نشریه علمی-تخصصی
پژوهش های نوین علوم مهندسی
ISSN: 2538-3809
سال نهم، شماره ۲ (پیاپی: ۴۸)، تابستان ۱۴۰۳

بررسی اثر هم افزایی ضد میکروبی گیاه بادرنجبویه و نانوذرات اکسید روی بر باکتری اسینتو باکتر بومانی

فاطمه قیداری [۱]، فاطمه رزمی آذر[۱]، محمد طه قیداری [۲]، رقیه حیدری[۳]، مرضیه آزادفلاح *[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۶
کد مقاله: ۶۱۴۳۷

چکـــیده

امروزه گیاهان دارویی کاندیدهای خوبی جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها هستند. سرطان کبد به‌عنوان یکی از فراوان‌ترین سرطان‌ها در دنیا شناخته شده است. همچنین گیاه شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان به علت داشتن خواص ضد میکروبی در علم پزشکی مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی و ضد سرطانی عصاره ریشه گیاه شیرین بیان، نانوذرات کیتوسان و اثر هم‌افزایی آن‌ها در غلظت‌های مختلف مورد سنجش قرار گرفت. در سنجش ضدمیکروبی، باکتری سودوموناس آئروژینوزا در برابر تیمار با عصاره، نانوذرات و استفاده هم‌زمان این دو کاهش رشد را نشان دادند. بیشترین اثر مهاری در استفاده هم‌زمان نانوذرات کیتوسان به همراه عصاره شیرین بیان مشاهده شد. مقدار MIC در رقت 32 µg/mL و مقدار MBC بین 128 µg/mL تعیین گردید. همچنین عصاره هیدروالکلی شیرین بیان و نانوذرات کیتوسان در غلظت‌های مختلف بر رشد سلول‌های سرطانی کبد رده HepG2 و سلول‌های فیبروبلاست رده L929 به‌عنوان سلول‌های نرمال در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با آنالیز MTT مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تأثیر تیمارها وابسته به دوز و زمان متغیر است و با افزایش زمان از میزان زیستایی سلول‌ها در هر دو تیمار نانوذرات و عصاره گیاه کاسته شده است. بیشترین تأثیر مهاری در استفاده هم‌زمان عصاره (mg/ml 5/1) و نانوذرات کیتوسان (mg/ml 2/0) پس از ۷۲ ساعت بدست آمد که درصد زیستایی سلول‌ها به ۸ درصد کاهش یافته بود. همچنین IC50 برای سلول‌های سرطانی در زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد. با توجه به نتایج می‌توان ادعا کرد عصاره ریشه گیاه شیرین بیان و نیز نانوذرات کیتوسان در غلظت‌های مختلف دارای اثر مهاری بر رشد باکتری‌ها و نیز سلول‌های سرطانی کبد است، لذا مطالعات بیشتر می‌تواند آینده‌ای نوید بخشی را به همراه داشته باشد.

واژگـان کلـیدی: گیاه شیرین بیان، نانوذرات کیتوسان، سرطان کبد، عصاره متانولی

۱- پژوهشگر دبیرستان استعداد درخشان فرزانگان ۱ استان البرز و محقق تیم پژوهشی لنترن، شرکت البرز نانو تجهیزرایان، البرز، ایران
۲- دانشجوی دانشگاه سوسیئت جنوب شرق چین، چین
۳- دکتری تخصصی زیست شناسی سلولی-تکوینی گیاهی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۴- دکتری مهندسی مواد و کارشناس دفتر تحقیقات و توسعه فناوری شرکت توانیر، تهران، ایران
Marziyeh.azadfalah@gmail.com

۱- مقدمه

استنوباکتر بومانی از جمله باکتریهای گرم منفی کوکسی یا کوکوباسیل هستند که در محیط‌های آبی، سطوح خشک و حتی در شرایط نامساعد رشد می‌کنند (بایوگ، ۲۰۰۲). مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها مهمترین معضل در عفونت‌های ناشی از استنوباکتر بومانی است. به‌طوری‌که، این باکتری در برابر عوامل ضدمیکروبی مقاوم بوده و این مقاومت می‌تواند ذاتی یا اکتسابی باشد. از مهمترین بیماری‌های ناشی از استنوباکتر بومانی می‌توان به مواردی همچون سپتی سمی، عفونت‌های پوستی و زخم، عفونت دستگاه ادراری و مننژیت اشاره کرد (گردان، ۲۰۱۰).

در دهه‌های اخیر، شیوع زیاد عفونت‌های بیمارستانی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در میکروارگانیسم‌های مولد آن منجر به بروز خطر جدی شده است. در سراسر جهان، ۶۰ درصد از عفونت‌های بیمارستانی توسط میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو ایجاد می‌شود (ادموند، ۱۹۹۹). ارگانیسم‌های مختلف با موفقیت استراتژی‌های متعددی را برای مقاومت در برابر عملکرد اکثر آنتی بیوتیک‌ها ایجاد کرده‌اند (کرودا، ۲۰۰۱). عوامل ضد میکروبی که در حال حاضر استفاده می‌شوند دارای عوارض جانبی سمی و پاسخ درمانی آهسته بوده و برای درمان بیماران مبتلا به بیماری‌های قارچی و عفونی شدید نامناسب هستند. این مقاومت در برابر عوامل ضد میکروبی منجر به عوارض مرگ و میر ناشی از شکست درمان و افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی شده است. اگرچه تعیین خطر دقیق سلامت عمومی و تخمین افزایش قیمت‌ها کار ساده‌ای نیست، اما این سوال جزئی وجود دارد که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حال ظهور یک مشکل جدی در سراسر جهان است. بنابراین، جستجو برای سایر روش‌های درمانی با عوارض کمتر و خاصیت آنتی‌باکتریالی بیشتر، مانند بکارگیری از عصاره‌های گیاهی و نانوذرات فلزی به روش هم‌افزایی، یک امر ضروری است (ریوس، ۲۰۰۵: ۱۰۰). سینرژیسم یا هم‌افزایی به عنوان پدیده‌ای تعریف شده است که در آن دو ترکیب مختلف با هم ترکیب می‌شوند تا فعالیت فردی خود را افزایش دهند (رانی، ۲۰۰۹).

Melissa officinalis L. متعلق به خانواده‌ی نعناعیان (Lamiaceae) یک گیاه چند ساله معطر و دارویی است که به طور گسترده در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. معمولا در مناطق مدیترانه‌ای و آسیای غربی رشد می‌کند و به طور فشرده در اروپا کشت می‌شود (گیئولای، ۲۰۲۰: ۶۴۸۹۱۵۹). این گیاه را بادرنجبویه، مومیایی عسل یا نعناع مومیایی نیز می‌نامند. به دلیل وجود ترکیبات خاص در اسانس این گیاه و اثرات دارویی متعدد آنها در صنایع آرایشی و بهداشتی، شیرینی سازی، محصولات غذایی و همچنین در طب سنتی ایران به عنوان تب بر، تسکین دهنده درد، ضد نفخ، کاهش اضطراب و افسردگی، بهبود اختلالات خواب به شدت مورد مطالعه قرار می‌گیرد (بکالی، ۲۰۰۸). ماده موثره بادرنجبویه (رزمارینیک اسید) به روش تقطیر با بخار آب از گل، برگ و شاخه های تازه و خشک تهیه می‌شود که بویی شبیه به لیموی تازه و رنگ زرد کمرنگ دارد(زرگری، ۱۹۹۵). در سال-های اخیر، بسیاری از داروهای موثر و کاربردی از جمله تاکسون، دیگوکسین، وین بلاستین و وین کریستین از گیاهان دارویی همچون بادرنجبویه استخراج شده‌اند. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که ترکیبات اصلی اسانس گیاه بادرنجبویه سیترونلال، ژرانیول، سیترال (لینالول، سیترونلال)، ویتامین C و B6، اسید آمینه، مواد معدنی، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و ... است (بگدات، ۲۰۰۶). نانوذرات اکسید روی با توجه به داشتن خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد یک ماده چند عملکردی بوده و در صنایع مختلفی مانند کشاورزی، الکترونیک، لیزر، آرایشی و بهداشتی، پزشکی و غذایی کاربرد فراوانی دارد (کلودزیجزاک، ۲۰۱۴). نانواکسید روی به خاطر سمیت کم، قابلیت تجزیه زیستی، خواص ضدمیکروبی و ضدباکتریایی در صنعت تولید داروها به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. خواص ضدمیکروبی این نانوذرات با استفاده از تولید رادیکال‌های اکسیژن فعال است که منجر به القای استرس اکسیداتیو و مرگ سلول‌های میکروبی می‌شود. همچنین، تجمع نانوذرات اکسید روی در غشای باکتری‌ها و درون سلول‌ها موجب تخریب آرایش غشای باکتری‌ها می‌شود (کتابچی، ۲۰۱۷). براساس مطالعات ساوایی نانوذرات اکسید روی با تولید پراکسید هیدروژن به عنوان نوعی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب ایجاد اثرات ضدمیکروبی و تخریب سلول‌های باکتری‌ها شد (ساوایی، ۲۰۰۴). ازآنجایی‌که، مطالعات متعددی در ارتباط با ترکیبات فیزیکی و شیمیایی گیاه بادرنجبویه به عنوان گیاه دارویی و خواص بیولوژیکی نانوذرات اکسید روی صورت گرفته است، با این وجود، اطلاعاتی چندانی در جهت اثرات هم‌افزایی آن‌ها بر روی استنوباکتر بومانی در دسترس نیست. به همین منظور هدف اصلی این پژوهش بررسی اثر هم‌افزایی ضد میکروبی گیاه بادرنجبویه و نانوذرات اکسید روی بر روی باکتری اسینتو باکتر بومانی بود که در همین راستا تست‌های میکروبی نیز بر باکتری استنوباکتر بومانی صورت گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- عصاره گیری از گیاه بادرنجبویه

گیاه بادرنجبویه از پژوهشکده گیاهان دارویی استان البرز تهیه و عصاره گیری با استفاده از روش روتاری انجام شد. به منظور عصاره گیری در ابتدا برگ و ساقه خشک شده گیاه به قطعات یک سانتی متری تقسیم شدند. طی انجام آزمایش دمای دستگاه در

حد ملایم ۳۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و ۳۰۰ میلی لیتر متانول ۷۰ درصد را به همراه کیسه پارچه ای حاوی گیاه خشک شده بادرنجبویه در بالن دستگاه سوکسله قرار گرفت. در ادامه طی ۲۴ ساعت به تدریج حلال بر اثر حرارت بخار شد و با تکرار این عمل به مرور کلیه مواد موثره گیاه جدا شده و وارد حلال شد، پس از این مرحله حلال حاوی عصاره صاف شده و به داخل بالن دستگاه روتاری منتقل گردید سپس دستگاه را در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد، ۴۵ دور در دقیقه و زمان ۱ ساعت قرار داده شد تا حلال آن جدا شود. سپس عصاره جمع آوری و در دستگاه آون فن دار هوشمند در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد خشک شد و عصاره پودری شکل براق به دست آمد که به یک ظرف تیره رنگ منتقل و توسط فویل کاملا پوشانده شد و در یخچال نگهداری گردید.

۲-۲- تهیه نانوذرات اکسید روی

در این طرح از روش رسوبی برای تهیه نانوذرات اکسید روی استفاده شد. برای تهیه پیش ماده ابتدا با استفاده از آب مقطر و پودر نیترات روی با خلوص بالا محلول ۰/۲ مولار تهیه شد، سپس محلول مورد نظر بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت تا به خوبی هموژن گردد. در ادامه با افزودن قطره قطره محلول سود (NaOH) ۰/۵ مولار (در حین همزدن) pH محلول با استفاده از دستگاه pH متر به عدد ۷ رسانده شد تا رسوب ایجاد شود. سپس روی رسوب بدست آمده سانتریفیوژ انجام شده و چندین بار با آب مقطر و استون شستشو داده شد تا مواد اضافی خارج شود و در خشک کن (آون) تحت دمای °C ۸۰-۷۰ به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. در انتهای کار یک ماده لایه ای به نام نیترات هیدروکسید روی به دست آمد. در این مرحله ۱ گرم از نیترات هیدروکسید روی تهیه شده به مدت ۲ ساعت در کوره تحت دمای ۷۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا به نانو ذرات اکسید روی تبدیل شود.

۲-۳- نمونه‌گیری و نگهداری نمونه‌ها

در این مطالعه از بیمارانی که به چند مرکز درمانی در تهران مراجعه نمودند و مشکوک به عفونت اسینتوباکتر بودند نمونه‌گیری انجام شد و بعد از رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت و تعیین حساسیت شده و در نهایت نمونه‌های مزبور در محیط BHI Bruth حاوی ۳۰ درصد گلیسرول کشت داده شد و در فریزر ۳۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

۲-۴- بررسی تست آنتی‌بیوگرام

پس از تهیه سوسپانسیون باکتری (اسینتوباکتر) معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند برابر با ۱۰۸× ۱/۵ باکتری، یک سوآپ استریل سر پنبه‌ای وارد سوسپانسیون گردید و چندین بار چرخانده شد تا خوب سوسپانسیون جذب پنبه شود. سپس به آرامی توسط کناره لوله رطوبت اضافی آن گرفته شد و به صورت یک پارچه بر روی پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار در جهت‌های مختلف کشت گردید تا کشت کاملا یکنواختی بدست آید و پس از گذشت ۱۰-۵ دقیقه و جذب شدن کامل رطوبت محیط، دیسک‌های آنتی-بیوتیک توسط پنس استریل به فاصله ۲۴ mm از یکدیگر (لبه دیسک ها مد نظر می‌باشد) و فاصله ۱۵ mm از لبه پلیت قرار داده شدند (دیسک‌ها پس از قرار گرفتن بر روی آگار نباید جا به جا شوند). سپس در دمای ۳۷°C انکوبه شده و پس از گذشت ۷۲-۴۸ ساعت، حساسیت نسبی باکتری به آنتی‌بیوتیک مربوطه بصورت هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مشاهده شد که با اندازه‌گیری قطر منطقه عدم رشد با خط کش و مقایسه با مقادیر استاندارد ذکر شده بر اساس استاندارد های CLSI به صورت مقاوم، حساس، یا نیمه حساس گزارش گردیدند.

۲-۵- بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی (۱ MIC) و حداقل غلظت کشندگی (۲ MBC) عصاره‌ها با استفاده از روش میکرودایلوشن۳ صورت گرفت. به منظور بررسی MIC از روش رقت سازی در میکروپلیت های ۹۶ خانه‌ای استریل براساس استاندارد CLSI استفاده شد. یک کلنی بر روی محیط کشت آگار کشت داده شد و در دمای۳۷ درجه سلسیوس به مدت۷۲ -۴۸ ساعت انکوبه شد سپس جهت تهیه سوسپانسیون از محیط کشت،۴ کلنی برداشته و به ۸cc سرم فیزیولوژی اضافه گردید و سپس ورتکس شد. بعد از کنترل کدورت سوسپانسیون،۱۰۰µL از سوسپانسیون رقیق شده باکتری به هر کدام از چاهک‌ها که حاوی ۱۰۰ µL از محیط کشت مولرهینتون براث کاتیون دار به همراه آنتی بیوتیک‌ها با غلظت مشخص و نیز به چاهک کنترل مثبت

1 Minimum inhibitory concentration

2 Minimum bactericidal concentration

3 Microdilution

اضافه گردید؛ سپس جهت تعیین رقت نانو کامپوزیت مقدار µL ۱۰۰ از محلول ۲X نانوذره به هر یک از چاهک های ردیف اول افزوده شد.در چاهک های ردیف اول مقدار ۱۰۰µL از نانوکامپوزیت تهیه شده تلقیح گردید وبا انتقال ۱۰۰µL از چاهک ۱ تا ۱۰ به یکدیگر و تعویض سرسمپلر در آخر از چاهک‌های ردیف ۱۰ مقدار ۱۰۰µL دور ریخته شد و به این صورت از هر نانوکامپوزیت ۱۰ رقت تهیه شد که هر رقت ۲ برابر بیشتر از غلظت بعد بود.سپس با انکوباسیون پلیت ها بعد از۷۲–۴۸ ساعت تعیین حداقل غلظت کشندگی MBC آن مشخص گردید. در ضمن برای اطمینان چاهک های کنترل منفی و مثبت نیز بر روی محیط MHA کشت داده شد. برای انجام MBC به میزان تقریبا ۱۰µL از چاهک های فاقد کدورت رشد باکتری و نیز سه چاهک بعدی برداشت کرده و به صورت چمنی بر سطح محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد .در ضمن برای اطمینان از چاهک های کنترل منفی و مثبت نیز بر روی محیط MHA کشت داده شد. پلیت ها بعد از گذشته ۷۲–۴۸ ساعت انکوباسیون در جای بی هوازی نتایج خوانده شد و پلیتی که فاقد رشد (فاقد کلنی) است و یا حداکثر چند کلنی بر روی آن رشد کرده به عنوان MBC در نظر گرفته می‌شود در واقع همان غلظتی از نانوذره ویا آنتی بیوتیک است که ۹۹/۹ درصد از ارگانیسم‌ها را کشته و تنها ۰/۱ درصد از آنها باقی می‌مانند، برای ما قابل قبول است (گلدار، ۲۰۱۵). به‌منظور تأیید نتایج حاصل، آزمایش‌ها سه بار تکرار گردید.

۲-۶- تعیین زمان مرگ باکتری۱

این روش برای بررسی میزان کشته شدن باکتری در مواجهه با یک ماده ضد میکروبی می‌باشد که در این روش خاصیت باکتری‌کشی این مواد به دو طریق وابسته به زمان و وابسته به غلظت مورد مطالعه قرار می‌گیرد. یکی از اهداف این روش ارزیابی خاصیت مواد ضد میکروبی جدید و ارزیابی ویژگی ضدمیکروبی نانوذرات اکسیدروی و عصاره بادرنجبویه بصورت هم‌افزایی است. عموما کاهش Log 10-3 تعداد باکتری در یک میلی‌لیتر محیط حاوی آنتی‌بیوتیک نسبت به محیط فاقد آنتی‌بیوتیک بیانگر توانایی باکتریوسیدال۲ مناسب برای آن آنتی‌بیوتیک است. در این تست دو کنترل استفاده می‌شود یکی کنترل مثبت (محیط فاقد ماده ضد میکروبی) که نشان دهنده رشد است و دیگری کنترل منفی (محیط فاقد باکتری)که بیانگر استریل بودن کار است. پلیت مربوط به کنترل منفی باید فاقد رشد باشد و در پلیت مربوط به کنترل مثبت باید رشد خوب و بدون آلودگی دیده شود. تعداد باکتری‌ها در لحظه صفر در کنترل مثبت باید مابین ۱۰۶ و ۱۰۵ عدد در میلی‌لیتر باشد. بسته به نوع عملکرد ماده ضد میکروبی و نحوه رشد باکتری مورد نظر زمان‌های نمونه برداری مشخص می‌شود.

۲-۷- شمارش باکتری‌ها با استفاده از رقت‌سازی

ابتدا MIC برای نانوذره در برابر تمام باکتری‌های مورد مطالعه بدست آمد و غلظت‌های ۱/۲MIC، MIC، ۲MICX و برای تست در نظر گرفته شد. برای هر باکتری ۵ لوله آزمایش، یکی از لوله‌ها برای کنترل منفی و یکی برای کنترل مثبت و۳ تای دیگر برای غلظت‌های مختلف نانوذره در نظر گرفته شد. در هر لوله با توجه به میزان MIC، ۱/۲X MIC، ۲X MIC، به تناسب مولرهینتون کاتیون‌دار مایع و محلول ذخیره نانوذره (۱mg/ml) ریخته شد مثلا برای تهیه غلظت ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۹۶ میکرولیتر از محلول ذخیره نانوذره به ۲/۹۹۴ میلی‌لیتر مولرهینتون کاتیون‌دار مایع اضافه گردید و ورتکس شد.

در این روش طریقه‌ی تهیه سوسپانسیون باکتری با شیوه ذکر شده در روش رقت‌سازی در محیط مایع کمی متفاوت است. در این روش باید از باکتری‌هایی که در ابتدای فاز لگاریتمی رشد قرار دارند و یا در وسط‌های این دوره هستند جهت تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلند استفاده شود لذا بعد از یک کشت شبانه بر روی مولر هینتون آگار با آنس حلقوی ۴–۵ کلنی از باکتری مورد نظر برداشته و به ۵ میلی‌لیتر مولرهینتون براث تلقیح گردید سپس به مدت چند ساعت (بسته به نوع باکتری) انکوبه شد که این ساعت بسته به نوع باکتری متفاوت است و با توجه به نمودار استاندارد رشد تهیه شده توسط مسئولین آزمایشگاه، تعیین گردید. بعد از انکوبه شدن سوسپانسیونی برابر با نیم مک‌فارلند از آن تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به تمام لوله‌ها بجز لوله‌ی کنترل منفی اضافه گردید که بدین نحو تعداد باکتری موجود در هر میلی‌لیتر محیط کشت در حدود ۱۰۵× ۵ شد. از نیم مک فارلند تهیه شده به میزان ۱۰ میکرولیتر بر روی پلیت کشت داده شد تا خالص بودن و عدم آلودگی بررسی شود. بلافاصله بعد از تلقیح در زمان صفر از لوله ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به لوله حاوی ۰/۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه گردید، سپس به طریق شکل ۲–۱ تا ۸–۱۰رقت‌سازی شد.

در هر زمان ۳ تا از رقت‌ها جهت نمونه‌برداری برای کشت بر روی پلیت مولرهینتون آگار کاتیون‌دار انتخاب گردیدند و از هر رقت دو بار ۱۰۰ میکرولیتر برداشت شد و بر روی ۲ پلیت کشت داده شد مثلا برای زمان صفر رقت‌های ۶–۱۰، ۵–۱۰ و ۴–۱۰

1 Time Killing

2 Bacteriocidal

کشت داده شدند و برای زمان‌های بالاتر رقت‌های قبلی کشت داده شدند (نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف خیلی سریع انجام شد تا احتمال تاثیر تغییرات دما بر روند رشد باکتری به حداقل ممکن برسد).

۸. پس از نمونه برداری در زمان صفر بلافاصله لوله ها در انکوباتور قرار داده شد و مرحله ۶ برای زمان‌های مختلف تکرار شد.

۹. پلیت‌ها ۴۸-۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و بعد از آن تعداد باکتری‌ها شمارش شد و با اعمال ضریب رقت تعدادشان در زمان‌های مختلف ثبت گردید. و تعداد باکتری‌های میانگین دو پلیت در نظر گرفته شد.

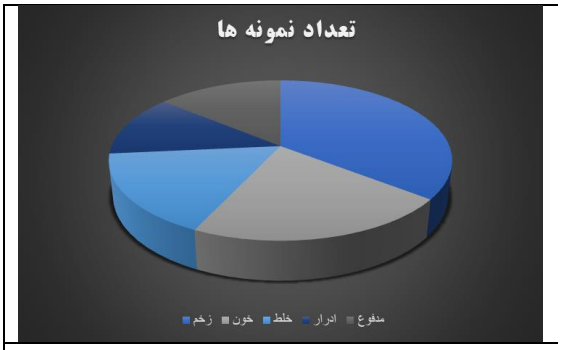
۱۰.تعداد باکتری‌ها بعد از اعمال ضریب رقت به log10 تبدیل شد و نمودار آن رسم گردید. محور x زمان‌های نمونه برداری و محور y تعداد باکتری‌های زنده(کلنی‌های شمرده شده) بر حسب log10 می‌باشد.

آنالیز آماری نتایج تجربی و تعیین IC50 با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌راهه (ANOVA۱) انجام شد و میزان $p \leq 0.05$ در هر تست به‌عنوان مرز معنی‌دار در نظر گرفته شد (شاه بنده، ۲۰۱۷: ۷۰۱) (شاملی، ۲۰۲۰).

۳- بحث و نتایج

۳-۱- جمع‌آوری نمونه

ایزوله های جمع‌آوری شده براساس نوع نمونه به چند دسته تقسیم می‌شوند که شامل نمونه‌های زخم ۷۱، خون ۴۳، خلط ۳۳، ادرار ۲۵ ، مدفوع ۲۸می‌باشد.



شکل ۱- نمونه‌های جمع‌آوری شده از گروه‌های مختلف.

۳-۲- نتایج تعیین تست حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک گذاری

بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده دیسک ها و CLSI سال ۲۰۱۹، انجام آنتی بیوگرام برای ۵۰ نمونه کشت مثبت انجام گردید و قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شد. طبق جدول زیر بیشتر نمونه های موجود به کوتریموکسازول و جنتامایسن و ایمیپنم مقاوم بودند و قطر هاله $P \leq ۳$ mm بود. همچنین به سفتریاکسون ونوروفلوکساسین حساس بودند و قطر هاله آنها $۸ \text{ mm} \leq P$ بود. قطر هاله و عدم رشد با استفاده از کولیس در شرایط استاندارد صورت پذیرفت.

۳-۲- نتایج تعیین تست آنتی‌بیوگرام

جدول ۱- نتایج تست آنتی‌بیوگرام

نوع آنتی‌بیوتیک	میزان حساسیت	میزان مقاومت
سفپیم	43.3%	56.7%
سفتریاکسون	26.8%	73.2%
سفتازیدیوم	35.2%	64.8%
کوتریموکسازول	16.3%	83.7%
ایمیپنم	12.3%	87.7%
جنتامایسین	25.6%	74.4%
آمپیسیلین	42.5%	57.5%
نوروفلوکساسین	38.9%	61.1%

۳-۳- نتایج تعیین MIC و MBC

1 ANOVA way One

تعیین MIC و MBC برای تمامی نمونه ها انجام گرفت که به طور میانگین مقدار MIC برای آنها برآورد شد و در جدول زیر نتایج گزارش شده است.

جدول ۲- نتایج تست MIC

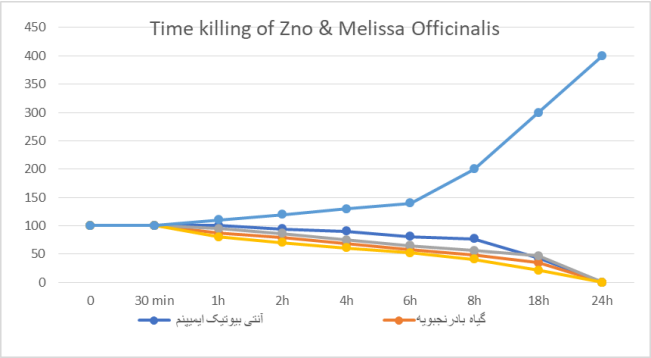
نام ماده	رقت موثر
گیاه بادرنجبویه	µg/ml۳۲
نانوذرات اکسید روی	µg/ml۶۴
گیاه بادرنجبویه + نانوذرات اکسید روی	µg/ml۱۶

جدول ۳- نتایج تست MBC

نام ماده	رقت موثر
گیاه بادرنجبویه	µg/ml۶۴
نانوذرات اکسید روی	µg/ml۱۲۸
گیاه بادرنجبویه + نانوذرات اکسید روی	µg/ml۳۲

۳-۴- نتایج تست سنجش زمان کشته شدن باکتری Time killing assey

بررسی سنجش زمان کشته شدن باکتری برای باکتری اسینتوباکتر بومانی انجام گرفت و در این تست از آنتی بیوتیک ایمیپنم به عنوان کنترل منفی استفاده شده است و کنترل مثبت نیز بررسی رشد باکتری به تنهایی در محیط کشت مورد بررسی انجام گرفت و در نهایت از گیاه بادرنجبویه و نانوذرات اکسید روی و همچنین اثر سینرژیسم گیاه بادرنجبویه و نانوذرات اکسید روی نیز مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۲- زمان کشته شدن اسینتوباکترها در زمانهای مختلف پس از در معرض قرارگرفتن با عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه و نانوذرات اکسید روی. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار(SEM±mean) بیان شده است.

در دهه‌های اخیر، مطالعات زیادی به منظور تولید مواد ضدباکتریایی و راهکارهای متعددی جهت مقابله با باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها صورت گرفته است. نانوذرات مختلف به واسطه‌ی دارا بودن نسبت سطح به حجم بالا و شکل گوناگون عملکردهای مختلفی را در مواجه با سلول زنده نشان می‌دهند (کنس، ۲۰۱۰). مکانیسم عملکردی ضدباکتریایی نانوذرات فلزی به دلیل توانایی جذب الکترواستاتیک میان یون‌های منفی در ساختار سلولی باکتری‌ها و یون‌های مثبت موجود در ساختار نانوذرات فلزی از جمله نانوذرات اکسید روی می‌باشد. چنین اتصالی با اکسیداسیون پروتئین‌های تیولی غشای باکتری‌ها موجب ایجاد شرایط جهت واکنش‌های استرس اکسیداتیو و تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد. به علاوه، گونه‌های فعال ایجاد شده با تخریب ساختار و عملکرد غشای سلولی باکتری‌ها نفوذپذیری و تنفس سلولی را مختل کرده و موجب مرگ سلولی می‌شود (مادی، ۲۰۱۲). افزایش میزان رادیکال‌های آزاد حاکی از تداخل نانوذرات در روند رفتارهای عملکردی باکتری‌ها است. این رادیکال‌های آزاد آسیب‌های متعددی از جمله پراکسیداسیون لیپیدها، اختلال در مسیر یون‌ها، تخریب ساختار DNA و پروتئین‌ها را موجب می‌شود (فرناندر، ۲۰۱۲).

نانوذرات اکسید روی به خاطر ویژگیهای نوری، شیمیایی، الکتریکی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. این نانوذره در غلظتهای خیلی کم هم خاصیت ضدباکتریایی داشته و مکانیسم عملکرد نانوذرات اکسید روی از طریق تخریب ساختار DNA، پروتئین و دیواره سلولی باکتری است (ژانگ، ۲۰۱۰). یافته‌های قبلی نشان از ویژگی‌های ضدمیکروبی نانوذرات اکسیدروی در مقابل باکتری‌های گرم منفی دارد. به‌طوری‌که، نانوذرات اکسیدروی با اختلال در سنتز پروتئین‌های فلاژلین چسبناک و شلاقی که توسط باکتری‌های گرم منفی برای مقابله با اثرات ضدمیکروبی نانوذرات ایجاد می‌شود موجب تخریب عملکرد باکتری‌ها

میگردد (پاناسک، ۲۰۱۷). از طرفی در مطالعه‌ای گونالان اثر ضدمیکروبی نانوذرات اکسید روی را بر ۴ سویه قارچ و ۴سویه باکتری مورد بررسی قرار داد نتایج حاصل از آن پژوهش نشان داد که تاثیرات ضدمیکروبی نانوذرات اکسید روی به اندازه‌ی نانوذرات، دوز مصرفی نانوذره و روش سنتز وابسته است (گونالان، ۲۰۱۲). همچنین، سینها گزارش کرد که اثر ضدمیکروبی نانوذرات اکسید روی بر روی باکتری‌های گرم منفی از جمله انتروباکتر و مارینوباکتر بسیار بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتلیس بود. دلیل مقاوم بودن باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی به علت وجود لایه‌های گسترده گلیکان و پپتید در دیواره سلولی باکتری‌ها است (سینها، ۲۰۱۱).

بسیاری از پژوهشگران فعالیت ضد باکتریایی برخی از اسانس‌های گیاهان را به ارتباط آن‌ها با ساختار شیمیایی اجزای موجود در اسانس‌ها مرتبط دانستند. به‌طوری‌که، مهمترین عملکرد ضدمیکروبی اسانس‌ها از طریق تغییر ساختار و عمل غشای سلولی رخ می‌دهد. اسانس‌های گیاهی با افزایش نفوذپذیری غشا منجر به تورم ساختار درونی غشای سلول‌ها شده و به دنبال آن کاهش فعالیت و مرگ سلولی صورت می‌گیرد (گولوس، ۲۰۰۷). عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه به علت دارا بودن توان آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچی بالا قادر است تا طیف وسیعی از پاتوژن‌های بیمارستانی از جمله باکتری‌های گرم منفی را از بین ببرد. خواص آنتی-اکسیدانی گیاه بادنجبویه به روغن فرار یا اسانس این گیاه نسبت داده می‌شود که از مهمترین این ترکیبات می‌توان به سیترول، لینالول، تیمول، کامفور، لیمونن و ... اشاره کرده که همگی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بالایی برخوردارند. همچنین محققان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچی گیاه بادرنجبویه را مربوط به ترکیبات شیمیایی نظیر هیدروکربن‌های منوترپن و سسکوئس ترپن‌ها که بصورت ترکیبات فنلی در طبیعت وجود دارند می‌دانند (احسانی، ۲۰۱۳)

به علاوه، محققان در سال ۲۰۱۲ مطالعه‌ای را بر روی خواص ضدمیکروبی گیاه بادرنجبویه و پونه انجام دادند نتایج حاصل از آن مطالعه بیان داشت که اسانس گیاه بادرنجبویه نسبت به گیاه پونه کمترین قطر هاله رشد باکتری و بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را از خود نشان داد. به طور کلی، گیاه بادرنجبویه را میتوان به عنوان یک ترکیب دارویی قوی جهت مقابله با باکتریهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها در نظر گرفت (بیشت، ۲۰۱۲).

در مطالعه‌ی حاضر تأثیر هم‌افزایی عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه و نانوذرات اکسید روی نشان داد که خاصیت ضد آنتی-اکسیدانی و ضد باکتریایی نانو ذرات اکسید روی تواما منجر به کاهش رشد باکتری‌های اسینتوباکتر بومانی شد.

نتایج حاصل از تست میکروبی MIC و MBC نشان داد که اسینتوباکتر بومانی کمترین مقاومت را نسبت به اعمال همزمان دو ترکیب نانوذرات اکسید روی و عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه را دارد. براساس یافته‌های پژوهش‌های مختلف مشخص شد که اثرات ضدباکتریایی نانوذرات اکسید روی در حضور ترکیبات فعال گیاهی بالا می‌رود که این افزایش مربوط به وجود ترکیبات فنلی در اسانس‌ها است. همچنین، عصاره گیاهی بادرنجبویه در ایجاد نانوذرات کوچک با توانایی نفوذ بیشتر تاثیرگذار است (پرابهو، ۲۰۱۰). فاکتور اصلی در نفوذپذیری نانوذرات به درون سلول‌های باکتری به شکل و اندازه‌ی آنها بستگی دارد که این عمل به واسطه‌ی پروتئین‌های و پورین‌های دیواره‌ی سلولی و یا پروتئین‌های دارای گروه تیول انجام می‌شود که هر دو عمل با برهم‌زدن ویژگی‌های الکتروشیمیایی غشای باکتری‌ها منجر به ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن و مرگ سلولی می‌گردد (فرناندز، ۲۰۱۲).

از طرفی، نتایج حاصل از قابلیت کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه، نانوذرات اکسید روی و ترکیب هم‌زمان عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه با نانوذرات اکسید روی نشان داد که کاربرد همزمان عصاره هیدروالکلی گیاه بادرنجبویه با نانوذرات اکسید روی کاهش جمعیت باکتری اسینتوباکتر رومانی نسبت به بکارگیری جداگانه هر نانوذرات اکسید روی و عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه روند سریع‌تری را نشان داد و تعداد استنوباکترها با افزایش زمان تماس باکتری با ترکیب هم‌زمان عصاره الکلی گیاه بادرنجبویه و نانوذرات اکسید روی برای غلظت MIC به صفر می‌رسد. در کاربرد همزمان دو ترکیب نانوذره روی به دلیل داشتن اندازه کوچک‌تر به راحتی از غشای باکتری‌ها عبور کرده و از طرفی حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در اسانس بادرنجبویه با تخریب ساختار غشای سلولی باکتری منجر به مرگ سلولی و در نهایت کاهش تعداد باکتری‌ها می‌گردد.

۴- نتیجه‌گیری

نتایج بررسی‌های انجام شده با درمان هم‌زمان و جداگانه نانوذرات کیتوسان و عصاره گیاهی شیرین بیان در مجاورت با سلول‌های سرطانی کبد HEPG2 با تست MTT نشان داد که اثر کشندگی نانوذرات کیتوسان در حضور عصاره‌ی گیاهی روی سلول‌های نرمال شیرین بیان به مقدار چشمگیری کاهش یافته و این نتیجه‌گیری مثبت و قابل قبول هست و همچنین مشخص شد که سلول‌های سرطانی کبد به خاطر اثر هم‌افزایی نانوذرات کیتوسان و عصاره گیاهی شیرین بیان تا حد زیادی از بین رفته و در بهبود بیماری بسیار مؤثر هست. اثر کشندگی وابسته به غلظت و زمان‌بر رده سلول‌های سرطانی هست و تغییـــرات مورفولـــوژی مشاهده شده بیانگر القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سـلول در سلول‌های سرطانی تیمار شده است و به نظر می‌رسد نانوذرات کیتوسان و عصاره الکی شیرین بیان هر دو خاصیت سمیت سلولی دارند لذا، کاربرد این نانوذرات می‌تواند در مطالعات مربوط به درمان

سرطان کبد مفید واقع شود. همچنین در این طرح نانوکیتوسان به‌عنوان تسهیلگر عصاره گیاهی عمل کرده و باعث افزایش اثر آن شده است. از مزایای این طرح به ارزان بودن و دوستدار محیط زیست بودن مواد استفاده شده می‌توان اشاره کرد.

منابع

1. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 16(6), pp. 2129-2144.
2. Bahtivarca Bagdat ,R, Cosge, B. (2006). The essential oil of lemon balm(Melissa officinalis L.), its components and using fields. Omu Zir. Fak. Dergisi, 21(1), pp. 116-121.
3. Zargari A. (1995). Medicinal Plants. 5th ed. Tehran: Tehran University Press. pp. 77-81. [Text in Persian]
4. Bakkali F. (2008). Biological effects of essential oils-a review. Food Chem Toxicol 46(2), pp. 446-75.
5. Ghiulai, R.; Avram, S.; Stoian, D.; Pavel, I.Z.; Coricovac, D.; Oprean, C.; Vlase, L.; Farcas, C.; Mioc, M.; Minda, D.; et al. Lemon Balm Extracts Prevent Breast Cancer Progression In Vitro and In Ovo on Chorioallantoic Membrane Assay. Evid.-Based Complement. Altern. Med. 2020, 2020, 6489159. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version]
6. Rios J, Recio M. Medicinal plants and antimicrobial activity. J Ethnopharmacol 2005;100:80 -4.
7. Kolodzieiczak A, Jesionowski T. Zinc oxide from synthesis to application. Materials 2014; 7(4): 2833-81.
8. Ketabchi M, Iessazadeh Kh, Massiha A. Evaluate the inhibitory activity of ZnO nanoparticles against standard strains and isolates of Staphylococcus aureus and Escherichia coli isolated from food samples. JFM 2017; 4(1): 63-74.
9. Sawai J, Yoshikawa T. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. J Appl Microbiol 2004; 96: 803-9.
10. Gordon NC., Wareham DW. Multidrugresistant Acinetobacter baumannii: mechanisms of virulence and resistance. International Journal of Antimicrobial Agents 2010; 35 (3): 219-26.
11. Bayug S, Zeana C, Sahni J, Della-Latta P, El-Sadr W, Larson E. (2002). Prevalence and antimicrobial patterns of Acinetobacter baumanii on hands and nares of hospital personnel and patients:the iceberg phenomena again. Heart Lung.; 31(5): 382-90.
12. Gunalan S, Sivaraj R, Rajendran V. Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens, Progress in Natural Science. Materials Int 2012; 22(6): 695–702.
13. Sinha R, Karan R, Sinha A, Khare SK. Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells. Bioresour Technol 2011; 2: 1516-20.
14. Maddy SA, Raheed OJ, Kalaichelvan PT. Antimicrobial activity of zero-valant iron nanoparticles. International Journal Mod Eng Res 2012; 2(1): 578-81.
15. Lapresta-Fernandez A, Fernandez A, Blasco J. Nanoecotoxicity effects of organisms. Trends Anal Chem 2012; 32: 40-59.
16. Panacek A, Kvitek L, Semekalova M, Vecerova R, Kolar M, Roderova M, et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. Nat Nanothechnol 2017; 13(1): 65-71.
17. Kenneth K, Wong Y, Liu X. Silver nanoparticles the real silver bullet in clinical medicine. Med Chem Commun 2010; 1: 125-31.
18. Bisht DS, Joshi SC, Padalia RC, Mathela CS. Isoiridomyrmecin rich essential oil from NepetaerectaBenth. And itsanti oxidant activity. Nat Prod Res 2012; 26 (1): 29-35.
19. Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Daskalakis N, Jeuken L, Povey M. Mechanistic Investigation Into Antibacterial Behaviour Of Suspensions Of Zno Nanoparticles Against E. Coli. Journal Of Nanoparticle Research 2010; 12(5): 1625-1636.
20. Prabhu YT, Rao KV, Kumara BS, Sai kumar VS, Pavani T. Synthesis of Fe 3 O 4 nanoparticles and its antibacterial application. Int Nano Lett 201; 5(2): 85 - 92.
21. Ehsani A, Mahmoudi R. Effects of Mentha longifolia L. essential oil and Lactobacillus casei on the organoleptic properties, and on the growth of Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes during manufacturing, ripening and storage of Iranian white brined cheese. International Journal of Dairy Technology 2013 Feb; 66 (1): 70-6.
22. Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Sokmen A, Pollisiou M, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia. Food Chem. 2007;103(4): 1449–1456.