

بهینه سازی سنتز نانوکامپوزیت سدیم آلژینات / اکسید گرافن / اکسیدمنیزیم با بالاترین فعالیت ضد باکتریایی با روش تاگوچی

نگین بشردوست^۱، محمد سلمانی مبارکه^۲، محسن صفائی^{۳،*}

^۱ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

^۲ مرکز تحقیقات علوم نوین دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

^۳ بخش بیومواد دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران (نویسنده مسئول)

چکیده

آلژینات پر کاربردترین ماده قالبگیری در دندانپزشکی است که آلودگی آن همواره باعث ایجاد چرخه انتقال عفونت می شود. به همین علت ضدعفونی کردن مواد قالبگیری و قالب های تهیه شده قبل از استفاده توصیه می شود. امروزه با گسترش روز افزون علم و دانش بشری، استفاده از نانوفناوری جهت ساخت ترکیبات ضد میکروبی با کیفیت جهت پیشگیری و درمان در دندانپزشکی حائز اهمیت می باشد. بدین منظور مطالعه حاضر با هدف بهینه سازی تولید نانوکامپوزیت سدیم آلژینات / اکسید گرافن / اکسیدمنیزیم و ارزیابی میزان فعالیت ضدباکتریایی آن بر علیه پاتوژن دهانی / استرپتوکوکوس موتانس انجام شد. با استفاده از روش تاگوچی ۹ آزمایش با شرایط مختلف جهت سنتز نانوکامپوزیت ها با استفاده از روش سنتز درجا طراحی شد. میزان فعالیت ضدباکتریایی نانوکامپوزیت های سنتز شده با استفاده از روش میزان واحد تشکیل کلنی (CFU) محاسبه گردید. نتایج نشان داد که در نانوکامپوزیت سدیم آلژینات / اکسید گرافن / اکسیدمنیزیم سنتز شده در شرایط آزمایش ۳، میزان مهار رشد باکتری به بیشترین مقدار به میزان ۰/۸۱ CFU/ml رسید. با توجه به فعالیت مطلوب نانوکامپوزیت سدیم آلژینات / اکسید گرافن / اکسیدمنیزیم به عنوان یک عامل ضد میکروبی، می توان از آن جهت تهیه ماده قالبگیری دندانپزشکی و کنترل عفونت دهان و دندان استفاده نمود.

واژه های کلیدی: آلژینات، نانوذرات اکسیدمنیزیم، اکسید گرافن، بیونانوکامپوزیت، فعالیت ضد میکروبی، روش تاگوچی

مقدمه

عوامل عفونت‌زای خطرناک همواره دندانپزشکان و تکنسین های دندانپزشکی را تهدید می‌کند و ضروریست که آنها از راه‌های محافظت از خود و پرسنل وابسته آگاهی داشته باشند. کنترل عفونت از مهمترین وظایف کادر دندانپزشکی بوده که اخیراً برای پیشگیری از انتقال عفونت‌های خطرناکی مانند ایدز، هپاتیت و دیگر عوامل میکروبی اهمیت بیشتری پیدا کرده است [۱، ۲]. در دندانپزشکی از جمله در درمان‌های پروتزی از مواد مختلفی استفاده می‌شود که مواد قالبگیری دندان یکی از آنهاست. قالب‌هایی که در طی درمان‌های پروتزی با استفاده از مواد قالبگیری از دهان بیماران تهیه می‌شوند معمولاً به بزاق و خون آغشته شده و به همین دلیل آلوده می‌باشند. میکروارگانیسم‌ها می‌توانند ساعت‌ها بر روی مواد قالب باقی مانده و به مدل گچی نیز منتقل شوند [۳، ۴]. لذا ضدعفونی کردن مواد قالبگیری و قالب‌های تهیه شده ضروری می‌باشد.

انبوهی از میکروارگانیسم‌ها در حفره دهان قرار دارند که با ایجاد بیوفیلم سبب ایجاد آلودگی و انواع بیماری‌های دندانی می‌شوند [۵]. از اصلی‌ترین میکروارگانیسم‌های ایجاد عفونت در دهان، باکتری‌ها هستند. باکتری‌ها با اتصال به هم و تشکیل بیوفیلم مانعی در برابر عوامل ضد میکروبی ایجاد می‌کنند. کاربرد عوامل ضد میکروبی مانند آنتی بیوتیک‌ها به دلیل مقرون به صرفه بودن و نتایج قدرتمند، روش درمانی ترجیحی برای عفونت‌های باکتریایی بوده است. با این حال، استفاده گسترده از آنها منجر به ظهور سویه‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو شده است [۶].

فناوری نانو یکی از سریع‌ترین بخشهای در حال رشد از تکنولوژی است، که در زمینه‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است. یکی از این زمینه‌های امکان استفاده از نانو ساختارها به عنوان یک ترکیب ضد عفونی کننده برای کنترل میکروارگانیسم‌ها است [۷-۹]. نانومواد به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی تقویت شده و منحصر به فرد مانند اندازه‌های بسیار کوچک، بهبود نسبت سطح به حجم و افزایش واکنش پذیری شیمیایی در درمان‌های ضد باکتریایی امیدوار کننده ظاهر شده‌اند [۱۰].

نانوذرات اکسید فلزی دارای ویژگی‌های متفاوتی از جمله پایداری بالا حتی در شرایط سخت، اندازه و شکل قابل تنظیم و خواص سطح ویژه هستند که منجر به پتانسیل بالای بکارگیری آنها به عنوان عوامل ضد میکروبی موثر می‌شود. اکسید منیزیم یکی از نانوذرات اکسید فلزی رایج است که به دلیل فعالیت ضد باکتریایی قوی، ثبات حرارتی بالا و هزینه تولید پایین بسیار مورد توجه است [۱۱، ۱۲]. نانوکامپوزیت‌های مبتنی بر اکسیدگرافن نیز پیشرفت‌های امیدوار کننده‌ای را در زمینه‌های زیست شناسی و پزشکی از جمله هدف‌گیری سلول‌های سرطانی، تصویربرداری، تحویل دارو و فعالیت ضد میکروبی از خود نشان داده‌اند [۱۳].

بیوپلیمر آلژینات یک پلی ساکارید است که متشکل از تکرار نامنظم دو واحد مونوساکاریدی اسید مانورونیک (M) و اسید گولورونیک (G) است. خصوصیات بیوپلیمر آلژینات، از جمله سرعت واکنش با یون های فلزی، سازگاری زیستی و تجزیه بیولوژیکی، با نسبت مونومرهای M به G و ساختار ماکرومولکولی آنها تعیین می شود [۱۴].

با در نظر گرفتن کاربردهای متنوع بیوپلیمر آلژینات، افزودن خواص ضد میکروبی به آن می تواند بسیار حائز اهمیت باشد. از این رو، به دلیل ویژگی های ساختاری بیوپلیمر آلژینات می توان از آن به عنوان یک ترکیب مطلوب برای سنتز نانوکامپوزیت ها با خواص ضد میکروبی استفاده کرد [۱۵، ۱۶]. روش تاگوچی یک روش رایج جهت بهینه سازی سنتز می باشد که در زمینه های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. این روش با کاهش تعداد آزمایشات موجب صرفه جویی در زمان و هزینه می شود [۱۷]. با توجه به آنکه سنتز نانوکامپوزیت سدیم آلژینات/اکسید گرافن/اکسید منیزیم تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است، در این مطالعه شرایط بهینه برای سنتز این نانوکامپوزیت با بالاترین فعالیت ضدباکتریایی با استفاده از روش تاگوچی مورد بررسی قرار گرفت.

روش تحقیق

سنتز بیوپلیمر آلژینات

سنتز زیستی پلیمر آلژینات مشابه با روش به کار گرفته شده توسط صفائی و مقدم در سال ۲۰۲۲ انجام شد. پلیمر پلی-ساکاریدی آلژینات به روش سنتز باکتریایی، با استفاده از باکتری *زوتوباکتریولاندی* تهیه شد. بدین منظور این نوع باکتری با مشخصه IBRC10786 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران فراهم شد. پس از کشت باکتری و جداسازی پلیمر از سلولهای باکتری، آن را به مدت ۷۲ ساعت تحت دمای 40°C در آون خشک نمودیم تا پودر بیوپلیمر پلی ساکاریدی آلژینات تهیه شود [۱۸].

سنتز نانوذرات اکسید منیزیم

از نیتрат منیزیم شش آبه $(\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ با خلوص بالای ۹۹٪ و سدیم هیدروکسید (NaOH) با خلوص بالای ۹۹٪ ساخت شرکت مرک و آب مقطر برای تهیه نانوذرات اکسید منیزیم، استفاده شد. در سنتز نانوذرات، محلول ۲ مولار سدیم هیدروکسید به صورت قطره ای به محلول ۰/۱۸ مولار منیزیم نیترات در دمای اتاق اضافه شد. رسوب تشکیل شده در محلول نهایی پس از یک ساعت همزدن، توسط کاغذ صافی جداسازی شد و به مدت ۲۴ ساعت تحت دمای 120°C در آون قرار

گرفت. سپس رسوب خشک شده توسط هاون آسیاب شد و برای انجام تکلیس به مدت ۲ ساعت در کوره تحت دمای 450°C قرار گرفت تا پودر نانوذرات اکسید منیزیم تهیه شود [۱۹].

سنتز نانوکامپوزیت سدیم آلژینات/اکسید گرافن/اکسید منیزیم

به منظور بررسی و تعیین شرایط بهینه سنتز نانوکامپوزیت ها با بیشترین فعالیت ضدباکتریایی، با استفاده از نرم افزار Qulitek-4 طبق روش تاگوچی، ۹ آزمایش حاوی نسبت های متفاوت از بیوپلیمر آلژینات، اکسید گرافن و نانوذرات اکسید منیزیم طراحی شد. بدین منظور سطوح ۶۰، ۷۰ و ۸۰ میلی گرم/میلی لیتر از محلول بیوپلیمری آلژینات، سطوح ۱/۵ و ۱/۵ میلی گرم/میلی لیتر اکسید گرافن و سطوح ۲، ۴ و ۸ میلی گرم/میلی لیتر محلول نانوذرات اکسید منیزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. برای سنتز نانوکامپوزیت مورد مطالعه، اکسید گرافن به صورت تجاری با خلوص بالای ۹۹٪ ساخت شرکت مرک تهیه گردید. نه نمونه از نانوکامپوزیت سدیم آلژینات/اکسید گرافن/اکسید منیزیم تحت شرایط مختلف با استفاده از روش اختلاط مستقیم سنتز شد. در سنتز نانوکامپوزیت، ابتدا محلول های اجزای سازنده به صورت جداگانه توسط همزن مغناطیسی به مدت یک ساعت هم زده شدند. سپس این سه محلول به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق توسط دستگاه همگن ساز التراسونیک، دیسپرس شدند. در نهایت محلول نانوذرات اکسید منیزیم و اکسید گرافن به طور همزمان و به صورت قطره قطره به محلول پلیمری آلژینات اضافه شدند. محلول نهایی به مدت یک ساعت هم زده شد و پس از این مدت، محلول به مدت ۱۵ دقیقه دیسپرس شد. در نهایت برای سنتز نانوکامپوزیت نهایی، محلول تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت درون آون با دمای 60°C قرار گرفت تا رسوبات نانوکامپوزیت تشکیل شود [۲۰].

فعالیت ضد باکتریایی

برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی نانوکامپوزیت سدیم آلژینات/اکسید گرافن/اکسید منیزیم سنتز شده، بر علیه بیوفیلم باکتری *استرپتوکوکوس موتانس*، این باکتری (ATCC 35668) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران تهیه شد. جهت تهیه تک کلونی، باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* به مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط عصاره مغز و قلب آگار کشت داده شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه گردید. برای تشکیل بیوفیلم باکتری، سوسپانسیون باکتریایی به یک پلیت کشت ۹۶ خانه افزوده شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردید. پس از تشکیل بیوفیلم سه بار با PBS

شسته شد تا پلانکتونیک/ستریتوکوکوس موتانس ها حذف شوند. سپس نانوکامپوزیت سنتز شده آزمایشات طراحی شده توسط روش تاگوچی به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. به منظور اندازه گیری تعداد سلول های زنده در بیوفیلیم ها، سلول های جدا شده از دیواره چاهک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، در دمای 37°C جمع آوری شدند. سلول های باقیمانده که به دیوار چاهک چسبیده بودند پس از سه بار شستشو در ۱ میلی لیتر بافر PBS بصورت سوسپانسیون در آمدند. سپس با استفاده از ورتکس به مدت ۲ دقیقه سوسپانسیون بدست آمده همگن شد. برای انجام تست واحد تشکیل کلنی (CFU) سوسپانسیون باکتری ها با سریال دایلوژن ۱۰ مرتبه رقیق شدند، سپس از هر رقت بر روی پلیت های حاوی عصاره مغز و قلب آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردید. پس از گرماگذاری، تعداد کلنی ها شمرده شدند و میانگین آن ها برای ۹ آزمایش بدست آمد. تمامی آزمایشات دارای سه بار تکرار بودند [۲۱، ۲۲].

نتایج و بحث

امروزه چسبندگی و تکثیر باکتری ها یک نگرانی جدی و فزاینده است و در بسیاری از صنایع، از جمله نساجی، تصفیه آب، حمل و نقل، داروسازی و بسته بندی مواد غذایی، آسیب قابل توجهی ایجاد می کند. علیرغم تلاش های گسترده محققان دانشگاهی و صنعتی، هنوز یک راه حل کلی برای محدود کردن کلنی زایی باکتری ها یافت نشده است. بنابراین، راهکارهای جدید برای کنترل فعالیت باکتری ها به سرعت مورد نیاز است که بکارگیری نانومواد یک رویکرد بسیار امیدوار کننده می باشد. ترکیبی از نانوذرات با سایر نانومواد دارای فعالیت ضد باکتریایی مانند گرافن اکسید (GO) منجر به افزایش خواص ضدباکتریایی به دلیل اثرات هم افزایی می شود. ساختار دوبعدی لایه ای اکسید گرافن می تواند غشای سلول باکتریایی را بپوشاند و باعث ایجاد تنش اکسایشی در سطح آن شود، بنابراین به غشای سلولی آسیب می رساند و می تواند موجب مرگ آن شود [۲۳، ۲۴].

برای تعیین شرایط بهینه جهت سنتز نانوکامپوزیت سدیم آلزینات/اکسید گرافن/اکسیدمنیزیم با بیشترین فعالیت ضدباکتریایی بر اساس روش تاگوچی ۹ آزمایش طراحی شد و اثرات نانوکامپوزیت سنتز شده در شرایط مختلف بر میزان زنده مانی باکتری /ستریتوکوکوس موتانس مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). نتایج مشخص کرد که نانوکامپوزیت سنتز شده در شرایطی با مقادیر ۶۰ میلی گرم/میلی لیتر آلزینات، ۱/۵ میلی گرم/میلی لیتر اکسیدگرافن و ۸ میلی گرم/میلی لیتر اکسید منیزیم که مربوط به آزمایش شماره ۳ بود، دارای قویترین فعالیت ضدباکتریایی بر علیه بیوفیلیم باکتری /ستریتوکوکوس موتانس است و در حضور آن میزان زنده مانی باکتری به کمترین مقدار یعنی مقدار 0.81 CFU/ml رسید.

جدول ۱. طراحی آزمایشات به روش تاگوچی و اثر ضد باکتریایی نانوکامپوزیت تولید شده بر بیوفیلم/ستریتوکوک موتانس

شماره آزمایش	آلژینات (میلی گرم/میلی لیتر)			اکسید گرافن (میلی گرم/میلی لیتر)			اکسید منیزیم (میلی گرم/میلی لیتر)			زنده مانی باکتری (Log ₁₀ CFU/ml)
	۸۰	۷۰	۶۰	۰/۵	۱	۱/۵	۲	۴	۸	
۱		۶۰			۰/۵			۲		۱/۵۱
۲		۶۰			۱			۴		۰/۹۸
۳		۶۰			۱/۵			۸		۰/۸۱
۴		۷۰			۰/۵			۴		۱/۵۸
۵		۷۰			۱			۸		۱/۰۶
۶		۷۰			۱/۵			۲		۱/۳۷
۷		۸۰			۰/۵			۸		۱/۲۴
۸		۸۰			۱			۲		۱/۷۹
۹		۸۰			۱/۵			۴		۰/۹۲

جدول ۲ تاثیر فاکتورهای آلژینات، اکسیدگرافن و اکسیدمنیزیم را بر میزان زنده مانی باکتری/ستریتوکوکوس موتانس ارائه می-دهد. نتایج مشخص کرد که فاکتور آلژینات در سطح اول و فاکتورهای اکسیدگرافن و اکسیدمنیزیم در سطح سوم بیشترین تاثیر را بر میزان زنده مانی باکتری/ستریتوکوکوس موتانس نشان دادند.

تاثیر متقابل فاکتورها بر میزان زنده مانی باکتری/ستریتوکوکوس موتانس در جدول ۳ نشان داده شده است. اکسیدگرافن و اکسیدمنیزیم در سطح سوم، بیشترین اثر متقابل را بر یکدیگر و بر میزان زنده مانی باکتری/ستریتوکوکوس موتانس به مقدار ۴۴/۸۹ درصد نشان دادند. آلژینات در سطح اول و اکسیدمنیزیم در سطح سوم اثر متقابل مشخصی بر میزان زنده مانی باکتری/ستریتوکوکوس موتانس به مقدار ۳۷/۷۵ درصد نشان دادند. کمترین میزان شاخص شدت تاثیر متقابل مربوط به آلژینات در سطح اول و اکسید گرافن در سطح سوم به میزان ۰/۵۱ درصد بود.

جدول ۲. تأثیرات اصلی سطوح مختلف آلژینات، اکسید گرافن و اکسید منیزیم بر مهار رشد بیوفیلم/ستریتوکوک موتانس

فاکتور	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
آلژینات (میلی گرم/میلی لیتر)	۱/۱۰	۱/۳۴	۱/۳۲
اکسید گرافن (میلی گرم/میلی لیتر)	۱/۴۴	۱/۲۸	۱/۰۳
اکسید منیزیم (میلی گرم/میلی لیتر)	۱/۵۶	۱/۱۶	۱/۰۴

جدول ۳. اثرات متقابل عوامل مورد مطالعه در سنتز نانوکامپوزیت مورد بررسی در مهار رشد بیوفیلم/ستریتوکوک موتانس

جفت های عامل متقابل	ستون	شاخص شدت (درصد)	شرایط بهینه
اکسید گرافن × اکسید منیزیم	۲×۳	۴۴/۸۹	[۳،۳]
آلژینات × اکسید منیزیم	۱×۳	۳۷/۷۵	[۳،۱]
آلژینات × اکسید گرافن	۱×۲	۰/۵۱	[۳،۱]

آنالیز واریانس پارامترهای تأثیرگذار بر میزان زندهمانی باکتری/ستریتوکوکوس موتانس در جدول ۴ نشان داده شده است. بیشترین تأثیر بر کاهش میزان زندهمانی باکتری/ستریتوکوکوس موتانس به ترتیب مربوط به اکسیدمنیزیم با اثرگذاری به میزان ۳۹/۱۸ درصد، اکسیدگرافن به میزان ۱۸/۱۶ درصد و آلژینات به میزان ۱/۱۹ درصد بود. پس از تجزیه و تحلیل اطلاعات و بررسی اثر هر یک از فاکتورها و اثر متقابل آنها، شرایط بهینه برای سنتز نانوکامپوزیت سدیم آلژینات/ اکسید گرافن/اکسیدمنیزیم با بیشترین فعالیت ضدباکتریایی تخمین زده شد (جدول ۵). بر این اساس، اکسیدگرافن و اکسیدمنیزیم با سهم برابر، بیشترین سهم و آلژینات کمترین سهم را بر کاهش میزان زندهمانی باکتری/ستریتوکوکوس موتانس نشان دادند. سطح اول برای فاکتور آلژینات و سطح سوم برای فاکتورهای اکسید گرافن و اکسید منیزیم، مناسبترین سطح تشخیص داده شد. بر اساس نتایج بدست آمده، تخمین زده شد که نانوکامپوزیت سنتز شده در شرایط بهینه به میزان 0.67 CFU/ml از فعالیت باکتریایی جلوگیری کرده که این مقدار، نزدیک ترین مقدار به نتایج حاصل از آزمایش ۳ و بهتر از آن می باشد.

جدول ۴. تجزیه و تحلیل واریانس عوامل موثر در سنتز نانوکامپوزیت سنتز شده بر مہار رشد بیوفیلم/ستریتوکوک موتانس

فاکتورها	درجه آزادی	مجموع مربعات	واریانس	نسبت F	جمع خالص	درصد (%)
آلژینات	۲	۰/۱۰	۰/۰۵	۱/۱۲	۰/۰۱	۱/۱۹
اکسید گرافن	۲	۰/۲۶	۰/۱۳	۲/۷۵	۰/۱۶	۱۸/۱۶
اکسید منیزیم	۲	۰/۴۴	۰/۲۲	۴/۷۸	۰/۳۵	۳۹/۱۸

جدول ۵. شرایط مطلوب برای سنتز نانوکامپوزیت مورد مطالعه با بیشترین فعالیت ضد باکتریایی

فاکتورها	سطح	سهم
آلژینات	۱	-۰/۱۵
اکسید گرافن	۳	-۰/۲۲
اکسید منیزیم	۳	-۰/۲۲
سهم کل عوامل		-۰/۵۹
میانگین عملکرد کنونی		۱/۲۵
میزان زنده مانی باکتری در شرایط بهینه		۰/۶۷

نتیجه گیری

با تحلیل و بررسی نتیجه آزمایشات طراحی شده به روش تاگوچی فعالیت ضدباکتریایی نانوکامپوزیت سدیم آلژینات/اکسید گرافن/اکسیدمنیزیم، سنتز شده به روش اختلاط مستقیم بر ضد باکتری /ستریتوکوکوس موتانس مورد ارزیابی قرار گرفت و خواص مطلوب ضدباکتری نانوکامپوزیت نامبرده تایید شد. بنابر نتایج بدست آمده تخمین زده شد که نانوکامپوزیت سنتز شده در شرایط بهینه (۶۰ میلی گرم/میلی لیتر آلژینات، ۱/۵ میلی گرم/میلی لیتر اکسید گرافن و ۸ میلی گرم/میلی لیتر اکسیدمنیزیم) میزان زنده مانی باکتری را تا مقدار ۰/۶۷ CFU/ml کاهش دهد. با توجه به خواص ضدباکتریایی پیش بینی شده برای این

نانوکامپوزیت، می تواند اثر مثبتی در مقابله با بیوفیلم های دندان های ایجاد نماید. نانوکامپوزیت سنتز شده، امکان استفاده در ترکیبات مختلف حوزه دندان پزشکی و پزشکی را دارد که توصیه می شود در مطالعات آینده مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۹۹۰۴۳۵ مصوب کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می باشد. به این وسیله از مسئولین این کمیته و معاونت تحقیقات دانشگاه بابت تقبل هزینه های مالی این مطالعه، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Glass RT, Bullard JW, Hadley CS, Mix EW, Conrad RS. Partial spectrum of microorganisms found in dentures and possible disease implications. The Journal of the American Osteopathic Association. 2001, 101(2):92-94.
2. Shah AH, Wyne AH. Cross-infection control in dentistry: A review. Pakistan Oral and Dental Journal. 2010, 30(1):168-174.
3. Barlean L, Dănilă I, Săveanu I. Prevention of infection transmission in dental laboratories. Revista medico-chirurgicala a Societății de Medici și Naturaliști din Iași. 2011, 115(2):548-553.
4. Saccucci M, Ierardo G, Protano C, Vitali M, Polimeni A. How to manage the biological risk in a dental clinic: current and future perspectives. Minerva Stomatologica. 2017, 66(5):232-239.
5. Song W, Ge S. Application of antimicrobial nanoparticles in dentistry. Molecules. 2019, 24(6):1033.
6. Wang L, Hu C, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. International Journal of Nanomedicine. 2017, 12:1227.
7. Mirhosseini M, Yazdani N, Dehghan Hamdan A. Investigation of antimicrobial properties of chitosan–ZnO nanocomposite. Razi Journal of Medical Sciences. 2016, 23(147):104-114.
8. Hu ZT, Chen Y, Fei YF, Loo SL, Chen G, Hu M, Song Y, Zhao J, Zhang Y, Wang J. An overview of nanomaterial-based novel disinfection technologies for harmful microorganisms: Mechanism, synthesis, devices and application. Science of The Total Environment. 2022, 837:155720.
9. Franco D, Calabrese G, Guglielmino SP, Conoci S. Metal-based nanoparticles: Antibacterial mechanisms and biomedical application. Microorganisms. 2022, 10(9):1778.

10. Saafan A, Zaazou MH, Sallam MK, Mosallam O, El Danaf HA. Assessment of photodynamic therapy and nanoparticles effects on caries models. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2018, 6(7):1289-1295.
11. He Y, Ingudam S, Reed S, Gehring A, Strobaugh TP, Irwin P. Study on the mechanism of antibacterial action of magnesium oxide nanoparticles against foodborne pathogens. *Journal of Nanobiotechnology*. 2016, 14:54.
12. Imani MM, Safaei M. Optimized synthesis of magnesium oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Journal of Nanotechnology*. 2019, 6063832.
13. Alsharaeh E, Mussa Y, Ahmed F, Aldawsari Y, Al-Hindawi M, Sing GK. Novel route for the preparation of cobalt oxide nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposites and their antibacterial activities. *Ceramics International*. 2016, 42(2):3407-3410.
14. Safaei M, Taran M, Imani MM. Preparation, structural characterization, thermal properties and antifungal activity of alginate-CuO bionanocomposite. *Materials Science and Engineering: C*. 2019, 101:323-329.
15. Alboofetileh M, Rezaei M, Hosseini H, Abdollahi M. Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. *Food Control*. 2014, 36(1):1-7.
16. Porter GC, Schwass DR, Tompkins GR, Bobbala SK, Medlicott NJ, Meledandri CJ. AgNP/Alginate Nanocomposite hydrogel for antimicrobial and antibiofilm applications. *Carbohydrate Polymers*. 2021, 251:117017.
17. Xiao S, Sun W, Du J, Li G. Application of CFD, Taguchi method, and ANOVA technique to optimize combustion and emissions in a light duty diesel engine. *Mathematical Problems in Engineering*. 2014, 502902.
18. Safaei M, Moghadam A. Optimization of the synthesis of novel alginate-manganese oxide bionanocomposite by Taguchi design as antimicrobial dental impression material. *Materials Today Communications*. 2022, 31:103698.
19. Moghadam A, Mobarakeh MS, Safaei M, Kariminia S. Synthesis and characterization of novel bio-nanocomposite of polyvinyl alcohol-Arabic gum-magnesium oxide via direct blending method. *Carbohydrate Polymers*. 2021, 260:117802.
20. Safaei M, Taran M. Optimized synthesis, characterization, and antibacterial activity of an alginate-cupric oxide bionanocomposite. *Journal of Applied Polymer Science*. 2018, 135(2):45682.
21. Lee, S.-H., Antimicrobial effects of herbal extracts on *Streptococcus mutans* and normal oral streptococci. *Journal of Microbiology*. 2013, 51(4):484-489.
22. Zhang, G., et al., Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation and virulence by *Lactobacillus plantarum* K41 isolated from traditional Sichuan pickles. *Frontiers in Microbiology*. 2020, 11:774.

23. Ghulam AN, dos Santos OA, Hazeem L, Pizzorno Backx B, Bououdina M, Bellucci S. Graphene Oxide (GO) Materials—Applications and Toxicity on Living Organisms and Environment. *Journal of Functional Biomaterials*. 2022, 13(2):77.
24. Vi TT, Rajesh Kumar S, Rout B, Liu CH, Wong CB, Chang CW, Chen CH, Chen DW, Lue SJ. The preparation of graphene oxide-silver nanocomposites: the effect of silver loads on Gram-positive and Gram-negative antibacterial activities. *Nanomaterials*. 2018, 8(3):163.