مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1391، دوره چهارم، شماره چهاردهم،38-29

ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره های آبی و اتانولی گیاه پنیرک و نانو ذرات نقره بر روی *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی

مجید دوست محمدی[1]

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد زنجان، گروه میکروبیولوژی، زنجان، ایران.
Majiddousti25@yahoo.com

دریافت: 91/7/4 پذیرش: 91/9/26

چکیده

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* از عوامل مهم عفونت های کسب شده از مراکز بهداشتی می باشند. هدف از این پژوهش ارزیابی و مقایسه فعالیت ضد باکتریایی عصاره های پنیرک و نانو ذرات نقره علیه *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه عصاره های آبی و اتانولی برگ های پنیرک تهیه شد، سپس میزان MIC و MBC عصاره ها و نانو ذرات نقره بر روی *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* با روش های رقت در براث و انتشار چاهکی در آگار تعیین گردید. در مرحله بعد اثرات ضد میکروبی عصاره ها در مدل حیوانی بررسی گردید.

یافته ها: نتایج نشان دادند که MIC و MBC عصاره آبی بر روی *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* 1/6 mg/ml و 3/2 و عصاره اتانولی 3/2 mg/ml و 6/5 بودند. نتایج عصاره آبی برای *سودوموناس آئروژینوزا* 6/5 mg/ml و13 و عصاره اتانولی 13 mg/ml و 26/1 و نتایج نانو ذرات نقره بر روی این باکتری ها به ترتیب 1/6 ppm و 3/1 (*استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*) و 3/1 ppm و 6/2 (*سودوموناس آئروژینوزا*) بودند. در مطالعه مدل حیوانی نیز کاهش معنی دار ($p<0/05$) تعداد باکتری ها در تمام گروه های آزمون مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج بررسی های شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی مشخص نمود که نانو ذرات نقره، عصاره آبی و عصاره اتانولی به ترتیب بیشترین فعالیت ضد میکروبی مؤثر بر روی *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* دارند و می توانند در ساخت داروهای جدید مفید باشند.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، موش BALB/c

www.SID.ir

مقدمه

استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس باکتری های کروی گرم مثبت با متابولیک فعال، از مهم ترین عوامل عفونت های پوستی یکی از مشکلات پزشکی بوده و برخی از باکتری ها جزء عوامل بیماری زایی در این عفونت ها می باشند. درمان این عفونت ها با آنتی بیوتیک ها عوارض ناخواسته ای نظیر مقاومت های دارویی را در پی دارد (۲،۱). *سودوموناس آئروژینوزا* یک باکتری گرم منفی بوده که معمولاً به صورت منفرد یا زنجیره های کوتاه دیده می شود. کلنی های این باکتری به صورت صاف و گرد بوده و اغلب رنگ فلورسنت سبز ایجاد می کنند که از این خاصیت برای تشخیص باکتری استفاده می شود. این باکتری در سوختگی ها و زخم ها ایجاد عفونت می کند که منجر به تشکیل چرک می گردد. رژیم درمانی آن تک دارویی نبوده و از پنی سیلین همراه با یک آمینو گلیکوزید که معمولاً جنتامایسین است استفاده می شود (3). برخی از گیاهان به دلیل تاثیرات ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد التهابی و ضد باکتریایی شان در طب سنتی مورد استفاده قرار می گیرند. گیاه پنیرک (Malva neglecta) از تیره ی مالواسه،گیاهی پایا، خوابیده با برگ های قلبی شکل، گل های سفید با رگه های قرمز یا قرمز شرابی به عنوان یکی از گیاهان دارویی در درمان بیماری های مختلف از قبیل سرما خوردگی و سرفه در مناطق مختلف ایران استفاده می گردد(شکل1). ترکیبات شیمیایی اندام های رویشی(برگ) و زایشی(گل) گیاه پنیرک علاوه بر ویتامین های A، B و C شامل تانن، مواد لعابی فراوان، قند، اگزالات کلسیم، مواد رزینی، پکتین و یک ماده رنگی به نام مالوین می باشد(6-4). امروزه مطالعات دانشمندان نشان داده است که نانوذرات نقره (شکل2). اثر باکتریوسایدی (ضد باکتریایی) قابل توجهی بر روی طیف وسیعی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی دارند. هم چنین مشخص شده است که تجمع ذرات نقره در محیط آبی دارای اکسیژن، باعث تخریب و ایجاد اختلال در اکسیداسیون میکروارگانیسم ها می گردد (7). در سال های اخیر، اثرات ضد میکروبی نمک های آمونیوم، نمک های محلول فلزی و آنتی بیوتیک ها به طور وسیع مورد استفاده قرار می گیرد که متاسفانه، برخی از این عوامل، توکسیک (سمی) بوده و یا اثر بسیار ضعیفی دارند. از طرفی ، مقاومت های آنتی بیوتیکی نیز در در حال افزایش است؛ اما در مقابل، نقره، غیر سمی، non tolerant و دارای خواص ضد عفونی است که می تواند عفونت های باکتریایی را به طور چشمگیری کاهش دهد (8). اثرات ضد باکتریایی نمک های نقره از زمان های باستان مورد توجه بوده است و امروزه نیز نقره برای کنترل رشد باکتری ها در موارد گوناگون نظیر دندان پزشکی، کاتترهای پزشکی و زخم های سوختگی به طور وسیع مورد استفاده قرار می گیرد. در حقیقت به خوبی مشخص شده است که یون های نقره و ترکیبات با پایه نقره بر روی میکروارگانیسم ها اثر سوء دارند، به طوری که اثر ضد میکروبی آن ها بر روی باکتری های زیادی شناخته شده است (9). از شروع قرن 21 میلادی با توجه به اثرات جانبی آنتی بیوتیک های مصرفی و مقاومت باکتریایی در برابر آن ها، استفاده از گیاهان دارویی و طب سنتی یکی از منابع با ارزش در پزشکی به شمار می آیند و در نتیجه ی گسترش بیماری های عفونی، شناسایی تعداد گیاهان دارویی و خالص سازی ترکیبات موثره آن ها در درمان بیماری ها مفید است. استفاده از دارو های سنتز شده با منشا گیاهی قابلیت درمانی بی شماری را به همراه دارد. استفاده از گیاهان دارویی نه تنها در درمان بیماری های عفونی نقش دارند بلکه به طور هم زمان تعداد زیادی از اثرات جانبی را که اغلب با مصرف آنتی بیوتیک همراه هستند،کاهش می دهند (4). گسترش روز افزون سویه های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به آنتی بیوتیک، یکی از معضلاتی است که امروزه پزشکان با آن مواجه هستند و به همین علت است که روز به روز تعداد آنتی بیوتیک های موثر و در دسترس برای درمان این عفونت ها کاهش یافته است هدف این مطالعه، بررسی اثر درمانی نانوذرات نقره و عصاره های اتانولی و آبی برگ پنیرک برای یافتن درمان جدید علیه *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* می باشد. همچنین اثر ضد باکتریایی نانوذرات نقره و عصاره های اتانولی و آبی برگ پنیرک در مدل حیوانی در موش های Balb/c مطالعه گردید. که در صورت اثبات اثر ضد میکروبی گیاه پنیرک، که بدون عوارض جانبی نسبت به نانو ذرات نقره که اثر سمی بر سلول را دارد از گیاهان دارویی استفاده کنیم. که استفاده و جایگزین گیاهان دارویی و نانو ذرات نقره به جای آنتی بیو تیک ها یک ضرورت مهم و در علم پزشکی می باشد. با توجه به مشکلات درمان چند دارویی باکتریهای مورد مطالعه، یافتن راه های درمانی جدید و جایگزین نمودن آن با درمان آنتی بیوتیکی بسیار ضروری است از سوی دیگر، درمان با داروهای موجود طولانی مدت است. بنابراین درمان تک دارویی و درمان کوتاه

Archive of SID

www.SID.ir

مدت این بیماری، هنوز هم به صورت یک هدف مهم از سوی دانشمندان مورد توجه است.

شکل1. گیاه پنیرک. شکل2. نانو ذرات نقره

روش بررسی

تهیه نمونه گیاهی و عصاره گیری: برگ گیاه پنیرک (Malva neglecta) در اردیبهشت ماه 1390 از حوالی شهرستان گوگان و شهرستان لنگرود جمع آوری و پس از شناسایی توسط گیاه شناسان مورد استفاده قرار گرفت(شکل 1). نمونه ها پس از جمع آوری، در سایه خشک و پس از پودر شدن درون شیشه های مات در محیط خشک تا زمان استفاده نگهداری شد. برای عصاره گیری 100 گرم از پودر گیاهی را به نسبت 1:8 با حلال های مورد آزمایش (آب مقطر و اتانول 80%) مخلوط نموده و پس از 48 ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه توسط گاز استریل 4 لایه ای و قیف صاف کرده و با دور 2500 در دقیقه به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سلسیوس سانتریفوژ شدند. برای تغلیظ عصاره ها از روش سوکسوله استفاده شد. عصاره های حاصل با استفاده از فیلترهای میکروبی 0/45 میکرونی استریل و در میکروتیوب های 1/5 میلی لیتری استریل تقسیم و در دمای 80- درجه سلسیوس نگهداری شدند(12-10).

تهیه نانو ذرات نقره: سوسپانسون نانو ذرات نقره با غلظت 4000ppm و با نام تجاری NANOCOLLOID از کمپانی NANOCID تهیه گردید(شکل 2).

تهیه باکتری ها: در این تحقیق باکتری های *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان آیت ا... موسوی زنجان جدا سازی و پس از کشت بر روی محیط های نوترنت آگار و انجام برخی تست های تاییدی نظیر بررسی مورفولوژی باکتری ها و رنگ آمیزی، تست های بیوشیمیایی و رشد در محیط های کشت انتخابی به صورت ذخیره ایزوله و در دمای 80- درجه سلسیوس نگهداری گردیدند.

روش رقت در براث برای تعیین (Minimum Inhibitory Concentration) MIC و (Minimum Bactericidal Concentration) MBC در شرایط آزمایشگاهی:

برای تعیین MIC و MBC عصاره ها و نانو درات نقره از روش ماکرودایلوشن استفاده شد. معیارتعیین MIC و MBC در برای حساسیت دارویی که همان حداکثر و حداقل اثر بازدارنده گی مواد بخاطر اینکه از حداقل عصاره و نانو ذرات در مدل حیوانی استفاده کنیم و این یک روش در علم میکروب شناسی می باشد. عوارض جانبی کمتری برای این منظور ابتدا غلظت های 418 تا 0/4 میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره ها و400 ppm تا 0/77 از نانو ذرات نقره در محیط مولر هینتون براث تهیه گردیدند. سپس با افزودن 1 میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل با کدورت 0/5 مک فارلند غلظت های نهایی عصاره ها به میزان 209 تا 0/8 میلی گرم بر میلی لیتر و نانو درات نقره به200 ppm تا 38/ 0 تنظیم شدند. لوله ها در انکوباتور با دمای 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت انکوبه گردیدند. در هر روز کدورت لوله ها بررسی شده و یک ساب کالچر بر روی محیط مولر هینتون آگار نیز داده شد. این بررسی سه بار تکرار شده و در کنار لوله های تست برای تعیین MIC، کنترل مثبت شامل باکتری در محیط فاقد عصاره و نانو ذرات نقره برای مقایسه کدورت لوله های تست انجام گرفت (13-9).

MIC در حقیقت کمترین بازدارنده از رشد یک ماده ضد میکروبی است، که اگر عامل ضد میکروبی از محیط حذف شود باکتری ها مجدداً قادر به رشد خواهند بود. MBC به

Archive of SID
www.SID.ir

حداقل غلظت ماده ضد میکروبی گفته می‌شود که بتواند 99/9 درصد از باکتری ها را نابود کند و اگر از آن کشت ثانویه انجام دهیم کم تر از 0/1 درصد باکتری های اولیه رشد کنند. به بیان دیگر MBC یا MLC (Minimum Lethal Concentration) حداقل غلظتی از ماده ضد میکروبی می‌باشد که اجازه رشد کم تر از 0/1 درصد از کل باکتری های کشت شده را می‌دهد(13-9).

تعیین اثر عصاره ها و نانو ذرات نقره به روش انتشار چاهکی در آگار: در روش انتشار چاهکی در آگار، بر روی محیط مولر هینتون آگار چاهک هایی به قطر 5 میلی متر ایجاد و پس از کشت باکتری از سوسپانسیون 0/5 مک فارلند توسط سواپ استریل در هر چاهک حدود 90 میکرولیتر از رقت های مختلف عصاره و نانو ذرات نقره تلقیح شد. سپس پلیت ها در انکوباتور با دمای 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت انکوبه و در نهایت هاله های عدم رشد باکتری ها اندازه گیری شد (13-9).

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره ها و نانو ذرات نقره در مدل حیوانی: جهت بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های پنیرک و نانوذرات نقره در مدل حیوانی از موش های ماده Balb/c 6-8 هفته ای تهیه شده از انستیتو پاستور کرج استفاده شد. 24 سر موش ماده Balb/c به 8 گروه 3 تایی تقسیم و از هر تیمار به 2 گروه تزریق و 2 گروه نیز به عنوان گروه های شاهد دریافت کننده نرمال سالین استریل بودند (10). برای تهیه سوسپانسیون میکروبی جهت ایجاد عفونت در موش ها، از کشت 24 ساعته باکتری های مذکور سوسپانسیون 0/5 مک فارلند که حاوی 108× 1/5 باکتری در هر میلی لیتر بود تهیه کرده و آن را به نسبت 1:300 در نرمال سالین استریل رقیق کرده تا رقت سوسپانسیون میکروبی جهت تزریق، به تعداد 105 × 5 باکتری در هر میلی لیتر برسد (۳۵،۱۴). در روز اول به هر گروه، تعداد 105 × 5 باکتری به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در روز بعد، 0/5 سی سی از عصاره های آبی و اتانولی پنیرک و نانوذرات نقره به صورت داخل صفاقی به 8 گروه و نرمال سالین به 2 گروه شاهد تزریق شد. پس از 7 روز ، موش ها با بی هوشی کشته و طحال حیوانات در شرایط استریل خارج و در فسفات بافر سالین استریل به مقدار 10 میلی لیتر هموژنیزه شدند، سپس از سوسپانسیون هموژنیزه طحالی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت انجام گرفت. پلیت های مذکور در 37 درجه سلسیوس گرم خانه گذاری گردیدند(14،35).

تجزیه و تحلیل آماری: یافته ها با نرم افزار SPSS و آزمون آماری One Way ANOVA (LSD) تحلیل و در p کمتر از 0/05 معنی دار تلقی شدند.

یافته ها

نتایج تعیین MIC و MBC عصاره ها و نانو ذرات نقره به روش ماکرودایلوشن: نتایج نشان دادند که MIC و MBC عصاره آبی بر روی *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* 1/6 mg/ml و 3/2 و عصاره اتانولی mg/ml 3/2 و 6/5 و *سودوموناس آئروژینوزا* mg/ml 6/5 و13 و عصاره اتانولی، 13 mg/ml و 26/1 و نانو ذرات نقره برای *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* 1/6ppm و 3/1 و *سودوموناس آئروژینوزا* ppm 3/1 و 6/2 بودند به دست آمد. در مدل حیوانی(in vivo)، میانگین تعداد *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* رشد کرده در 24 ساعت پس از کشت سوپرناتانت طحالی برای عصاره های آبی و اتانولی پنیرک به ترتیب1×10^3 CFU/ml، 2×10^4 CFU/ml در مقایسه با گروه کنترل 3×10^7CFU/ml و برای *سودوموناس آئروژینوزا* 3×10^3 CFU/ml، 3×10^4 CFU/ml در مقایسه با گروه کنترل 5×10^7 CFU/ml و نانو ذرات نقره برای *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* 1×10^2 CFU/ml و 3×10^2 CFU/ml در مقایسه با گروه کنترل 3×10^7 CFU/ml، 5×10^7 CFU/ml بودند. این نتایج نشان می دهند که عصاره آبی پنیرک نسبت به عصاره اتانولی آن، فعالیت ضدمیکروبی بیشتری علیه باکتری های مذکور دارد. نیز اختلاف معنی داری مابین تیمار ها نسبت به گروه های شاهد مشاهده می شود.

نتایج بررسی اثر عصاره ها و نانو ذرات نقره به روش انتشار چاهکی: بیشترین هاله عدم رشد مربوط به سوسپانسیون نانو ذرات نقره با غلظتppm 400 وسپس عصاره آبی پنیرک 209 میلی گرم بر میلی لیتر بود. کم ترین هاله عدم رشد مربوط به سوسپانسیون نانو ذرات نقره با غلظتppm 12/5 و عصاره اتانولی پنیرک باغلظت 13 میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* می باشد. مقدار حداکثر و حداقل هاله عدم رشد برای عصاره آبی به ترتیب برابر 30 و 17 میلی متر، عصاره اتانولی 20/3 و 12 میلی متر و

www.SID.ir
Archive of SID

سوسپانسیون نانو ذرات نقره 30/6 و10/6 میلی متر بودند(جداول3-1).

بیشترین و کمترین هاله های عدم رشد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مربوط به سوسپانسیون نانو ذرات نقره با غلظتppm 400 و سپس عصاره آبی پنیرک 209 میلی گرم بر میلی لیتر است وکمترین هاله عدم رشد مربوط به سوسپانسیون نانو ذرات نقره با غلظتppm 25 و عصاره اتانولی پنیرک با غلظت 52/2 میلی گرم بر میلی لیتر می باشد، حداکثر و حداقل هاله عدم رشد برای عصاره آبی به ترتیب برابر 8/3 و 14 میلی متر، عصاره اتانولی 8/6و 17/3 میلی متر ،نانو ذرات نقره8/3 و18/6 میلی متر می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص می شود که در رقت های مشخص، حساسیت *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* نسبت به انواع عصاره های پنیرک در مقایسه با *سودوموناس آئروژینوزا* بیشتر می باشد(جداول1-3).

جدول 1. اثرات غلظت های مختلف عصاره آبی پنیرک بر میانگین و انحراف از معیار قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا*

غلظت عصاره آبی mg/ml قطر عدم رشد	استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس	سودوموناس آئروژینوزا
کنترل	-	-
۲۰۹	۳۰±۱	۱۴±۱
۱۰۴/۵	۲۷±۱	۱۱/۳±۱/۵
۵۲/۲	۲۵±۱	۹/۶±۰/۵
۲۶/۱	۲۳±۱/۵	۸/۳±۰/۵
۱۳	۲۲/۵±۱/۵	-
۶/۵	۲۰±۱	-
۳/۲	۱۸±۱	-
۱/۶	۱۳±۱	-

جدول 2. اثرات غلظت های مختلف عصارها اتانولی پنیرک بر میانگین و انحراف از معیار قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا*

غلظت عصاره اتانولیmg/ml قطر عدم رشد	استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس	سودوموناس آئروژینوزا
کنترل	-	-
۲۰۹	۲۰/۳±۰/۵	۱۷/۳±۰/۵
۱۰۴/۵	۱۸/۳±۱/۵	۱۴/۳±۱/۵
۵۲/۲	۱۶/۶±۱/۱	۸/۶±۱/۱
۲۶/۱	۱۴/۵±۰/۵	-
۱۳	۱۱/۶±۰/۵	-
۶/۵	-	-
۳/۲	-	-
۱/۶	-	-

جدول 3. اثرات غلظت های مختلف نانو ذرات نقره بر میانگین و انحراف از معیار قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا*

غلظت نانو ذرات نقره ppm قطر عدم رشد	استافیلوکوکوس اپیدرمایس	سودوموناس آئروژینوزا
کنترل	-	-
۴۰۰	۳۰/۶±۱/۳	۱۸/۶±۱/۵
۲۰۰	۲۷/۳±۲/۵	۱۶±۱
۱۰۰	۲۶/۳±۱/۵	۱۳±۱
۵۰	۲۴±۱/۷	۱۱±۱
۲۵	۱۶/۶±۱/۵	۸/۳±۰/۵
۱۲/۵	۱۰/۶±۱	-
۶/۲	-	-
۳/۱	-	-

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج بررسی اثر عصاره ها و نانو ذرات نقره در مدل حیوانی:
سوسپانسیون نانو ذرات نقره موثرترین عصاره در مدل حیوانی علیه هر دو باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد مطالعه می باشد و در بین عصاره های گیاهی عصاره آبی پنیرک نسبت به عصاره اتانولی موثرتر می باشد. اختلاف معنی داری بین گروه های آزمون و گروه کنترل وجود دارد به طوری که تیمار ها ی حاصل موجب کاهش معنی دار رشد هر دو باکتری می شوند. همچنین در مدل حیوانی نیز همانند شرایط آزمایشگاهی حساسیت باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* به تیمارها بیشتر از *سودوموناس آئروژینوزا* می باشد(جدول 4).

جدول4. میانگین و انحراف از معیار اثر عصاره های آبی و اتانولی پنیرک و نانوذرات نقره بر روی تعداد باکتری های رشد یافته *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* در طحال موش های آلوده

باکتری / نوع عصاره	*استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*	*سودوموناس آئروژینوزا*
آبی	1000±70*	3000±260 *
اتانولی	20000±150*	30000±260*
نانو ذرات نقره	100±20*	300±30*
کنترل(نرمال سالین)	$(3\pm1)\times10^{7}$	$(5\pm1)\times10^{8}$

*** نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل با $p<0/05$**

بحث

استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس و *سودوموناس آئروژینوزا*، به دلیل قدرت بیماری زایی بالقوه و مقاومت روز افزون در برابر داروهای ضد میکروبی به یکی از مشکلات بهداشتی مهم در جهان تبدیل شده اند. بنابراین جلوگیری از بروز عفونت های ناشی از این باکتری ها و ریشه یابی کانون های انتشار آن در بیمارستان ها از مسائل ضروری است (15) با این که عفونت های بیمارستانی از چند دهه گذشته شناخته شده اند ولی هنوز هم به عنوان یک مشکل بزرگ و مهم مطرح می باشند. توجه به تعداد زیاد مبتلایان و هزینه های سنگین درمان این بیماران و مرگ و میر زیاد و مقاوم شدن میکروارگانیسم های پاتوژن بیمارستان به اکثر آنتی بیوتیک ها، اهمیت توجه خاص و اقدامات موثر به ویژه در زمینه تولید داروهای جدید را در عفونت های بیمارستانی روشن می سازد (17و16). با توجه به افزایش مقاومت باکتری ها به انواعی از آنتی بیوتیک ها، تلاش ها برای دست یابی به آگاهی های بیشتر از موارد استفاده موثر ترکیبات موجود در گیاهان و کاربردشان در درمان بیماری های مختلف صورت گرفته است. در این بررسی، عصاره های اتانولی و آبی گیاه دارویی پنیرک و نانو ذرات نقره بر روی دو باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* که جزء پاتوژن های مقاوم و از عوامل عفونتهای بیمارستانی بوده و سیر مقاومت آن ها به انواعی از آنتی بیوتیک ها رو به افزایش است بررسی شده است(18).

در مطالعه ای که در سال 2003 توسط روسارئو و همکاران بر روی فعالیت ضد میکروبی گیاه پنیرک (Malva lavatera) انجام گرفت مشخص شد که عصاره اتانولی این گیاه اثر ضد باکتریایی به بر روی *استافیلوکوکوس آورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سوبتی لیس* و *اشریشیا کلی* ندارد که ما در پژوهش حاضر به نتایج قابل قبولی دست یافتیم (19). شهیدی و همکاران(2004) با بررسی اثر ضد میکروبی عصاره متانولی پنیرک (Malva. Althaea officinali) بر روی 10گونه از باکتری های گرم مثبت و منفی از جمله (*استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا پنومونی* و *اشریشیا کلی*) گزارش نمود که این عصاره اثر ضد میکروبی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* داشته و بر سایر باکتری ها اثر ندارد. این نتیجه با نتایج یافته های ما مطابقت دارد. از آن جایی که در نیز میزان حساسیت برخی از باکتری به نسبت بیشتر بوده است (20). در مطالعه ای که در سال 2004 توسط باسران دولگر و احمد گونیز در کشور ترکیه انجام گرفت از 16 گیاه مورد بررسی از جمله پنیرک (Malva.sylvestris)، اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی بر روی برخی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سرئوس*، *کلبسیلا پنومونی* و *اشریشیا کلی*) مشخص نمودکه عصاره مذکور دارای قدرت بازدارندگی از رشد باکتری را دارا می باشد(21). شل و همکاران (2005) در کشور افریقا از قسمت های برگ و ریشه گیاه پنیرک (Malva parviflora) عصاره های آبی، اتانول و سیکلوهگزان تهیه و

Archive of SID
www.SID.ir

اثر ضد میکروبی آن را روش انتشار چاهکی و روش ماکرودایلوشن بر روی باکتری های *باسیلوس سوبتی لیس*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اپیدرمایس* مطالعه کردند. در این مطالعه بیشترین اثر ضد میکروبی گیاه قسمت ریشه و عصاره های سیکلو هگزان، اتانول و آبی بود. از آن جایی که در این مطالعه جمع آوری گیاه از مناطق مختلف صورت گرفته بود اثرات ضد میکروبی عصاره های هر کدام از مناطق متفاوت به دست آمد (22 ،21). در سال Rosina Khan 2009 و همکاران تاثیر تعدادی از گیاهان دارویی از جمله تیره پنیرک (Lavatera arborea L.) را بر روی تعدادی از باکتری ها (*اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *استرپتوکوکوس موتانس*، *استرپتوکوکوس بوویس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *استاف اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس*) و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* ارزیابی کردند. نتیجه بررسی های آن ها نشان دهنده آثار ضد میکروبی پنیرک بر روی باکتری ها و قارچ مورد مطالعه بود. در این مطالعه مشخص شد که در میان باکنری های گرم منفی، *کلبسیلا پنومونیه* و به ترتیب حساس ترین و مقاوم ترین باکتری ها نسبت به عصاره های تیره پنیرک هستند. هم چنین مشخص شد که از میان باکتری های گرم مثبت، *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* به ترتیب حساس ترین و *سالمونلا تیفی موریوم* مقاوم ترین باکتری نسبت به عصاره ها می باشد. که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد(23).

اولین مطالعات علمی در مورد اثرات ضد میکروبی نانو ذرات نقره علیه میکروب های مختلف توسط Ghandour و همکارانش انجام گرفت. آن ها دریافتند که نانو ذرات نقره اثر ضد میکروبی به روش انتشار چاهکی بر روی باکتری هایی مثل *اشریشیا کلی* دارند (24)، و احتمال می دهند که علت وجود فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره مربوط به به یون های مثبت نقره باشد که به شدت رشد باکتری را از طریق سرکوب آنزیم های تنفسی و اجزای انتقال الکترون از طریق تداخل با مهار همانند سازی و رو نویسی موجب می شود(25). این کار در سال 2004 توسط Sondi و همکارانش در کرواسی و پس از آن توسط Feng و همکارانش در سال 2005 بر روی اشریشیا کلی به عنوان یک باکتری گرم منفی تکرار و نتایج کارهای قبلی تایید شد. در این مطالعه به بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره بر میکروارگانیسم های عفونت بیمارستانی و دارای مقاومت دارویی و مقایسه با اثر ضد میکروبی عصاره های پنیرک پرداخته شد. نتایج این تحقیق بیان گر این مطلب بوده که نانو ذرات نقره و عصاره های پنیرک دارای اثرات ضد میکروبی بر روی باکتری های مورد مطالعه با غلظت های مختلف در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی می باشند (26).

در سال Nilda vanesa 2009 و همکارانش توانستند باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* مقاوم به متی سیلین را با استفاده از نانو ذرات نقره مهار نمایند. آن ها ثابت کردند که فلز نقره در حالت نانو بودن اثر ضد میکروبی می تواند داشته باشد. که این نتایج با مطالعه ما مطابقت دارد (27). Aruna Jyothi Kora در سال 2011خواص ضد باکتریایی نانو ذرات نقره بر روی باکتری مقاوم *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی و نتایج ضد باکتریایی نانوذرات نقره را گزارش نمود، این نتایج با بررسی هایی که بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی انجام گرفته شد، مطابقت دارد (28). روش انتشار چاهکی در آگار به منظور سنجش اثر ضد میکروبی وابسته به دوز ماده ضد میکروبی مورد استفاده قرار می گیرد. در مطالعه حاضر مشخص گردید که با افزایش غلظت نانوذرات نقره، اثر ضد میکروبی آن افزایش می یابد که با نتایج حاصل از پژوهش کورا و همکارانش که در سال 2010 در هندوستان با نانوذرات نقره بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شده است، کاملاً مطابقت دارد (29). نتایج این پژوهش مشخص نمود که کمترین MIC غلظت نانو ذرات نقره با اثر ضد باکتری غلظتppm 12/5 برای *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و بیشترین آن غلظت ppm 25برای *سودوموناس آئروژینوزا* می باشد که با نتایج حاصل از مطالعه کیم و همکارانش در سال 2007 هم خوانی دارد. این محققان اثر نانوذرات نقره را بر روی میکروب های مختلف نظیر مخمر، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* بررسی کردند و میزان MIC و MBC نانوذرات نزدیک به نتایج مطالعه حاضر می باشد (30).

در سال های اخیر تحقیقات مشابهی توسط Jun Sung Kim و همکارانش بر روی باکتری هایی مثل *E.coli*، *استافیلوکوکوس اپیدرمایس* و حتی مخمرها انجام گردیده است. که همگی اثر آنتی میکروبی نانوذرات نقره را تایید کرده اند و بیان نمودند نانو ذرات نقره می توانند با اتصال به گروه های سولفید منجر به دناتوراسیون پروتئین و کاهش باند های دی سولفیدی شوند(31)، علاوه بر این نانو ذرات نقره می توانند به گروه های دهنده الکترون حاوی گوگرد، اکسیژن و یا نیتروژن که به طور طبیعی وجود دارند متصل شوند و باعث اختلال در متابولیسم میکروارگانیسم مورد نظر شوند. بنابراین نانو ذرات

Archive of SID
www.SID.ir

نقره نمی توانند به طور مستقیم به پروتئین های خاص یا ساختار هایی از سلول باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* وارد شود بلکه به یک طیف وسیعی از سلول های هدف شامل غشا سلولی وارد می شوند. پس می توان گفت نانو ذرات نقره به غشای سلولی متصل و به داخل باکتری نفوذ کرده و یون های مثبت نقره را آزاد می کند و نهایتاً منجر به مرگ باکتری می گردد(۳۳،۳۲).

Humberto و همکارانش در سال 2010 در مکزیک اثر مهاری نانودرات نقره را بر روی باکتری هایی که مقاومت های دارویی زیادی از خود نشان می دهند مثل باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی* مقاوم به آمپی سیلین، *استرپتوکوکوس پایوژنز* مقاوم به اریترومایسین را نشان دادند آن ها مشاهده کردند که نانوذرات نقره اثر باکتریوستاتیک قابل ملاحظه ای بر روی این باکتری ها دارند(34).

نتیجه گیری

در مجموع نتایج بررسی های شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی نشان دادند که عصاره های استخراج شده از گیاه دارویی پنیرک و نانو ذرات نقره دارای فعالیت ضد میکروبی علیه *استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* می باشد، اما در مقایسه شرایط آزمایشگاهی و حیوانی، شرایط آزمایشگاهی به دلیل شرایط استاندارد محیط کشت و شرایط ثابت در MIC و MBC یکسان نسبت به مدل حیوانی اثرات ضد میکروبی بیشتری نشان داد. علاوه بر اینکه عصاره های پنیرک از دو منطقه مختلف مورد مطالعه قرار گرفت نتایج یکسان مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان به دلیل ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش، هم چنین از زحمات بی دریغ و صمیمانه خانواده های محترم نوع جو، قیاس پور ،اسماعیلی و نیز دوست همیشه گرامی پیمان عبداله زاده که در مقاله با اینجانب همراهی نمودند سپاسگزاری می گردد.

References

1. Adibfar P. Microbiology Medicine, and Tehran. 1991;(1): 461-484.
2. Jawetz, M. *Medical Microbiology*. 22th edition.USA.Mc Graw Hill componier. 2001: 229-232.
3. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. *The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections.* Drugs. 2007:67:351-68.
4. Seyyed M, Darabpor EA. *Survet on Hisicus rosa-sinenesis,Alcea L.and Malva naglecta Wallr as antimicrobial agents*. Asian parcific J of Tropica Medicine. 2010:351-355.
5. Nkri S, Mirelman D. *Antimicrobial properties of allicin from garlic*. Microbes Infect.1999; 1(2):125-129.
6. Richardson F, Richardson R, shepherd A. weeds of the South East: An Identification Gahde for Meredith Victoria. 2006.
7. Cho KH, Park JE, Osaka T, Park SG. *The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient.* Electrochimica Acta. 2005; 51: 956–960.
8. Rafie M, Mohamed A, Shaheen TI, Hebeish A. *Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by fungal processon cotton fabrics.* Carbohydrate Polymers. 2010;80: 779–782.
9. Kim J, Kuk E, Nam Yu K, Kim JH, Park SJ, Lee HJ. *Antimicrobial effects of silver nanoparticles.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and edicine. 2007, 3: 95– 101.
10. Sattari M, Shahbazi N, Najar Peeryeh S. *An assessment of antibacterial effect of alcoholic and aquatic extracts of Eucalyptus leaves on Pseudomonas aeruginosa*. J Med Sci. 2006; 8(5): 19-23
11. Igbal A, Beg AZ. *Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens*. J Ethnopharmacol. 2001: 74(2): 113-123.
12. Mohsen Nezhad F, Zeighami H, Mota A, Sattari M, Yadegar A. *Antibacerial activity of Eukalyptus extracts on methicillin resistance Staphylococcus aureus.* Res J Biol Sci. 2009; 4(8): 905-908.
13. Trujillano I, García-Sánchez E, Martínez IM, Fresnadillo MJ, García-Sánchez JE, García-Rodríguez JA. *In vitro activities of five new antimicrobial agents againts Brucella melitensis*. Int J Antimicrob Agxents. 1999; 12(2): 185-186.
14. Naeini A, Khosravi A, Tadjbakhsh H, Ghazanfari T, Yaraee R, Shokri H. *Evaluation of the immunostimulatory activity of Ziziphora tenuior extracts.* Comp Clin Pathol. 2010; 19: 459-463.
15. Orrt FA, Land M. *Meteicillin resistant Staphylococus aureus prevalence: current susceptibility patterns in Trinidad*. BMC Infect Dis. 2006; 6:83.
16. Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T. *Nosocomial spread of ceftazidime resistant strains producing a novel class A -lactamase, GES-3, in a neonatal intensine care unite in Japan.* Ant Agents and Chemother. 2004 48:1960-1967.
17. Yan J, Kasi S, Chuang C. *Epidemiological investigation of bloodstream infections by extended*

Archive of SID

www.SID.ir

spectrum cephalospoyin resistant in a Taiwanese teaching hospital. J Clin Microbiol. 2004; 42: 3329-3332.
18. Lawson L. *Phytomedicines of Europe: Their Chemistry and Biological activity*. Am Chemi Soci. Washing. DC. Pub. 1998.
19. Rosario R, Beatriz B. *Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology. 2003; 88:199–204.
20. Shahidi B. *Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran.* J Ethnopharmacology. 2004; 94: 301–305.
21. Dulgar B. *Antimicrobia Activity of Certain Plants Uesd in Turkish Traditonal Medicine*. J Plant Sci. 2004; 3(1):104-107.
22. Shale T, Stirk W, Van Staden. *Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of Malva parviflora and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds*. J Ethn. 2005; 96: 325–330.
23. Khan R. *Antimicrobial Activity of Five Herbal Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus of Clinical Origin.* Molecules. 2009; 14: 586-597.
24. Catalina J, Eric M, Hoek. *A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implication for human health and the environment*. J Nanopart Res. 2010; 12:1531-1551.
25. 25 Li Y, Leung P, Yao L, Song QW, Newton E. Antimicrobial effectof surgical masks coated with nanoparticles. J Hosp Infect. 2006; 62:58–63.
26. 26. Ivan Si, Branka S. *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E.coli as a model for Gram-negative bacteria*. J Colloid Sci. 2004; 275: 177-182.
27. 27 Nilda V, Humberto H. *Silver Nanoparticles Toxicity and Bacterial Effect Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Nanobiotechnol. 2009; 5: 2-9.
28. Aruna J, Kora J. *Assessment of Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles on Pseudomonas aeruginosa and its Mechanism of Action*. World J Mic Bio. 2011; 1209-1216.
29. Kora AJ, Arunachalam J. *Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on Pseudomonas aeruginosa and its mechanism of action.* World J Microbiol Biotechnol. 2010.
30. Kim JS, Kuk E, Nam Yu K, Kim JH, Park SJ, Lee HJ. *Antimicrobial effects of silver nanoparticles.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2007; 3: 95– 101.
31. McDonnell GE. *Chemical Disinfection*. In: Antisepsis, disinfection, and sterilization. 2007; 111–5.
32. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H. *Proteomic nalysis of the mode of antibacterial action of silvernanoparticles.* J Proteome Res. 2006; 5:916–24.
33. Yin H, Langford R, Burrell R. *Comparative evaluation of the Antimicrobial activity of Acticoat antimicrobial barrier dressing.* J of Burn Care Rehabil. 1999;20: 195-200.
34. Hmberto HL, Nilda V. *Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles against multidrug-resistant Bacteria.* World J Mic Bio. 2010; 26: 615-621.
35. Abdolahzade P, Shapouri R, Nasiri Semnani SH . *Antibacterial effects of Eucalyptus globulus extracts on Brucella melitensis 16M and Brucella abortus S99 in vitro and in vivo*. J Ardabil Univ Med Sci. 2011; 11(3): 218-227.

Archive of SID

www.SID.ir