دیسک کربی-بائر و با روش رقت سریالی میکرودايلوشن ضمن تعیین MIC و MBC مورد بررسی قرار گرفت. استخراج RNAها از باکتری‌های تحت تیمار با غلظت‌های MIC و subMIC از نانوذره نقره، عصاره تام و نانوامولسیون نقره عصاره به‌طور جداگانه انجام شد. پس از سنتز cDNA تغییرات بیان ژن‌های *algD* و *toxA* با استفاده از Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از آزمایش Real-Time PCR به وسیله نرم‌افزار REST مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج با آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزارهای Microsoft Excel 2016 و GraphPad Prism 9.5.1 در سطح معناداری ( $P \text{ value} < 0.05$ ) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: سنجش مقدار برخی ترکیب‌های عصاره با HPLC نشان داد که عصاره این گیاه فاقد گالیک اسید، کاتکین، روتین و کوئرستین است. در بین ترکیب‌های فنی مانند کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، سالیسیلیک اسید و رزمارینیک اسید بیشترین مقدار مربوط به رزمارینیک اسید به میزان ۲۰/۸۲ میلی‌گرم بر گرم بود. ارزیابی‌های نانوامولسیون سنتز شده تأیید کرد که ذرات این نانوامولسیون کروی و به قطر حدود ۲۷۰ نانومتر بوده و بار سطحی آن منفی و غیر کریستالی است. حضور آب و پیوندهای استری نیز مشخص گردید. یافته‌های بدست آمده از آزمون انتشار دیسک کربی-بائر نشان داد که کمترین قطر به مقدار ۱۲ میلی‌متر مربوط به تیمار با نانو ذره نقره بود. بیشترین قطر هاله عدم رشد با مقدار ۲۱ میلی‌متر مربوط به تیمار با نانوامولسیون عصاره بود که تقریباً مشابه میزان هاله عدم رشد الفا شده توسط آنتی بیوتیک سفنازیدیم (CAZ 30µg) بود. کمترین مقدار MIC، MBC و subMIC به ترتیب به میزان ۸۰، ۴۰ و ۲۰ µg.ml<sup>-1</sup> مربوط به تیمارهای نانوامولسیون عصاره بود. میزان بیان ژن *algD* فقط تحت تیمار با غلظت MIC نانوامولسیون حاوی

عصاره گیاه ( $40 \mu\text{g.ml}^{-1}$ )،  $0.87$  برابر کاهش نسبت به کنترل نشان داد ( $P < 0.01$ ). تحت تیمار با نانومولسیون نقره حاوی عصاره گیاه، بیان ژن *tox A* به میزان  $0.78$  برابر کنترل، کاهش معنی دار در سطح  $5$  درصد نشان داد. به طوری که تغییر بیان این ژن تحت تأثیر مقادیر MIC عصاره تام گیاه و نانوذره نقره در مقایسه با کنترل تفاوت معنی داری نداشت. نتیجه گیری: نانومولسیون عصاره گیاه قدرت ممانعت از رشد و باکتری کشی بیشتری دارد. با توجه به اینکه ژن *alg D* در تشکیل بیوفیلم مؤثر است و ژن *tox A* مسئول ترشح پروتئین سمی اندوتوکسین A می باشد، این احتمال وجود دارد نانومولسیون نقره عصاره گیاه از طریق تأثیر بر بیان این ژن ها در باکتری سودوموناس آئروژینوزا بتواند موجب مهار رشد در این باکتری گردد. کاهش اندازه قطرات عصاره درون نانومولسیون، غلظت ترکیبات فعال زیستی و ظرفیت ضد باکتریایی را در مقایسه با عصاره خالص افزایش داد؛ بنابراین می توان از آن در صنایع داروسازی و غذایی استفاده کرد.

#### واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، ضد میکروبی، نانو امولسیون نقره، *Nepeta binaludensis*، *tox A*، *alg D*.

### مقدمه

جنس پونه سا (*Nepeta* L.) از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) شامل حدود ۲۵۰ گونه مختلف یک ساله و چندساله است که در شمال آفریقا، اوراسیا و به ویژه در منطقه مدیترانه یافت می شود. این جنس در ایران دارای ۶۷ گونه است که به صورت وحشی در نقاط مختلف ایران پراکنده است و بیشتر این گونه ها بومی ایران هستند (Marongiu et al., 2010). گونه پونه سایی بینالودی با نام علمی *Nepeta binaludensis* Jamzad گیاهی معطر، کمیاب و انحصاری ایران است که در مناطق محدودی از شمال شرق ایران در رشته کوه های بینالود رشد می کند. پونه سایی بینالودی به طور گسترده در طب سنتی برای سردرد، میگرن، اختلالات گوارشی و روماتیسم استفاده می شود. براساس مطالعات قبلی محققان که عصاره های مختلف *N. binaludensis* را از نظر محتوای فنلی و فلاونوئیدی کل و فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی مورد بررسی قرار داده بودند؛ مشخص گردید که عصاره هیدروآتانولی آن خصوصیات آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی دارد (Mohammadpour et al., 2013; Rustaiyan & Nadji, 1999; Nejad-Alimoradi et al., 2024).

روش های تولید زیستی نانوذرات نسبت به روش های فیزیکی و شیمیایی، به دلیل کاهش مصرف انرژی و زمان، اولویت دارند. اسانس و عصاره گیاهان موادی طبیعی حاوی مخلوطی از ترکیب های فرار و غیر فرار هستند که به دلیل

فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد قارچی و ضد میکروبی در زمینه های مختلفی مانند صنایع دارویی و بهداشتی مورد توجه قرار گرفته اند (Kirtane et al., 2021). استفاده مستقیم از اسانس و عصاره گیاهان دارویی ممکن است باعث نوسان سریع اجزای آن شده و اثربخشی آنها را کاهش دهد، به همین دلیل از سیستم های نانو برای محصور کردن و افزایش پایداری آنها استفاده می شود. نانومولسیون ها از معروف ترین مواد حامل ایده آل برای تحویل مواد چربی دوست اند که علت این موضوع آماده سازی ساده، قابل دسترس بودن، اندازه کوچک، پایداری و تأثیرگذاری زیستی آنها می باشد. از سویی نانومولسیون ها به طور ذاتی عوامل ضد باکتری به حساب می آیند؛ زیرا ساختار آنها به ذرات آب متصل شده و آب را از دسترس میکروارگانیسم ها خارج می کند (Malik et al., 2023).

یکی از شایع ترین مشکلات در بیمارستان ها، عفونت های ایجاد شده توسط باکتری *Pseudomonas aeruginosa* می باشد که برای انسان یک پاتوژن فرصت طلب محسوب می شود. باکتری سودوموناس آئروژینوزا، باسیل گرم منفی، هوازی اجباری، غیر تخمیری متحرک با تک تازه قطبی و نیازهای غذایی حداقل است. تمایل برای رشد در محیط های مرطوب، به موفقیت اکولوژیکی و اهمیت آن به عنوان یک بیماری زای مهم در عفونت های کسب شده بیمارستانی کمک می کند (Reynolds & Kollef, 2021).

توانایی این باکتری در تولید فاکتورهای بیماری زایی فراوان مانند آلزینات، پروتئازها، پیوسیانین، پیووردین،

از این رو، در این تحقیق، خواص ضد میکروبی نانوامولسیون نقره حاوی عصاره گیاه *N. binaludensis* و تأثیر آن بر تغییر بیان ژن‌های *toxA* و *algD* در باکتری سودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

### نمونه برداری

گیاه پونه‌سای بینالودی (*Nepeta binaludensis*) از ارتفاع ۲۵۱۷ متری کوه بینالود واقع در اطراف نیشابور در استان خراسان رضوی با مختصات جغرافیایی  $N=36, 16, 553^s$  و  $E=0.59, 0.7, 361^s$  در خرداد ۱۴۰۱ جمع‌آوری گردید. شناسایی گونه توسط جوهرچی در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد و در هر بار یوم این دانشگاه با کد هر بار یومی (FUMH) ۳۶۸۰۶ نگهداری گردید. سرشاخه‌های گلدار گیاه پس از جداسازی و شستشو، در شرایط مناسب در سایه و در مجاورت هوا خشک شد.

### استخراج عصاره هیدروالکلی

عصاره‌گیری از سرشاخه‌های گلدار پونه‌سای بینالودی با روش خیس کردن انجام شد. ابتدا ۴۰ گرم از پودر گیاه خشک شده داخل بطری درب‌دار ریخته شد و بعد ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به آن اضافه گردید. سپس بطری‌ها در دستگاه انکوباتور شیک‌ر در دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. مایع رویی به وسیله کاغذ صافی واتمن و پارچه تنظیف صاف گردید. برای تغلیظ عصاره، از دستگاه روتاری با دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه و دور ۶۰ rpm به مدت ۲/۵ ساعت استفاده شد. سپس عصاره به کمک باد سرد ششوار کامل خشک گردید و در ویال قرار داده و در یخچال نگهداری شد (Moraghebi et al., 2023).

### ارزیابی مقدار برخی ترکیب‌های فنلی عصاره با HPLC

مقدار ۰/۱ گرم از عصاره در ۲ میلی‌لیتر حلال متانول حل گردید و ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات به آن اضافه شد و از فیلتر

رامنولیید، فسفولیاز C، پپلی برای اتصال و کلونیزاسیون به سلول‌های میزبان و تشکیل بیوفیلم باعث شده که در زمره مهمترین پاتوژن‌ها قرار گیرد و مقاومت زیادی نسبت به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های متداول دارد. حضور گلیکوکالیکس در این باکتری سبب می‌شود که اتصال باکتری به سلول میزبان و تشکیل میکروکلونی به سهولت انجام شود (Thi et al., 2020). سه نوع پلی‌ساکارید (آلژینات، ناحیه سنتز پلی‌ساکارید (Psl) و پلی‌ساکارید پوسته سطحی (Pel))، توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید می‌شوند و با ایجاد یکپارچگی ساختاری به توسعه بیوفیلم کمک می‌کنند (Reynolds & Masoumi et al., 2024؛ Kollef, 2021). پروتئین *algD* (GDP-مانوز ۶ دهیدروژناز) که توسط ژن *algD* کد می‌شود با دو پروتئین دیگر در ساخت آلژینات شرکت می‌کند. آلژینات یک پلیمر خطی و بدون انشعاب است که از اسید ال-گلورونیک و اسید دی-مانورونیک تشکیل شده است که پشتیبانی و حفاظت ساختاری را فراهم می‌کند و مسئول حفظ مواد مغذی و آب در بیوفیلم و ایجاد عفونت‌های مزمن ریه در بیماران است (Elahi et al., 2021؛ Jurado-Martín et al., 2021). در طول تشکیل بیوفیلم، محیط بیوفیلم اسیدی می‌شود و نفوذ عامل ضد میکروبی را محدود می‌کند (Rossi et al., 2021).

یکی دیگر از فاکتورهای مهم این باکتری، سیستم ترشحی نوع سوم است که عامل تزریق مستقیم مجموعه‌ای از پروتئین‌ها به درون سیتوزول سلول هدف است. یکی از پنج آنزیم مهم این گروه، اگزوآنزیم A است که توسط ژن اگزوتوکسین A (*toxA*) کد شده و به وسیله این سیستم به سلول هدف منتقل می‌شود (Jurado-Martín et al., 2021). اگزوتوکسین A برای سلول‌های یوکاریوتی سمی بوده و می‌تواند پروتئین‌سازی را درون سلول مهار کرده و باعث ایجاد صدمه‌هایی به بافت ریه و مغز شود (Rossi et al., 2021). اگزوتوکسین A از طریق انتقال بخش ریبوزیل آدنوزین دی فسفات از نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید به فاکتور افزایش طول شماره ۲، از سنتز پروتئین جلوگیری می‌کند (Elahi et al., 2024).

(XRD- PW 1730-Philips) وجود یا عدم وجود کریستال در نانوامولسیون حاوی عصاره مورد ارزیابی قرار گرفت (Tofangchi Mahyari et al., 2025).

کشت باکتری سودوموناس آئروژینوزا سویه استاندارد باکتری سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027) به صورت فعال از مرکز ذخایر ژنتیکی تهیه گردید و بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد. نمونه‌های کشت داده شده، به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند (Ha et al., 2014).

#### آزمون‌های تعیین حساسیت دارویی

به منظور انجام آزمون انتشار دیسک (Kirby Bauer disk diffusion) محیط کشت مولر هیلتون آگار از شرکت میرمدیا- ایران مطابق شیوه‌نامه شرکت سازنده تهیه و داخل پلیت‌های ۱۰ سانتی‌متری استریل (فرازین، ایران) توزیع شد. با استفاده از سواب استریل، غلظت نیم مک فارلند ( $10^8 \times 1/5$  CFU/ml) از سودوموناس آئروژینوزا بر پلیت‌ها، کشت داده شد. دیسک‌های بلانک (شرکت پادتن طب، با قطر ۶ میلی‌متر) به‌طور جداگانه داخل عصاره تام گیاه، نانوامولسیون نقره عصاره و نانوذره نقره هریک با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد تا محلول‌ها به‌طور کامل جذب دیسک بلانک شدند. هریک از دیسک‌ها با رعایت فاصله استاندارد، بر روی محیط کشت قرار گرفت. همچنین پلیت‌هایی مشابه برای استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک برای کنترل و مقایسه آماده گردید. این دیسک‌ها شامل سیپروفلوکساسین (CP 5μg)، سفنازیدیم (CAZ 30μg)، جنتامایسین (GM 10μg)، تری متوپریم سولفامتوکسازول یا کوتریماکسازول (SXT 25μg) بود. پلیت‌های تلقیح شده و دیسک‌گذاری شده، به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس قطر هاله عدم رشد با خط‌کش اندازه‌گیری گردید (Miller et al., 2008; Hudzicki, 2009).

۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شد و بعد به دستگاه HPLC مجهز به دتکتور UV- شماره RIFR-WI-PHYT-29 تزریق گردید. دستگاه HPLC با فناوری سریع ۱۲۶۰ تمایلی دو با ستون Ultisil XB-C18, 5 μm با طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر مورد استفاده قرار گرفت. شستشوی اول ستون با متانول و محلول شستشوی دوم بافر فسفات با pH برابر با ۲/۳ بود که ستون با آن شستشو داده شد. دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه برای شستشوی گرادیان تنظیم شد. از آشکارساز PDA ۲۵۴، ۲۸۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر استفاده شد. نتایج مقادیر ترکیب‌های مورد سنجش براساس رقت‌های اعمال شده به ازای وزن عصاره خشک محاسبه شد (Azizian et al., 2021).

#### تهیه نانوامولسیون نقره حاوی عصاره گیاه

نانوامولسیون نقره حاوی عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی توسط Tofangchi Mahyari و همکاران (۲۰۲۵) برای پایان‌نامه کارشناسی ارشد، سنتز شده بود و در این تحقیق نیز مورد استفاده قرار گرفت. سنتز نانوامولسیون نقره حاوی عصاره با روش انرژی بالا انجام شد. ۵ میلی‌گرم نانوذره نقره به ۱ میلی‌لیتر روغن ویتامین D3 اضافه و همزده شد تا کاملاً یکنواخت شود. سپس محلول بدست آمده به ۲۰ میلی‌لیتر آب یونیزه شده حاوی ۵۰ میلی‌گرم عصاره اضافه گردید. محلول تحت فشار بالا همزده و به مدت ۳۰ دقیقه سونیکیت شد، سپس در ضمن همزدن به آن ۰/۲ میلی‌لیتر امولسی فایر توپین ۸۰ اضافه شده و بعد ۳۰ دقیقه سونیکیت شد. برای اطمینان از صحت ترکیب سنتز شده، با استفاده از دستگاه FTIR (IR/FT JASCO-4600-USA)، نوع مولکول‌ها و پیوندهای موجود در آن در طول موج بین ۴۰۰-۴۰۰۰  $\text{cm}^{-1}$  ارزیابی شد. با کمک میکروسکوپ الکترونی نگاره یا SEM در بزرگنمایی ۴۰۰ نانومتر (Zeiss, A-960 DMS)، شکل نانوامولسیون مورد مطالعه قرار گرفت و با دستگاه DLS (Malvern master size x)، اندازه ذرات و ظرفیت زتا سنجش گردید؛ با استفاده از دستگاه پراش اشعه ایکس

۴۵ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس واکنش‌ها در دستگاه ترموسایکلر ابتدا در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد و بعد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، هریک به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول واکنش سنتز cDNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

میزان بیان ژن‌های *tox A* و *algD* و ژن *16s rRNA* به عنوان ژن مرجع، با استفاده از دستگاه Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا پرایمرهای ژن‌های مذکور با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner 6.5.50 طراحی شد و در ادامه در بخش Blast سایت NCBI تأیید و توسط شرکت سیناکلون (ایران) سنتز گردید (جدول ۱). برای انجام آزمایش، ابتدا ۱۰ میکرولیتر SYBR Green master mix به هر میکروتیوب اضافه شد. سپس پرایمرها و محلول cDNA هریک از تیمارها به میزان ۱ میکرولیتر به میکروتیوب‌ها افزوده شد. سپس ۷ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز اضافه و مخلوط گردید. میکروتیوب‌های حاوی ۲۰ میکرولیتر محلول واکنش در دستگاه Real-Time PCR قرار داده شد. برنامه دمایی-زمانی دستگاه برای ۳۰ چرخه تنظیم گردید: واسرشتی اولیه ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون هر چرخه ۹۳ درجه سانتیگراد، دمای اتصال ۶۱ درجه سانتیگراد، طویل شدن ۷۲ درجه سانتیگراد (هریک به مدت ۳۰ ثانیه) و در پایان طویل شدن نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد (Maddah et al., 2022). آزمایش در دو تکرار انجام شد. نمودار ذوب و تکثیر بدست آمده مورد بررسی قرار گرفت. با محاسبه  $\Delta\Delta Ct$  و مقایسه با ژن مرجع، با استفاده از فرمول زیر Fold Change هر ژن در Excel 2016 محاسبه شد.

$$\text{Relative expression (Fold change)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Test}} - \Delta Ct_{\text{Control}}$$

$$\Delta Ct_{\text{Test}} = Ct_{\text{Target gene (T)}} - Ct_{\text{Reference gene (T)}}$$

$$\Delta Ct_{\text{control}} = Ct_{\text{Target gene (C)}} - Ct_{\text{Reference gene (C)}}$$

برای انجام آزمون‌های MIC و MBC، براساس روش بیان شده در Clinical and Laboratory Standards Institute 2023 در سه تکرار عمل شد. ابتدا سوسپانسیون سلول‌های باکتریایی با کدورت نیم مک فارلند ( $1.0 \times 10^8$  - CFU/ml) تهیه گردید. سپس داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه هریک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هیلتون آگار افزوده شد، آنگاه به میزان ۲٪ حجم محیط کشت از سوسپانسیون نیم مک فارلند به چاهک‌ها اضافه گردید. از هریک از عصاره تام گیاه و نانوامولسیون نقره عصاره رقت سریالی ۶۴۰، ۳۲۰، ۱۶۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و از نانو ذره نقره رقت سریالی ۲۴۰، ۴۸۰، ۹۶۰، ۱۹۲۰، ۳۸۴۰ و ۷۶۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه و به چاهک‌ها اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و بعد میزان MIC، subMIC و MBC تعیین گردید (Rodriguez-Melcon, 2021).

#### سنجش تغییرات بیان ژن با روش Real-Time PCR

یک میلی‌لیتر محیط کشت مولر هیلتون آگار داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. پس از افزودن باکتری با کدورت نیم مک فارلند به هر چاهک، سپس به میزان غلظت‌های MIC و subMIC از هریک از تیمارهای نانوذره نقره، عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی و نانوامولسیون نقره حاوی عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی به چاهک‌ها اضافه گردید. ۲۴ ساعت بعد، از نمونه‌های باکتریایی تیمار شده با غلظت‌های MIC و SubMIC و نیز نمونه‌های شاهد، به کمک کیت استخراج RNA شرکت پارس طوس زیست فناوری (ایران)، RNAها استخراج گردید. برای هریک از تیمارها ۴ میکرولیتر از RNA استخراج شده برای سنتز cDNA استفاده شد.

سنتز cDNA، با استفاده از دستورالعمل کیت Easy cDNA synthesis (cat.A101161)، ساخت شرکت پارس طوس ایران، انجام شد. مخلوط مواد سنتز cDNA، به مدت

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای ژن مرجع و ژنهای هدف مورد استفاده در Real-Time PCR

Table 1. Characteristics of the housekeeping gene and target gene primers used in Real-Time PCR

| Gene            | Accession number   | Primer sequence                                                | Product size (bp) | Melting temperature (C°) |
|-----------------|--------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------|
| <i>16s rRNA</i> | NR_040789.1        | F: 5'-GGGCGAAGAAGGAAATGGTC-3'<br>R: 5'-CAGGTGGCGTAGGTGGAGAA-3' | 171               | 61                       |
| <i>algD</i>     | NC_002516.2        | F: 5'-GCGACCTGGACCTGGGCT-3'<br>R: 5'-TCCTCGATCAGCGGGATC-3'     | 144               | 60                       |
| <i>toxA</i>     | NC-00251602-PA1148 | F: 5'-GGTAGTTGGTCGCTGAAC-3'<br>R: 5'-CAGGTGGCGTAGGTGGAGAA-3'   | 220               | 58                       |

بازداری ۱۶/۶۹۸ دقیقه نشان داد. براساس این چهار نمودار استاندارد و مقایسه قله‌ها و زمان بازداری ترکیب‌های مشخص شده آن با نمودارهای حاصل از عصاره گونه پونه‌سای بینالودی در شکل ۱- b، مشخص شد که عصاره این گیاه فاقد اسید گالیک، کاتچین، روتین و کوئرستین است. مقدار اسید کلروژنیک ۴/۶۰، اسید کافئیک ۰/۷۵، اسید رزمارینیک ۲۰/۸۲ و اسید سالیسیلیک ۰/۰۸ میلی‌گرم بر گرم بدست آمد (شکل ۱، جدول ۲).

نتایج ارزیابی نانوامولسیون حاوی عصاره براساس یافته‌های بدست آمده توسط محققان، ارزیابی نوع مولکول‌ها و پیوندهای موجود در نانوامولسیون نقره حاوی عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی توسط دستگاه FTIR، حضور آب و پیوندهای استری در آن را ثابت نمود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره یا SEM، کروی بودن ذرات نانوامولسیون سنتز شده را تأیید کرد. اندازه‌گیری قطر ذرات ظرفیت زتای آنها با دستگاه DLS، نشان داد که قطر ذرات حدود ۲۷۰ نانومتر بوده و بار سطحی آن منفی می‌باشد؛ با استفاده از دستگاه پراش اشعه ایکس (XRD) غیر کریستالی بودن ذرات مورد تأیید قرار گرفت (Tofangchi Mahyari et al., 2025).

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

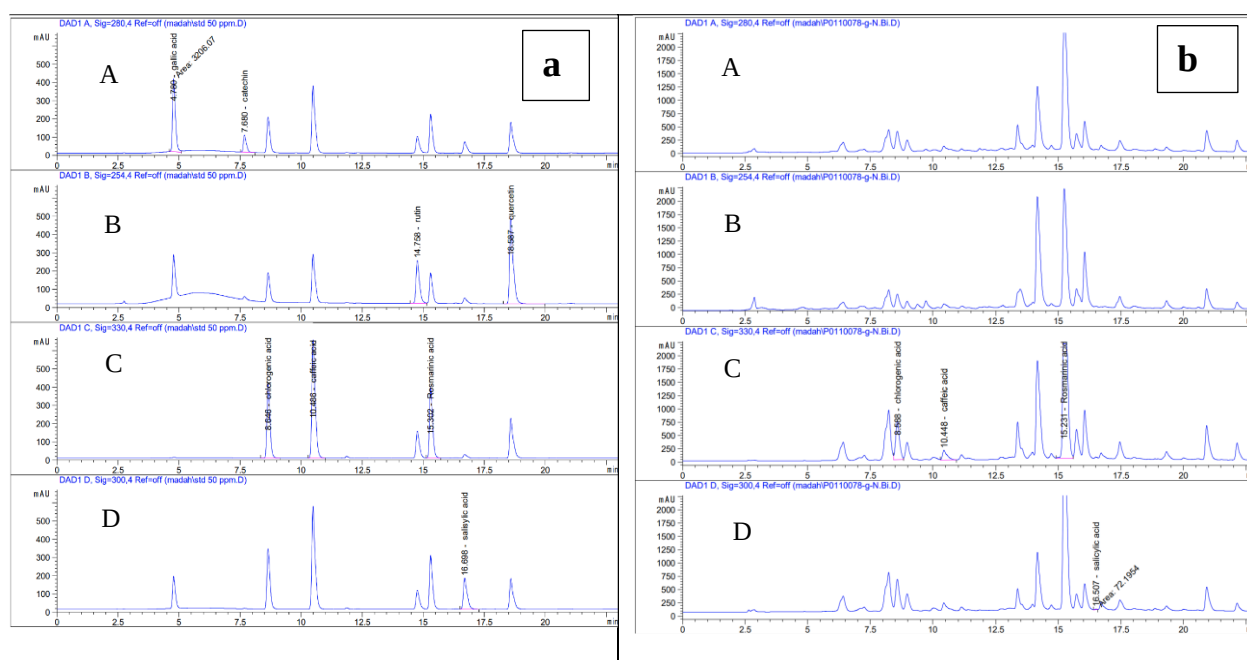
آزمون‌های آنتی‌بیوگرام و MIC با سه تکرار انجام شد و نتایج بسیار مشابه در هر تکرار بدست آمد، نتایج به صورت میانگین سه تکرار فنی گزارش شد. نتایج حاصل از آزمایش Real-Time PCR شامل CT نمونه‌ها به همراه Amplification آنها، به وسیله نرم‌افزار REST مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج با آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزارهای Microsoft Excel 2016 و GraphPad Prism 9.5.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نمودارها با GraphPad Prism ترسیم گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح معناداری  $P < 0.05$  انجام شد.

### نتایج

#### مقادیر برخی ترکیب‌های فلاونوئیدی و فنلی عصاره

سنجش مقدار برخی ترکیب‌های عصاره با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در شکل ۱ آمده است. در بخش a، به ترتیب برای نمودار A زمان بازداری ( $t_R$ ) ترکیب کاتچین ۷/۶۸۰ و اسید گالیک ۴/۷۸۰ دقیقه بدست آمد. در نمودار B کوئرستین با زمان بازداری ۱۸/۵۸۷ دقیقه و روتین با زمان بازداری ۱۴/۷۵۸ مشخص شدند. در نمودار C زمان بازداری سه ترکیب اسید رزمارینیک در ۱۵/۲۳۱ دقیقه، اسید کافئیک در ۱۰/۴۸۶ دقیقه و اسید کلروژنیک در ۸/۶۴۶ دقیقه بدست آمد. نمودار D، قله اسید سالیسیلیک را در زمان





شکل ۱- کروماتوگراف حاصل از HPLC عصاره هیدروالکلی سرشاخه‌های گل‌دار گیاه پونه‌سای بینالودی (*Nepeta binaludensis*); (a) نمودار ترکیبات استاندارد و (b) نمودار عصاره برای سنجش مقدار A: کاتچین و اسید گالیک، B: کوئرستین و روتین، C: اسید رزمارینیک، اسید کافئیک و اسید کلروژنیک و D: اسید سالیسیلیک

**Figure 1.** HPLC chromatograph from hydroalcoholic extract of *Nepeta binaludensis* flowering shoots; a) Standard compounds diagram and b) extract diagram for measuring the content of A: catechin and gallic acid, B: quercetin and rutin, C: rosmarinic acid, caffeic acid, and chlorogenic acid, and D: salicylic acid  
tr: retention time

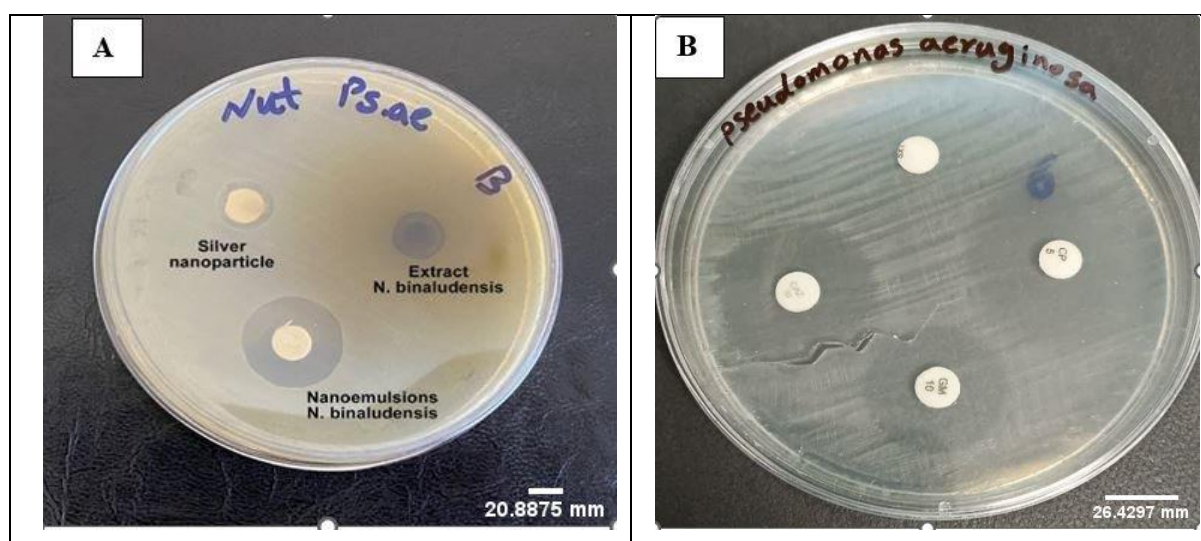
جدول ۲- محتوای برخی ترکیب‌های فنولیک در عصاره هیدروالکلی پونه‌سای بینالودی (*Nepeta binaludensis*)

**Table 2.** Some phenolics content in *Nepeta binaludensis* hydroalcoholic extract

| Composition<br>(mg.g <sup>-1</sup> ) | Gallic<br>acid | Catechin | Rutin | Quercetin | Chlorogenic<br>acid | Caffeic<br>acid | Rosmarinic<br>acid | Salicylic<br>acid |
|--------------------------------------|----------------|----------|-------|-----------|---------------------|-----------------|--------------------|-------------------|
| <i>N. binaludensis</i><br>extract    | -              | -        | -     | -         | 4.60                | 0.75            | 20.83              | 0.08              |

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین به میزان ۲۶ میلی‌متر بدست آمد و در برابر آنتی‌بیوتیک تری متوپریم-سولفامتوکسازول یا کوتریماکسازول (SXT) هیچ هاله عدم رشدی تشکیل نشد (شکل B۲ و جدول ۳). میزان هاله عدم رشد تشکیل شده توسط نانوامولسیون نقره حاوی عصاره تقریباً مشابه میزان عدم رشد القا شده توسط سفنازیدیم (CAZ) بود.

نتایج آزمون‌های تعیین حساسیت دارویی نتایج به دست آمده از آزمون آنتی‌بیوگرام نشان داد، بیشترین میزان مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا در حضور نانوامولسیون نقره حاوی عصاره به میزان ۲۰/۹-۲۱/۲ میلی‌متر و کمترین میزان مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا در حضور نانوذره نقره به میزان ۱۲-۱۲/۲ میلی‌متر مشاهده گردید (شکل A۲ و جدول ۳). قطر هاله عدم رشد تحت تأثیر عصاره به تنهایی حد وسط دو تیمار دیگر و به میزان ۱۶/۸-۱۷ میلی‌متر بدست آمد. نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام، برای



شکل ۲- آزمون آنتی‌بیوگرام برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* و مقایسه قطر هاله عدم رشد؛ (A) تحت تیمار با نانوذره نقره، عصاره هیدروالکلی گیاه پونه‌سای بینالودی (*Nepeta binaludensis*) و نانو امولسیون نقره حاوی عصاره هیدروالکلی گیاه پونه‌سای بینالودی و (B) تحت تیمار با چهار نوع دیسک آنتی‌بیوتیک شامل سیپروفلوکساکین (CP)، سفتازیدیم (CAZ)، جنتامایسین (GM) و تریمتوپرین/سولفامتوکسازول (SXT)

**Figure 2.** Antibigram test for *Pseudomonas aeruginosa* and comparison of inhibition zone diameter; A) treated by silver nanoparticle, *Nepeta binaludensis* hydroalcoholic extract, and silver nanoemulsion containing *N. binaludensis* hydroalcoholic extract, and B) treated by four types of antibiotic disks, including ciprofloxacin (CP), ceftazidime (CAZ), gentamicin (GM), and trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)

جدول ۳- نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* تحت تیمار با نانوذره نقره، عصاره هیدروالکلی گیاه پونه‌سای بینالودی (*Nepeta binaludensis*) و نانو امولسیون نقره حاوی عصاره هیدروالکلی گیاه پونه‌سای بینالودی، به همراه چهار نوع دیسک آنتی‌بیوتیک

**Table 3.** Antibigram test results for *Pseudomonas aeruginosa* treated by silver nanoparticle, *Nepeta binaludensis* hydroalcoholic extract, and silver nanoemulsion containing *N. binaludensis* hydroalcoholic extract, accompanied by four types of antibiotic disks

| Treatment ( $\mu\text{g}$ )            | Inhibition zone (mm) |
|----------------------------------------|----------------------|
| AgNPs 30                               | 12-12.2              |
| NB Ex 30                               | 16.8-17              |
| NBAGNPs 30                             | 20.9-21.2            |
| Ciprofloxacin (CP 5)                   | 26 (S)               |
| Ceftazidime (CAZ 30)                   | 22 (S)               |
| Gentamicin (GM 10)                     | 19 (S)               |
| Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT 25) | 0 (R)                |

AgNPs: Silver nanoparticles, NB Ex: *N. binaludensis* extract, and NBAGNPs: Silver nanoemulsion contained *N. binaludensis* extract.

R: resistant and S: susceptible

و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است، پس قدرت مهارکنندگی رشد باکتری و کشندگی آن در نانو امولسیون نقره حاوی عصاره گیاه از نانوذره نقره به تنهایی و عصاره تام به تنهایی بیشتر بوده است.

نتایج آزمون MIC در جدول ۴ نشان داد، کمترین مقادیر تعیین شده برای MIC، MBC و SubMIC باکتری سودوموناس آئروژینوزا در حضور نانو امولسیون نقره حاوی عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی، به ترتیب ۸۰، ۴۰

جدول ۴- نتایج آزمونهای MIC، MBC و SubMIC برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* تحت تیمار با نانوذره نقره، عصاره هیدروالکلی گیاه پونه‌سای بینالودی (*Nepeta binaludensis*) و نانو امولسیون نقره حاوی عصاره هیدروالکلی گیاه پونه‌سای بینالودی

**Table 4. MIC, MBC, and SubMIC tests results for *Pseudomonas aeruginosa* treated by silver nanoparticle, *Nepeta binaludensis* hydroalcoholic extract, and silver nanoemulsion containing *N. binaludensis* hydroalcoholic extract**

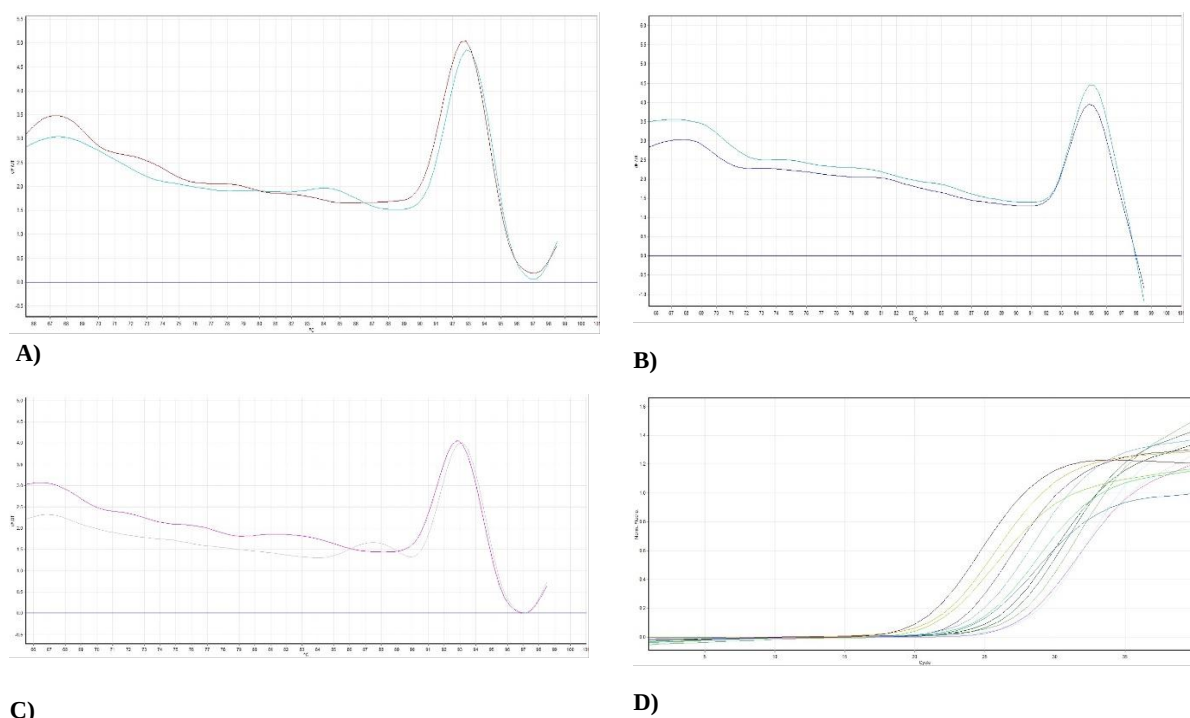
| Treatment ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) | MBC | MIC | SubMIC |
|-------------------------------------|-----|-----|--------|
| AgNPs                               | 120 | 60  | 30     |
| NB Ex                               | 320 | 160 | 80     |
| NBAgNPs                             | 80  | 40  | 20     |

AgNPs: Silver nanoparticles, NB Ex: *N. binaludensis* extract, and NBAgNPs: Silver nanoemulsion contained *N. binaludensis* extract.

### تغییرات بیان ژنهای *toxA* و *algD*

تغییرات بیان ژن *toxA* و *algD* در باکتری سودوموناس آئروژینوزا تیمار شده با غلظت‌های MIC و SubMIC در سه گروه تیمار نانوذره نقره (AgNPs)، عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی (NB Ex) و نانو امولسیون نقره حاوی عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی (NBAgNPs) در مقایسه با ژن مرجع *16s rRNA* یا کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت. تک قله بودن هر

سه منحنی ذوب ژن‌ها نشان داد که واکنش Real-Time PCR به‌طور اختصاصی و صحیح انجام شده و پرایمر دایمری تشکیل نشده است (شکل ۳ A,B,C). براساس حد آستانه چرخه یا CT‌های بدست آمده از نمودار تکثیر ژن‌ها (شکل ۳ D و جدول ۵) و بر پایه محاسبات انجام شده، تغییرات بیان ژن‌ها در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۳- منحنی ذوب ژن‌های A) *16s rRNA* (ژن مرجع)، B) *algD*، C) *toxA* و D) منحنی تکثیر ژن‌ها

**Figure 3. Melting curve of genes A) *16s rRNA* (Housekeeping gene), B) *algD*, C) *toxA*, and D) gene amplification curve**

جدول ۵- مقادیر حد آستانه چرخه (CT) در نمودارهای تکثیر *16s rRNA* (ژن مرجع)، *algD* و *toxA* (ژن‌های هدف)  
**Table 5. Cycle threshold (CT) values in the amplification diagrams of *16s rRNA* (housekeeping gene), *algD*, and *toxA* (target genes)**

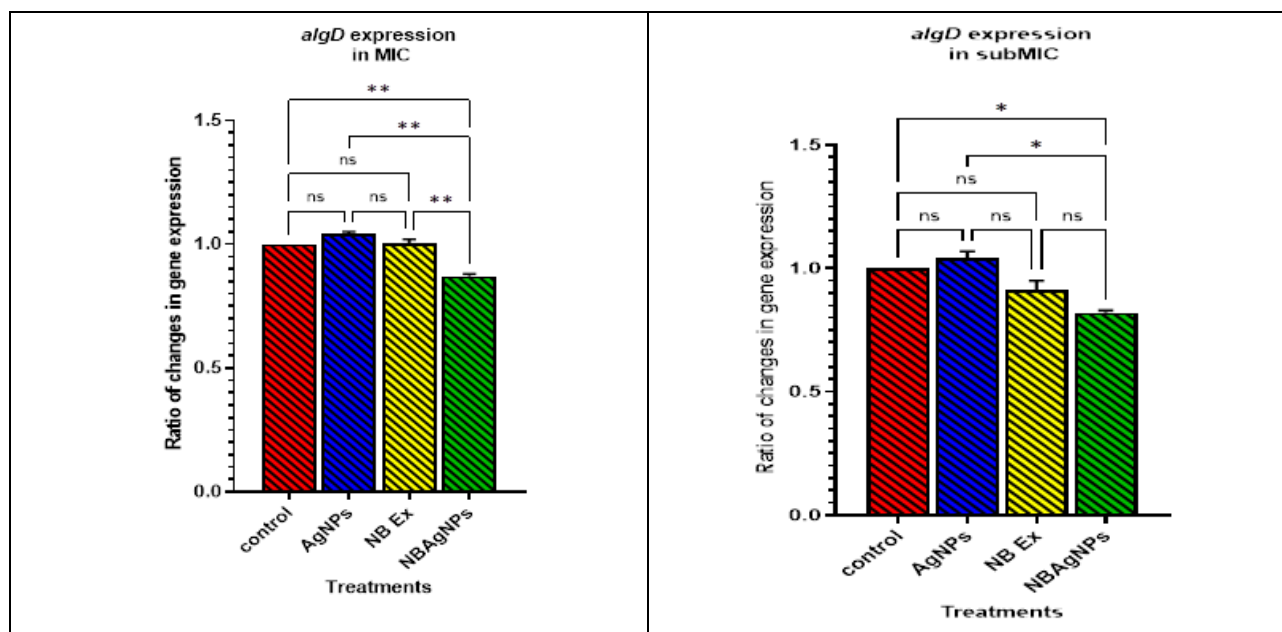
| Treatment                                 | CT <i>16s rRNA</i> | CT <i>toxA</i> | CT <i>algD</i> |
|-------------------------------------------|--------------------|----------------|----------------|
| MIC- AgNPs (60 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )    | 19.45              | 18.125         | 18.75          |
| subMIC- AgNPs (30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) | 19.31              | 18.42          | 18.12          |
| MIC-NB Ex (160 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )    | 19.57              | 18.5           | 18.3           |
| subMIC-NB Ex (80 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )  | 19.25              | 18.39          | 18.81          |
| MIC- AgNPs (40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )    | 19.42              | 18.69          | 18.5           |
| subMIC- AgNPs (20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) | 19.82              | 18.33          | 18.07          |

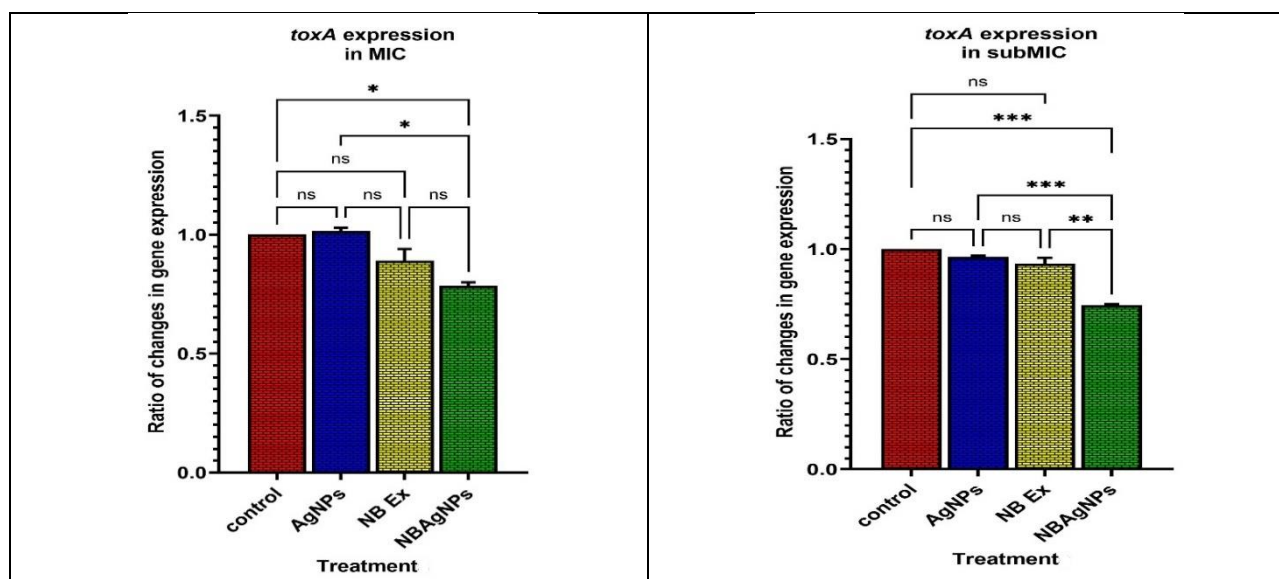
AgNPs: Silver nanoparticles, NB Ex: *N. binaludensis* extract, and NBAGNPs: Silver nanoemulsion contained *N. binaludensis* extract.

شکل ۴ C نشان داده شده است. براساس این نمودار بیان ژن *toxA* به میزان ۰/۷۸ برابر کنترل تحت تیمار با نانوامولسیون نقره حاوی عصاره گیاه کاهش معنی‌دار در سطح ۵ درصد داشته است. تغییر بیان این ژن تحت تأثیر عصاره گیاه و نانوذره نقره در مقایسه با کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. تیمار باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا با غلظت‌های SubMIC از هریک از سه تیمار مذکور نشان داد که فقط تیمار با نانوامولسیون نقره حاوی عصاره توانست موجب کاهش ۰/۷۵ برابری بیان ژن *toxA* نسبت به کنترل ( $P < 0.001$ ) گردد. این کاهش بیان نسبت به عصاره و نانوذره نقره نیز معنی‌دار است؛ اما عصاره تام و نانوذره نقره نسبت به کنترل نتوانستند تغییر معنی‌داری بر بیان این ژن داشته باشند (شکل ۴ D).

میزان بیان ژن *algD* فقط تحت تیمار با غلظت MIC نانوامولسیون حاوی عصاره گیاه، ۰/۸۷ برابر کاهش نسبت به کنترل نشان داد ( $P < 0.01$ ). اما تغییر اندک میزان بیان این ژن تحت تأثیر عصاره گیاه و نانوذره نقره در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری نداشت و هیچیک از عصاره و نانو ذره نقره به تنهایی تأثیری بر بیان ژن *algD* نداشتند (شکل ۴ A). تحت تیمار با غلظت SubMIC فقط نانوامولسیون حاوی عصاره گیاه توانست به میزان ۰/۸۲ برابر نسبت به کنترل، موجب کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بیان ژن *algD* گردد (شکل ۴ B).

تغییرات میزان بیان ژن *toxA* در باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزای تحت تأثیر هریک از تیمارها در غلظت MIC، در





شکل ۴- نمودار تغییر بیان ژن‌ها در باکتری *Pseudomonas aeruginosa* با غلظت‌های MIC و SubMIC تحت تیمار با نانوذره نقره، عصاره هیدروالکلی گیاه پونه‌سای بینالودی (*Nepeta binaludensis*) و نانو امولسیون نقره حاوی عصاره هیدروالکلی گیاه پونه‌سای بینالودی

**Figure 4. Diagram of genes expression change in *Pseudomonas aeruginosa* with MIC and SubMIC concentrations treated by silver nanoparticle, *Nepeta binaludensis* hydroalcoholic extract, and silver nanoemulsion contained *N. binaludensis* hydroalcoholic extract**

Control: without treatment, AgNPs: Silver nanoparticles, NB Ex: *N. binaludensis* extract, and NBAGNPs: Silver nanoemulsion contained *N. binaludensis* extract.

ns, \*, \*\*, and \*\*\*: non-significant, significant at 5, 1, and 0.1% probability levels, respectively.

شد.

## بحث

در این مطالعه، قطر هاله عدم رشد باکتری تحت تأثیر نانوامولسیون نقره عصاره گیاه حدود ۲۱ میلی‌متر، عصاره گیاه حدود ۱۷ میلی‌متر و تحت تأثیر نانوذرات نقره برابر ۱۲ میلی‌متر بود که نشان داد هر سه نوع تیمار دارای فعالیت ضد باکتریایی بر روی سویه سودوموناس آئروژینوزا هستند؛ اما حالت هم‌افزایی نانوامولسیون بیشترین ممانعت از رشد را نشان داد. قدرت مهارکنندگی رشد نانوامولسیون سنتز شده به‌طور تقریبی مشابه آنتی‌بیوتیک سفنازیدیم ۳۰ میکروگرم بود و این نانوامولسیون قدرت مهارکنندگی بیشتری نسبت به جنتامایسین ۱۰ میکروگرم و کوتریماکسازول ۲۵ میکروگرم داشت. در مطالعه Farrokhpour و همکاران (۲۰۱۹) نیز بیشترین مقدار قطر منطقه عدم رشد باکتری استریتوکوکوس مورد آزمایش، مربوط به تلفیقی از ترکیب عصاره و اسانس گیاه اکالیپتوس میکروتکا (*Eucalyptus microteca*) و

سنتز انواع نانوذرات فلزی در سال‌های اخیر به یک زمینه تحقیقاتی جدید و امیدوارکننده تبدیل شده است. روش‌های سنتز بر پایه گیاهان راهی مطمئن‌تر و اقتصادی‌تر برای سنتز نانوذرات فلزی هستند. زمانی که نوبت به نانوذرات زیست سازگار در میان تمام روش‌های سنتز سبز می‌رسد، ساخت با واسطه عصاره گیاهی به دلیل شیوه‌نامه مقرون‌به‌صرفه و مدیریت آسان آن در اولویت قرار دارد (Abou El-Nour et al., 2020). با توجه به اهمیت گیاهان و لزوم حفظ آنها، استفاده از راهکارهای کاهش غلظت مؤثر و کاهش میزان استفاده از آنها می‌تواند از نظر زیست محیطی و اقتصادی به‌صرفه باشد. از این رو، در این مطالعه، به ارزیابی خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره، عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی و نانوامولسیون حاوی عصاره گیاه و تأثیر آنها بر بیان ژن‌های *algD* و *toxA* در باکتری سودوموناس آئروژینوزا پرداخته

زیرخانواده Nepetoideae است که فعالیت آنتی اکسیدانی بالا و خواص ضد باکتریایی دارد (Azimi Mahalleh et al., 2020؛ Matejczyk et al., 2018). مسیرهای باکتری‌کشی نانوذرات نقره و چالش‌های آنها در درمان عفونت‌های باکتریایی به‌طور کامل مشخص نیست (López-Heras et al., 2015). Katva و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که کمپلکس‌های دارو و نانوذرات نقره،  $Ag^+$  را با سرعت بیشتری آزاد می‌کنند (Katva et al., 2018). بر این اساس احتمال دارد، ترکیب‌های فعال پونه‌سای بینالودی باعث متصل شدن ترکیب‌ها با  $Ag^+$  شود که موجب افزایش غلظت مؤثر ترکیب در یک مکان خاص و از بین رفتن یکپارچگی غشای باکتری می‌شود. در یک بررسی توسط Lin و همکاران (۲۰۲۰) نانوذرات نقره به تنهایی فعالیت ضد باکتریایی بر علیه سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، کاندیدا آلبیکنس و باسیلوس سوبتیلیس نشان داد. همچنین نانوذره نقره با عصاره *Eurotium cristatum* به‌طور هم‌افزایی برای مهار رشد سویه‌های بیماری‌زا عمل کرد که تأثیری بیشتر از مجموع اثرهای هریک از آنها به تنهایی داشت (Lin et al., 2020). در پژوهشی دیگر، سنتز نانوذرات مس با استفاده از عصاره برگ گیاه *Nepeta cataria* انجام شد (Mani et al. 2023). نتایج نشان داد که عصاره‌های آبی برگ این گیاه حاوی پلی‌فنول و فلاونوئید است. نانوذرات مس حاوی عصاره اثر بازدارندگی رشد بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی، انتروکوکوس فکالیس و استافیلوکوکوس اورئوس داشتند. این یافته‌ها با نتایج به دست آمده از این تحقیق همسو بود.

سودوموناس آئروژینوزا دارای فاکتورهای بیماری‌زایی متعددی از جمله آگزوتوکسین A، آلزینات، لیپو پلی‌ساکارید، پیلی، فسفو لیپاز C و الکالین پروتئاز است. از عوامل ایجاد بیماری توسط باکتری‌ها، بیان ژن‌های بیماری‌زای خاص در آنها می‌باشد (Thi et al., 2020). با توجه به اینکه آگزوتوکسین باکتریایی نقش مهمی در چسبندگی، تشکیل بیوفیلم و بیماری‌زایی باکتری‌ها دارند، بررسی تأثیر نانوذرات بر بیان این ژن احتمال دارد بتواند نقش مؤثری در کاهش

نانوذره نقره به میزان ۲۳ میلی‌متر بوده است (Farrokhpour et al., 2019). به‌نحوی که یافته‌های ما با نتایج Musimun و همکاران (۲۰۲۲) همسو است. آنان بیان کردند که ترکیب نانوذره نقره و عصاره گیاه *Vatica diospyroides* نسبت به تیمار جداگانه هریک قطر بیشتری از ممانعت از رشد را در محیط کشت نشان می‌دهد. اثرهای ضد باکتریایی نانوذرات نقره به عوامل مشترک مختلفی مانند ترکیب، اندازه، شکل، روش سنتز و منابع مواد (گیاهان یا باکتری‌ها) بستگی دارد (Musimun et al., 2022).

در این پژوهش آزمون MIC و MBC به منظور تعیین میزان قدرت ضد باکتریایی انجام شد. نتایج نشان داد که کمترین غلظت مهارکنندگی رشد باکتری یا MIC در تیمار عصاره پونه‌سای بینالودی به میزان ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و تحت تیمار با نانوامولسیون نقره پونه‌سای بینالودی به میزان ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. این در حالی است که کمترین غلظت کشندگی عصاره تام گیاه و نانوامولسیون نقره آن به ترتیب ۳۲۰ و ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. این نتایج با نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام به روش انتشار دیسک همسو بود که نشان داد نانوامولسیون نقره عصاره توان بیشتری برای مهار رشد باکتری داشته است.

انواع گونه‌های جنس پونه‌سای، ترکیب‌هایی مانند ایریدوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها و دی‌ترین‌ها دارند (Ghannadi et al. 2003؛ Skaltsa et al., 2000). کمیت و کیفیت مواد مؤثره گونه‌های مختلف یک جنس و یک گونه گیاه در رویشگاه‌های مختلف متفاوت است و همبستگی بالایی بین منشأ جغرافیایی گیاهان و مواد مؤثره آنها وجود دارد (Rafati et al., 2023). در این پژوهش مشخص گردید که عصاره هیدروالکلی پونه‌سای بینالودی فاقد اسید گالیک، کاتچین، روتین و کوئرستین است و دارای کلروژنیک اسید، کافئیک اسید، رزمارینیک اسید و سالیسیلیک اسید است و از بین این ۴ ترکیب فنلی، مقدار رزمارینیک اسید بیشتر از سایر ترکیب‌هاست. این نتایج با یافته‌های Azimi-Mahalleh و همکاران (۲۰۲۰) همسو است. رزمارینیک اسید فراوان‌ترین دایمرکافئیک اسید و مهمترین ترکیب فنلی به‌ویژه در



بیماری‌زایی این باکتری‌ها داشته باشد. بررسی تغییرات بیان ژن‌های *alg*D و *tox*A تحت تأثیر غلظت MIC و SubMIC نشان داد که نانوامولسیون نقره عصاره پونه‌سای بینالودی موجب کاهش بیان ژن‌های *alg*D و *tox*A در باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به گروه کنترل شده است. با توجه به اینکه ژن *alg*D یکی از ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلم است و ژن *tox*A مسئول ترشح پروتئین سمی اندوتوکسین A است، به نظر می‌رسد نانوامولسیون نقره عصاره پونه‌سای بینالودی بتواند موجب مهار رشد از طریق تأثیر بر بیان این ژن‌ها در این سویه باکتریایی گردد. به عبارتی، کاهش اندازه متوسط قطرات عصاره درون نانوامولسیون غلظت ترکیبات فعال زیستی و ظرفیت ضد باکتریایی نانوامولسیون را در مقایسه با عصاره خالص افزایش می‌دهد. البته تعیین مسیرهای تأثیر نانوامولسیون مذکور بر مهار رشد و یا حتی بررسی امکان مهار تشکیل بیوفیلم نیاز به تحقیقات تکمیلی بیشتر دارد. در راستای هدف محققان برای یافتن ترکیب‌های جدید برای کاهش بیماری‌زایی باکتری‌ها و مهار رشد آنها، بررسی انواع نانوذرات و نانوامولسیون‌ها یکی از حوزه‌های نوین تحقیقاتی است. در مطالعه Flockton و همکاران (۲۰۱۹) میزان تمایل اتصال نانوذرات پلیمری اصلاح شده با سطح لکترین LecA سودوموناس آئروژینوزا با آزمون هموگلوسیون مورد ارزیابی قرار گرفت. مشخص شد که ذرات تهیه شده تمایل بالایی به اتصال LecA باکتری داشته و تشکیل بیوفیلم را مهار می‌کند، در نتیجه اثر بیماری‌زایی بیوفیلم باکتری را کاهش داد. استفاده از نانوذرات، مانع از ایجاد خاصیت چسبندگی لکترین و جلوگیری از ایجاد بیوفیلم باکتری گردید (Flockton et al., 2019). این احتمال مطرح است که مونتاژ نانوذرات به عنوان داربست‌های چندمنظوره برای جلوگیری از فرایند چسبندگی اگزوتوکسین‌ها می‌باشد. Hamid و Al-Dhamin (۲۰۲۳)، بیان ژن *alg*D و تشکیل بیوفیلم را در باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس، تحت استرس غذایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که تحت تنش غذایی بیان ژن *alg*D و تشکیل بیوفیلم در دو گونه باکتری کاهش می‌یابد.

Rajabi و همکاران (۲۰۲۲) شیوع ژن‌های *alg*D, *psl*D, *pel*F, *Ppg*I, and *PAPI*-1 در تشکیل بیوفیلم در سویه‌های باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که رابطه معنی‌داری بین تشکیل بیوفیلم و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سفتازیدیم و مروپنم وجود دارد.

Yuan و همکاران (۲۰۱۷) اثرهای نانوذرات نقره سنتز شده به روش زیستی را روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا مطالعه کردند. یافته‌های آنان نشان داد که نانوذرات نقره اثرهای ضد باکتریایی را به روشی وابسته به دوز و زمان انجام داده و فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره در نتیجه تأثیر بر گونه‌های اکسیژن فعال، مالون دی آلدئید و نشت پروتئین‌ها و قندها در سلول‌های باکتریایی می‌باشد (Yuan et al., 2017). میان کنش نانوذرات با پروتئین‌های داخل سلولی، به‌ویژه پروتئین‌های غشایی حاوی سولفور و DNA میکروبی، می‌تواند با مداخله در تقسیم سلولی، منجر به مرگ سلولی شود (Palanisamy et al., 2014). در بررسی‌های مختلف نشان داده شده است که اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره با کاهش سطح آدنوزین تری فسفات درون سلولی، اتصال به گروه‌های عاملی پروتئین‌ها، از بین بردن خواص اصلی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، نفوذ به درون سلول‌ها، غیر فعال کردن آنزیم‌ها و تولید هیدروژن پراکسید و در نهایت مرگ باکتری نسبت داده شده است. این موضوع از یکسو سبب تغییر در ریخت‌شناسی و از سوی دیگر، افزایش نفوذپذیری غشاء و تأثیر در زنجیره تنفسی و تقسیم سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌گردد (Yeo et al., 2007).

در این مطالعه به ارزیابی خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره، عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی و نانوامولسیون عصاره گیاه و همچنین تأثیر بر بیان ژن‌های *tox*A و *alg*D در باکتری سودوموناس آئروژینوزا پرداخته شد. در بررسی خواص ضد میکروبی هر سه تیمار به روش انتشار دیسک و آزمون MIC، مشخص شد که نانوامولسیون عصاره گیاه قدرت ممانعت از رشد و باکتری‌کشی بیشتری دارد. همچنین نانوامولسیون عصاره به‌طور معنی‌داری موجب کاهش بیان ژن‌های *tox*A و

## سیاسگزاری

نویسندگان بر خود واجب می‌دانند، که از تمام افرادی که آنان را به نحوی در انجام این پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی نمایند. همچنین از مسئولان محترم آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام خمینی (ره) شهری و آزمایشگاه ژینوژن که نقش مؤثری در اجرای این پروژه داشتند، کمال قدردانی را دارند.

*algD* در باکتری سودوموناس آئروژینوزا گردید که در واقع نشانه‌ای بر تأثیر مثبت نانوامولسیون بر کاهش توان بیماری‌زایی باکتری است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات نقره در ترکیب با عصاره گیاه پونه‌سای بینالودی فعالیت کشندگی و ممانعت از رشد را بر روی سودوموناس آئروژینوزا دارد که با مطالعات پایه و بالینی می‌تواند در صنایع داروسازی و غذایی مورد بهره‌برداری قرار بگیرد.

## References

- Abou El-Nour, K.M., Eftaiha, A.A., Al-Warthan, A. and Ammar, R.A., 2020. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(3): 135-140. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.04.008>
- Azimi Mahalleh, A., Sharayei, P. and Azarpazhooh, E., 2020. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of bioactive compounds from *Nepeta* (*Nepeta binaludensis* Jamzad.). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(1): 668-678. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00314-1>
- Azizian, T., Alirezalu, A., Hassani A., Bahadori Sh. and Sonboli, A., 2021. Phytochemical analysis of selected *Nepeta* species by HPLC-ESI-MS/MS and GC-MS methods and exploring their antioxidant and antifungal potentials. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(3): 2417-2429. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00819-8>
- Elahi, G., Goli, H.R., Shafiei, M., Nikbin, V.S. and Gholami, M., 2024. Antimicrobial resistance, virulence gene profiling, and genetic diversity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Mazandaran, Iran. *BMC Microbiology*, 24(1): 546. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03707-5>
- Farrokhpour Gharegheshlaghi, R., Anzabi, Y. and Jafarizadeh-Malmiri, H., 2019. Evaluation of synergistic antimicrobial activity of silver nanoparticles and *Eucalyptus microtheca* on *Streptococcus mutans*. *Feyz Medical Sciences Journal*, 23(4): 334-343. <https://feyz.kaums.ac.ir/article-1-3759-en.pdf>
- Flockton, T.R., Schnorbus, L., Araujo, A., Adams, J., Hammel, M. and Perez, L.J., 2019. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation with surface-modified polymeric nanoparticles. *Pathogens*, 8(2): 55. <https://doi.org/10.3390/pathogens8020055>
- Ghannadi, A., Aghazari, F., Mehrabani, M., Mohagheghzadeh, A. and Mehregan, I., 2003. Quantity and composition of the SDE-prepared essential oil of *Nepeta macrosiphon* Boiss. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2: 103-105. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.20>
- Ha, D.G., Kuchma, S.L. and O'Toole, G.A., 2014. Plate-based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Molecular Biology*, 1149: 67-72. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_8)
- Hamid, N.M. and Al-Dhamin, A.S., 2023. Expression of *algD* gene in single-and dual-species biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* under starvation stress. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 7(1): 2152-2156. <http://www.doi.org/10.26538/tjnpr/v7i1.10>
- Hudzicki, J., 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*, 23p. <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M. and McClean, S., 2021. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6): 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- Katva, S., Das, S., Moti, H.S., Jyoti, A. and Kaushik, S., 2018. Antibacterial synergy of silver nanoparticles with gentamicin and chloramphenicol against *Enterococcus faecalis*.



- Pharmacognosy Magazine, 13(4): S828-S833. [https://doi.org/10.4103/pm.pm\\_120\\_17](https://doi.org/10.4103/pm.pm_120_17)
- Kirtane, A.R., Verma, M., Karandikar, P., Furin, J., Langer, R. and Traverso, G., 2021. Nanotechnology approaches global infectious diseases. *Nature Nanotechnology*, 16(4): 369-384. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00866-8>
  - Lin, P., Wang, F.Q., Li, C.T. and Yan, Z.F., 2020. An enhancement of antibacterial activity and synergistic effect of biosynthesized silver nanoparticles by *Eurotium cristatum* with various antibiotics. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 25(3): 450-458. <http://dx.doi.org/10.1007/s12257-019-0506-7>
  - López-Heras, M., Theodorou, I., Leo, B., Ryan, M. and Porter, A., 2015. Towards understanding the antibacterial activity of Ag nanoparticles: electron microscopy in the analysis of the materials-biology interface in the lung. *Environmental Science: Nano*, 2(4): 312-326. <http://dx.doi.org/10.1039/C5EN00051C>
  - Maddah, S.M., Mostafavi, G., Amin Malek, M., Anbarestani, M., Sharif, Y. and Mirhassani, Z., 2022. Combined application of cisplatin and salicylic acid suppresses cell growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell lines. *Biologia*, 77: 215-223. <http://dx.doi.org/10.1007/s11756-021-00920-9>
  - Malik, S., Muhammad, K. and Waheed, Y., 2023. Nanotechnology: A revolution in modern industry. *Molecules*, 28(2): 661. <https://doi.org/10.3390/molecules28020661>
  - Mani, M., Sundararaj, A.S., Al-Ghanim, K., John, S., Elumalai, K., Nicoletti, M. and Govindarajan, M., 2023. Rapid synthesis of copper nanoparticles using *Nepeta cataria* leaves: An eco-friendly management of disease-causing vectors and bacterial pathogens. *Green Processing and Synthesis*, 12(1): 20230022. <https://doi.org/10.1515/gps-2023-0022>
  - Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Gonçalves, M., Cavaleiro, C. and Salgueiro, L., 2010. Chemical composition and biological assays of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (Lamiaceae). *Natural Product Research*, 24(18): 1734-1742. <https://doi.org/10.1080/14786410903108944>
  - Masoumi, N. and Keshavarzi, F., 2024. The pattern of antibiotic resistance and distribution of the biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa* (PelD, PslB) isolated from infectious hospital departments. *SAGE Open Medicine*, 12: 20503121241298826. <https://doi.org/10.1177/20503121241298826>
  - Matejczyk, M., Świsłocka, R., Golonko, A., Lewandowski, W. and Hawrylik, E., 2018. Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salts as potential anticancer compounds. *Advances in Medical Sciences*, 63(1):14-21. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.07.003>
  - Miller, W.L., Matewish, M.J., McNally, D.J., Ishiyama, N., Anderson, E.M., Brewer, D., Brisson, J.R., Berghuis, A.M. and Lam, J.S., 2008. Flagellin glycosylation in *Pseudomonas aeruginosa* PAK requires the O-antigen biosynthesis enzyme WbpO. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6): 3507-3518. <https://doi.org/10.1074/jbc.m708894200>
  - Mohammadpour, N., Emami, S.A., and Asili, J., 2013. Identification of volatile oil components of *Nepeta binaludensis* Jamzad. by GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR methods and evaluation of its antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 16(1): 102-107. <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2013.764206>
  - Moraghebi, F., Aghazadeh Yamchelo, Sh. and Maddah, S.M., 2023. Study on antioxidant and cytotoxic properties of *Ephedra major* Host. hydroalcoholic extract on AGS gastric carcinoma cell line. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 39(2): 224-236. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2023.357854.3143>
  - Musimun, Ch., Papiernik, D., Permpoonpattana, P., Chumkaew, P. and Srisawat, T., 2022. Synergy of green-synthesized silver nanoparticles and *Vatica diospyroides* fruit extract in inhibiting Gram-positive bacteria by inducing membrane and intracellular disruption. *Journal of Experimental Nanoscience*, 17(1): 420-438. <https://doi.org/10.1080/17458080.2022.2084533>
  - Nejad-Alimoradi, F., Khodashenas, M. and Rezanejad F., 2024. Study of morphological traits, phenolic compounds and essential oil in vegetative and generative organs of *Nepeta bornmulleri* Hausskn. ex Borum. (Lamiaceae) in

- Kerman province. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 40(3): 417-434. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2024.131916>
- Palanisamy, N.K., Ferina, N., Amirulhusni, A.N., Mohd-Zain, Z., Hussaini, J., Ping, L.J. and Durairaj, R., 2014. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Nanobiotechnology, 12(1): 2. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-12-2>
  - Rafati, A., Valizadeh, N., Sefidkon, F., Imani, Y. and Noormand Moaied, F., 2023. Essential oil content and composition of *Nepeta crassifolia* Boiss. & Buhse. under natural habitats and cultivated conditions in East Azarbaijan province. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 39(2): 175-187. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2021.354805.3002>
  - Rajabi, H., Salimizand, H., Khodabandehloo, M., Fayyazi, A. and Ramazanzadeh, R., 2022. Prevalence of *algD*, *pslD*, *pelF*, *Ppgl*, and *PAPI-1* genes involved in biofilm formation in clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. BioMed Research International, 2022(1): 1716087. <https://doi.org/10.1155/2022/1716087>
  - Reynolds, D. and Kollef, M., 2021. The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: an update. Drugs, 81(18): 2117-2131. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
  - Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Carballo, J. and Capita, R., 2021. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for twelve antimicrobials (biocides and antibiotics) in eight strains of *Listeria monocytogenes*. Biology, 11(1): 46. <https://doi.org/10.3390/biology11010046>
  - Rossi, E., La Rosa, R., Bartell, J.A., Marvig, R.L., Haagensen, J.A., Sommer, L.M., Molin, S. and Johansen, H.K., 2021. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. Nature Reviews Microbiology, 19(5): 331-342. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00477-5>
  - Rustaiyan, A. and Nadji, K., 1999. Composition of the essential oils of *Nepeta isphahanica* Boiss. and *Nepeta binaludensis* Jamzad. from Iran. Flavour and Fragrance Journal, 14(1): 35-37. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199901/02\)14:1%3C35::AID-FFJ776%3E3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199901/02)14:1%3C35::AID-FFJ776%3E3.0.CO;2-N)
  - Skaltsa, H.D., Lazari, D.M., Loukis, A.E. and Constantinidis, T., 2000. Essential oil analysis of *Nepeta argolica* Bory & Chaub. subsp. *argolica* (Lamiaceae) growing wild in Greece. Flavour and Fragrance Journal, 15(2): 96-99. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(200003/04\)15:23.3.CO;2-6](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(200003/04)15:23.3.CO;2-6)
  - Thi, M.T.T., Wibowo, D. and Rehm, B.H., 2020. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. International Journal of Molecular Sciences, 21(22): 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
  - Tofangchi Mahyari, A., Mostafavi, G. and Maddah, S.M., 2025. Comparative evaluation of the anticancer effects of *Nepeta binaludensis* and *Nepeta glomerulosa* extracts on AGS gastric cancer cell line, with a focus on changes in *BAX* gene expression. Nova Biologica Reperta, 12(1): 1-18. <https://ndea10.khu.ac.ir/nbr/article-1-3684-fa.pdf>
  - Yeo, Y., Ito, T., Bellas, E., Highley, C.B., Marini, R. and Kohane, D.S., 2007. In situ cross-linkable hyaluronan hydrogels containing polymeric nanoparticles for preventing postsurgical adhesions. Annals of Surgery, 245(5): 819-824. <http://dx.doi.org/10.1097/01.sla.0000251519.49405.55>
  - Yuan, Y.G., Peng, Q.L. and Gurunathan, S., 2017. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: an alternative approach for antimicrobial therapy. International Journal of Molecular Sciences, 18(3): 569. <https://doi.org/10.3390/ijms18030569>