ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصارههای اتانولی و آبی گیاه پنیرک و نانوذرات نقره بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی

- مجید دوست محمدی[1]
- شهرزاد نصیری سمنانی*[2]
- رضا شاپوری[2]
- حامد علیزاده[3]
- پیمان عبداله زاده[3]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان،گروه میکروبیولوژی، زنجان، ایران.

۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، استادیار گروه میکروبیولوژی، زنجان، ایران.

Sh nasiri92 @ yahoo.com

۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، باشگاه پژوهشگران جوان، زنجان، ایران.

چکیده

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم از عوامل مهم عفونت های کسب شده از مراکز بهداشتی درمانی و بیمارستان ها هستند. عفونت‌های ناشی از استاف اورئوس مقاوم به متی سیلین معمولاً در بیمارستان بوده و در سراسر جهان در حال افزایش می باشند. مطالعات گسترده ای جهت یافتن ترکیب های جدید به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک ها صورت پذیرفته است. هدف از این پژوهش ارزیابی و مقایسه فعالیت ضد باکتریایی عصاره های پنیرک و نانو ذرات نقره علیه استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم مقاوم است.

روش پژوهش

در این پژوهش که در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی انجام می گیرد.ابتدا عصاره های آبی و اتانولی برگ های پنیرک تهیه و میزان MIC و MBC عصاره ها و نانوذرات نقره بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم با روش های رقت در براث و انتشار چاهکی در آگار تعیین گردید. در مطالعه مدل حیوانی، ابتدا ۵×۱۰۵CFU/ml باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم به صورت داخل صفاقی به ۲۴سر موش ماده BALB/c به ۸ گروه ۳ تایی تقسیم و از هر تیمار به ۲ گروه تزریق و ۲ گروه نیز به عنوان گروه های شاهد دریافت کننده نرمال سالین استریل بودند تزریق و بعد از ۲۴ ساعت مقدار ۰/۵ سی سی (برابر با غلظت MBC عصاره ها و نانو ذرات نقره) از عصاره های پنیرک و نانوذرات نقره به صورت داخل صفاقی تزریق شد و تعداد کلونی های باکتری های مذکور طحالی پس از ۷ روز از آلودگی با کشت بر روی محیط مولر–هینتون

Archive of SID

www.SID.ir

آگار شمارش گردید. یافته ها با نـرم افـزار SPSS و آزمون آماری One Way ANOVA (LSD) تحلیل و در p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شدند.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده مشـخص نمـود کـه MIC و MBC عصاره آبی پنیرک برای اسـتافیلوکوکوس اورئوس ۳/۲ و ۶/۵ میلـی گـرم بـر میلـی لیتـر و عصاره اتانولی ۶/۵ و ۱۳ میلی گرم بر میلی لیتر و نانو ذرات نقره ppm ۶/۲و ۱۲/۵ بودند و میـزان MIC و MBC عصـاره هـای آبـی و اتـانولی پنیرک برای سالمونلا تیفی موریوم با یـک دیگـر برابر و مقدار آن ها ۵۲/۲ و ۱۰۴/۵ میلی گـرم بـر میلی لیتر و برای نانودرات نقره ppm ۱۲/۵و ۲۵ بودند. در مدل حیوانی(in vivo)، میانگین تعـداد استافیلوکوکوس اورئوس رشد کرده در ۲۴ ساعت پس از کشت سـوپرناتانت طحـالی بـرای عصـاره های آبی و اتانولی پنیـرک بـه ترتیـب CFU/ml ۳×۱۰۳، CFU/ml ۲×۱۰۴ و بـــرای نـــانو ذرات نقره CFU/ml ۳۰۰ در مقایسه با گروه کنتـرل ۳×۱۰۷CFU/ml و برای سالمونلا تیفی موریـوم به ترتیـب ۶×۱۰۳CFU/ml ، CFU/ml ۷×۱۰۴ و CFU/ml۵۰۰ در مقایسـه بـا گـروه کنتـرل ۴×۱۰۸CFU/ml بودند.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج بررسی های شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی مشـخص نمـود کـه عصـاره آبـی پنیرک و نـانو ذرات نقـره در مقایسـه بـا عصـاره اتانولی بیشترین فعالیت ضـد میکروبـی مـؤثر بـر روی استافیلوکوکوس اورئـوس و سـالمونلا تیفـی موریوم دارنـد و مـی تواننـد در سـاخت داروهـای جدید مفید باشند.

کلید واژه‌ها

استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریـوم، موش BALB/c، نـانوذرات نقـره، عصـاره هـای پنیرک.

Abstract

Introduction

Staphylococcus aureus and Salmonella typhimurium are an important cause of community and hospital acquired. infections caused by methicillin resistant S. aureus are mainly nosocomial and are increasing in all around the world. Many attempts have been made by the researchers to find new compounds as an appropriate substitute for these antibiotics. The aim of this study is evaluation and comparison of antibacterial activity of Malva neglecta extracts and nanosilver particles against resistant Staphylococcus aureus and Salmonella typhimurium.

Method

In this study aquatic and ethanolic extracts of Malva neglecta leaves prepared, and MIC and MBC of extracts and nanosilver particles for Staphylococcus aureus and Salmonella

Evaluation of antibacterial effects of aquatic and ethanolic extracts of Malva neglecta & Silver nanoparticle on Staphylococcus aureus and Salmonella typhimurium in Invivo and Invitro

- Dost Mohamadi M[1]
- **Nasisri Semnani SH*[1]**
- Shapouri R[2]
- Alizadeh H[2]
- Abdolahzade P[3]

1. Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
2. Center of Biological Research, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran. Sh.nasiri92@yahoo.com
3. Young researchers club, zanjan branch, Islamic azad university, zanjan, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir

typhimurium calculated with broth macrodilution and agar well diffusion methods. In animal model study, 5×10^5 CFU/ml of eacth bacteia was inoculated intraperitoneally and after 24 h, 0.5 cc (as MBC concentration of each extracts and nanosilver particles) of each Malva neglecta extracts and nanosilver particles inoculate i.p to female BALB/c mice. Then, the count of baceria in spleen were determined on Muller-Hinton agar after 7 days as the standard protocol.

Results

Results indicated that MIC and MBC of Malva neglecta aquatic extract for Staphylococus aureus were 3.2 and 6.5 mg/ml and for ethanolic extract were 6.5 and 13 mg/ml and for nanosilver particles were 6.2 and 12.5 ppm, respectively and MIC and MBC of Malva neglecta aquatic and ethanolic extracts for Salmonella typhimurium were equal to 52.2 and 104.5 mg/ml and for nanosilver particles were 12.5 and 25 ppm, respectively. The in vivo average grown Staphylococus aureus 24 hours after of culture of spleen supernatant for aquatic and ethanolic extracts were 3×10^3 CFU/ml and 2×10^4 CFU/ml and for nanosilver particles were 300CFU/ml, respectively in comparison with control group (3×10^7 CFU/ml). Also this in vivo results for Salmonella typhimurium were 6×10^3 CFU/ml and 7×10^4 CFU/ml for aquatic and ethanolic extracts for nanosilver particles were 500 CFU/ml, respectively in comparison with control group (4×10^8 CFU/ml).

Conclotion

Overally in vitro and animal model the results indicated that aquatic extract of Malva neglecta and nanosilver particles were shown the most effective antimicrobial activity on Staphylococus aureus and Salmonella typhimurim in comparison with ethanolic extract and they can be useful in production of new drugs.

Key words

Staphylococus aureus, Salmonella typhimurium, BALB/c Mice, Silver nanoparticle, Malva neglecta Extracts.

مقدمه

استافیلوکوک ها باکتری های کروی گرم مثبت با متابولیک فعال، از مهم ترین عوامل عفونت های بیمارستانی بوده که شیوع آن نسبتاً رو به گسترش می باشد. این باکتری در ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها از جمله اندوکاریت، استئو میلیت، پنومونی، سندرم شوک سمی، کورک یا دمل و غیره نقش دارد. تخمین زده می شود که۳۰-۲۵ درصد افراد در جوامع مختلف ناقل استافیلوکوکوس اورئوس در بینی خود می باشند که در بسیاری از موارد منشا عفونت همین ناقلین طبیعی می باشد(۲،۱). سالمونلا تیفی موریوم گونه ای از جنس سالمونلا از خانواده ی انتروباکتریاسه باسیل گرم منفی، هوازی یا بی هوازی اختیاری، به اندازه ی ۰/۵ در ۳ میکرون، فاقد اسپور، متحرک و دارای فلاژل پری تریش است که از طریق خوراکی وارد بدن انسان شده و موجب بیماری هایی از قبیل التهاب روده، عفونت سیستمیک و تب روده ای می شوند (۳).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 شایع و سرفه در مناطق مختلف ایران استفاده می گردد.ترکیبات شیمیایی پنیرک اندام های رویشی(برگ) و زایشی(گل) گیاه علاوه بر ویتامین های A، B ، C ، شامل تانن، مواد لعابی

Archive of SID

www.SID.ir

فراوان، قند، اگزالات کلسیم، مواد رزینی، پکتیک و یک ماده رنگی به نام مالوین می باشد(۵،۴).مطالعات انجام شده بر روی خواص ضد میکروبی پنیرک نشان می دهد که این گیاه دارای فعالیت های ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی علیه بسیاری از پاتوژن های انسانی می باشد. نانو ذرات نقره انواع بیماری با منشائ میکروارگانیسمی را از بین می برد .استفاده از نانوذرات نقره به عنوان ماده ی ضد میکروب هنوز فعالیت آنتی باکتریالی قوی، جهت گیری اصلی برای گسترش محصولات نانو نقره می باشد .نانوذرات نقره با مکانیسم های متفاوتی تأثیر گذار می باشند که این مکانیسم ها عبارتند از:

۱. نانو ذرات نقره پتانسیل غشایی پلاسما را ناپایدار می کند که نتیجه ی آن کاهش سطح ATP (آدنوزین تری فسفات) درون سلول می باشد. این عمل با هدف قرار دادن غشاء سلول باکتری انجام می شود و باعث مرگ باکتری می گردد.

۲. بار کلی سلول های باکتری در pH بیولوژیکی منفی می باشد، چون در این ساختار گروه های اسیدی زیادی وجود دارند که تفکیک آن ها باعث می شود دیواره ی سلولی بار منفی به خود بگیرد. اختلاف بار باکتری ها و نانو ذرات باعث چسبندگی و افت فعالیت های زیستی، ناشی از نیرو های جاذبه الکترواستاتیکی است.

۳. نانوذرات نقره موجب از هم گسستن حفاظ موجود در غشاء خارجی باکتری می شود که باعث آزاد شدن تصاعدی مولکول هایی نظیر LPS (لیپو پلی ساکارید) و پورین ها از غشاء سیتو پلاسمی می شود (۷،۶) .

مکانیزم عملکرد نقره در برابر باکتری ها هنوز کاملاً مشخص نیست. ممکن است ذرات نقره به سطح سلول بچسبد و کارهای معمولی سلول نظیر تنفس و انتقال مواد را مختل کنند. این نظریه ناشی از بازده بالای نانو ذرات نقره ریزتر است. زیرا با افزایش سطح ذرات، میزان چسبندگی به سطح سلول ها نیز افزایش می یابد و در نتیجه راندمان میکروب کشی بالاتر می رود .وجود ذرات نانو داخل سلول این نظریه را تقویت می کند که نقره با ایجاد پیوند با فسفر و گوگرد که داخل ترکیبات سلول نظیرDNA وجود دارد که باعث کشتن واز بین رفتن میکروب می شود(۸).گسترش روز افزون سویه های استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم مقاوم به آنتی بیوتیک ،یکی از معضلات است که امروزه پزشکان با آن مواجه هستند و به همین علت است که رور به روز تعداد آنتی بیوتیک های موثر و در دسترس برای درمان این عفونت ها کاهش یافته است. اولین پنی سیلین نیمه صناعی به نام متی سیلین درسال ۱۹۵۹ برای غلبه برمشکلات ایجاد شده از افزایش تولیدات پنی سیلینازی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به پنی سیلین معرفی شد. درسال ۱۹۸۰ آغاز مقاومت استافیلوکوک اورئوس به متی سیلین (MRSA) موجب نگرانی زیاد در سلامت عمومی گردید. مقاومت به متی سیلین استافیلوکوک اورئوس به طور اولیه از طریق تولید بیشتر PBP2a وهمچنین PBP تغییر یافته با افینیتی پائین برای آنتی بیوتیک های بتالاکتام ایجاد می شود. از این رو ژن mecA بعنوان شاخص ساختمانی رمزکننده PBP2a،مارکرمولکولی مفیدی برای مقاومت متی سیلین دراستافیلوکوک اورئوس قلمداد شده است(۱۰،۹)از شروع قرن ۲۱ میلادی با توجه به اثرات جانبی آنتی بیوتیک‌های مصرفی و مقاومت باکتریایی در برابر آن ها به طب سنتی و استفاده گیاهان دارویی یکی از منابع با ارزش در پزشکی به شمار می آیند و در نتیجه‌ی 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

Archive of SID
www.SID.ir

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 اغلب با مصرف آنتی بیوتیک همراه هستند،کاهش می دهند(۴). هدف از این پژوهش بررسی مقایسه ای که کدام ماده با اثر ضد میکروبی بالا و با عوارض پایین برای رفع مشکلات این باکتری با اثرات ضد باکتریایی عصاره های اتانولی و آبی برگ پنیرک نانو ذرات نقره بر روی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم می باشد.

مواد و روش ها

تهیه نمونه گیاهی و عصاره‌گیری

برگ گیاه پنیرک در اردیبهشت ماه ۱۳۹۰ از حوالی شهرستان گوگان جمع آوری و پس از شناسایی توسط گیاه شناسان مورد استفاده قرار گرفت.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 ۱۰۰ گرم از پودر گیاهی را به نسبت ۱:۸ با حلال های مورد آزمایش(آب مقطر، اتانول ۸۰٪ و استون مطلق)مخلوط و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه و هم زدن هر یک ساعت یک بار با یک میله شیشه ای با گاز استریل ۴ لایه ای و قیف صاف و با دور ۲۵۰۰ در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ و برای تغلیظ از دستگاه تقطیر در خلا استفاده گردید و عصاره ها تا جایی غلیظ شد که حلالی باقی نماند. عصاره‌های حاصل با استفاده از فیلترهای میکروبی ۰/۴۵ میکرونی استریل و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری استریل تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.(۱۳-۱۱).

تهیه نانو ذرات نقره

سوسپانسون نانو ذرات نقره با غلظت ۴۰۰۰ppm و با نام تجاری NANOCOLLOID از کمپانی NANOCID تهیه گردید. کلیه محیط های کشت و حلال های مورد استفاده از شرکت مرک تهیه شد.برای تقطیر عصاره ها از دستگاه تقطیر در خلا شرکت هایدولف استفاده گردید.

تهیه باکتری‌ها

در این تحقیق از باکتری های سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان آیت ا... موسوی زنجان جدا سازی شدندو 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 EMB, HE, MC, SS, XLD به صورت استوک ایزوله ودر دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. برای تعیین MIC و MBC عصاره ها و نانو درات نقره از روش ماکرودایلوشن استفاده شد. برای این منظور ابتدا غلظت های ۴۱۸ تا۰/۴میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره ها وppm ۴۰۰ تا ۷۷/ ۰از نانو ذرات نقره در محیط مولر هینتون براث تهیه گردیدند. سپس با افزودن ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل با کدورت ۰/۵ مک فارلند غلظت های نهایی عصاره ها به میزان۲۰۹ تا ۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر و نانو درات نقره بهppm ۲۰۰ تا ۰/۳۸ تنظیم شدند. لوله ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. در هر روز کدورت لوله ها بررسی شده و یک ساب کالچر بر روی محیط مولر هینتون آگار نیز داده شد. بررسی سه بار تکرار شده و در کنار لوله های تست برای تعیین MIC، کنترل مثبت شامل باکتری در محیط فاقد عصاره برای مقایسه کدورت لوله های تست انجام گرفت(۱۴-۱۲).

Archive of SID
www.SID.ir

تعیین اثر عصاره‌ها به روش انتشار چاهکی در آگار

در روش انتشار چاهکی در آگار، بر روی محیط مولر هینتون آگار چاهک هایی به قطر ۵ میلی متر ایجاد شد. سپس سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند از باکتری های مورد آزمایش در نرمال سالین استریل تهیه شد و توسط سواب استریل بر روی محیط های کشت در سه جهت کشت داده شد. در هر چاهک ۹۰ میکرولیتر از رقت های مختلف عصاره تلقیح شد. سپس پلیت ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه و در نهایت هاله های عدم رشد باکتری ها اندازه گیری شد. و یک چاهک حاوی آب مقطر استریل به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد(۱۴-۱۲).

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره ها در مدل حیوانی

جهت بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های پنیرک و نانوذرات نقره در مدل حیوانی از موش های ماده BALB/c ۸-۶ هفته ای تهیه شده از انستیتو پاستور کرج استفاده شد. ۲۴سر موش ماده BALB/c به ۸ گروه ۳ تایی تقسیم و از هر تیمار به ۲ گروه تزریق و ۲ گروه نیز به عنوان گروه های شاهد دریافت کننده نرمال سالین استریل بودند (۱۱). برای تهیه سوسپانسیون میکروبی جهت ایجاد عفونت در موش ها، از کشت ۲۴ ساعته باکتری های مذکور سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند که حاوی ۱۰۸× ۱/۵ باکتری در هر میلی لیتر بود تهیه کرده و آن را به نسبت ۱:۳۰۰ در نرمال سالین استریل رقیق کشده تا رقت سوسپانسیون میکروبی جهت تزریق، به تعداد ۱۰۵ × ۵ باکتری در هر میلی لیتر برسد (۱۷). در روز اول به هر گروه، تعداد ۱۰۵ × ۵ باکتری در هر میلی لیتر به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در روز بعد، ۰/۵ سی سی (برابر غلظت MBC تیمارها) از عصاره های آبی و اتانولی پنیرک و نانوذرات نقره به صورت داخل صفاقی به ۸ گروه و نرمال سالین به ۲ گروه شاهد تزریق شد. پس از ۷ روز ، موش ها با بی هوشی کشته و طحال حیوانات در شرایط استریل خارج و در فسفات بافر سالین استریل به مقدار ۱۰ میلی لیتر هموژنیزه شدند، سپس از سوسپانسیون هموژنیزه طحالی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت انجام گرفت. پلیت های مذکور در ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری گردیدند(۱۵)

تجزیه و تحلیل آماری

یافته ها با نرم افزار SPSS و آزمون آماری One Way ANOVA (LSD) تحلیل و در p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شدند.

یافته‌ها

نتایج تعیین MIC و MBC عصاره ها به روش ماکرودایلوشن

این نتایج نشان می‌دهند که MIC و MBC عصاره آبی پنیرک برای استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۳/۲ و ۶/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و عصاره اتانولی ۶/۵ و ۱۳ میلی گرم بر میلی لیتر و نانودرات نقره ۶/۲ppmو ۱۲/۵ بودند. هم چنین میزان MIC و MBC عصاره آبی و اتانولی پنیرک برای سالمونلا تیفی موریوم با هم برابر بوده و مقادیر آن به ترتیب ۵۲/۲ و ۱۰۴/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و مقدار MIC و MBC نانو ذرات نقره ۱۲/۵ppmو۲۵بود. این نتایج نشان می دهند که عصاره آبی پنیرک نسبت به عصاره اتانولی آن، فعالیت ضدمیکروبی بیشتری علیه باکتری های سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس دارد. نیز اختلاف معنی داری مابین تیمار ها نسبت به مشاهده می شود.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج بررسی اثر عصاره ها به روش انتشار چاهکی

بیشترین هاله عدم رشد مربوط به سوسپانسیون نانو ذرات نقره با غلظتppm ۴۰۰ وسپس عصاره آبی پنیرک ۲۰۹ میلی گرم بر میلی لیتر بود. کم ترین هاله عدم رشد مربوط به سوسپانسیون نانو ذرات نقره با غلظتppm ۱۲/۵ و عصاره اتانولی پنیرک باغلظت ۱۳ میلی گرم بر میلی لیتر مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. مقدار حداکثر و حداقل هاله عدم رشد برای عصاره آبی به ترتیب برابر ۲۸ و ۱۵ میلی متر، عصاره اتانولی ۳۰ و ۱۲ میلی متر و سوسپانسیون نانو ذرات نقره ۲۷/۶ و۷/۶میلی متر،عصاره استونی بدون هاله می باشد

جدول ۱- اثرات غلظت های مختلف عصاره آبی پنیرک بر میانگین و انحراف از معیار قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم

غلظت عصاره آبی mg/ml / قطر عدم رشد	کنترل	۲۰۹	۱۰۴/۵	۵۲/۲	۲۶/۱	۱۳	۶/۵	۳/۲	۱/۶
استافیلوکوکوس اورئوس	-	۲۸±۱	۲۶±۱	۲۳/۶±۱/۵	۲۱/۳±۱/۵	۲۰/۶±۱/۵	۱۹±۱	۱۵±۲	-
سالمونلا تیفی موریوم	-	۱۷±۳	۱۳±۲/۶	۱۰±۲	۷/۳±۰/۵	-	-	-	-

جدول ۲-اثرات غلظت های مختلف نانو ذرات نقره بر میانگین و انحراف از معیار قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم

غلظت نانو ذرات نقره ppm / قطر عدم رشد	کنترل	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲/۵	۶/۲	۳/۱
قطر هاله عدم رشداستافیلوکوکوس اورئوس	-	۲۷/۶±۱/۵	۲۲/۳±۱/۵	۱۶/۳±۱/۵	۱۴±۱/۷	۱۰/۶±۱/۵	۷/۶±۱	-	-
قطر هاله عدم رشد سالمونلا تیفی موریوم	-	۱۶±۱	۱۴±۱	۱۲/۶±۰/۵	۱۰/۳±۱/۵	-	-	-	-

بیشترین و کمترین هاله های عدم رشد باکتری سالمونلا تیفی موریوم مربوط به سوسپانسیون نانو ذرات نقره با غلظتppm ۴۰۰ وسپس عصاره آبی پنیرک ۲۰۹ میلی گرم بر میلی لیتر است وکمترین هاله عدم رشد مربوط به سوسپانسیون نانو ذرات نقره با غلظتppm ۵۰ و عصاره اتانولی پنیرک با غلظت ۱۰۴/۵ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد، حداکثر و حداقل هاله عدم رشد برای عصاره آبی به ترتیب برابر ۱۷ و ۷/۳ میلی متر، عصاره اتانولی ۱۴/۶و ۱۲ میلی متر ،نانو ذرات نقره۱۶ و۱۰/۳ میلی متر و عصاره استونی بدون هاله می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده

Archive of SID
www.SID.ir

مشخص می شود کـه در رقـت هـای مشـخص، حساسیت اسـتافیلوکوکوس اورئـوس نسـبت بـه انواع عصاره های پنیرک در مقایسه با سـالمونلا تیفـــی موریـــوم بیشـــتر مـــی باشـــد

جدول ۳- اثرات غلظت های مختلف عصارها اتانولی پنیرک بر میانگین و انحراف از معیار قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم

غلظت عصاره اتانولی mg/m / قطر عدم رشد	کنترل	۲۰۹	۱۰۴/۵	۵۲/۲	۲۶/۱	۱۳	۶/۵	۳/۲	۱/۶
رشداستافیلوکوکوس اورئوس	–	۱۸/۶±۱	۱۶/۶±۱/۵	۱۴/۶±۱/۵	۱۱/۶±۰/۵	۱۰±۱	-	–	–
سالمونلا تیفی موریوم	–	۱۴/۶±۱/۵	۱۲±۲/۶	–	–	–	–	–	–

نتایج بررسی اثر عصاره ها در مدل حیوانی

سوسپانسیون نانو ذرات نقره موثرترین عصـاره در مدل حیوانی علیه هر دو باکتری اسـتافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم مورد مطالعه می باشد و در بین عصاره هـای گیـاهی عصـاره آبـی پنیرک نسبت به عصاره اتانولی موثرتر می باشـد..

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 بـاکتری مـی شـود.نیز ماننـد شـرایط آزمایشـگاهی حساسـیت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به تیمارها بیشتر از سالمونلا تیفی موریوم می‌باشد

جدول۴- میانگین و انحراف از معیار اثر عصاره های آبی و اتانولی پنیرک و نانوذرات نقره بر روی تعداد باکتری های رشد یافته استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم در طحال موش های آلوده

باکتری / نوع عصاره	استافیلوکوکوس اورئوس	سالمونلا تیفی موریوم
آبی	۳۰۰۰±۸۰*	۶۰۰۰±۱۶۰ *
اتانولی	۲۰۰۰۰±۱۰۰*	۷۰۰۰۰±۲۴۰*
نانو ذرات نقره	۳۰۰±۱۰*	۵۰۰±۱۰ *
کنترل(نرمال سالین)	$(۳±۱)\times۱۰^{۷}$	$(۴±۱)\times۱۰^{۸}$

* نشان دهنـده اخـتلاف معنـی دار بـا گـروه کنترل با $p<۰/۰۱$

بحث و نتیجه گیری

استافیلوکوکوس اورئوس، به دلیل قدرت بیمـاری زایی بالقوه و مقاومت روز افزون در برابر داروهای ضد میکروبی به یکی از مشکلات بهداشتی مهـم در جهان تبدیل شده اسـت.بنابراین جلـوگیری از بروز عفونت های ناشی از ایـن بـاکتری و ریشـه

Archive of SID
www.SID.ir

یابی کانون‌های انتشار آن در بیمارستان ها از مسائل ضروری است(۱۶). شیوع شدید پاراتیفوئید خصوصاً سالمونلا تیفی موریوم در سال ۱۹۷۸ در امریکا و استرالیا سبب خسارات زیادی شد.صنعت مرغداری مهمترین و بزرگترین منبع سالمونلا هستندکه می توانند آنرا از طریق غذا به انسان منتقل کنند پس کنترل آن بسیار مهم می باشد (۱۷).

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 اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم 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(۱۸).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۳ توسط روسارئو و همکاران بر روی فعالیت ضد میکروبی گیاه پنیرک (Malva lavatera) انجام گرفت مشخص شد که عصاره اتانولی۹۵ در صد این گیاه اثر ضد باکتریایی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتی لیس و اشریشیا کولی ندارد (۱۹). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۴ توسط باسران دولگر و احمد گونیز در کشور ترکیه انجام گرفت از ۱۶ 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 کولی) مشخص نمودکه عصاره مذکور دارای قدرت بازدارندگی از رشد باکتری را دارا می باشد(۲۰). شهیدی و همکاران(۲۰۰۴) با بررسی اثرعصاره متانولی پنیرک (Malva. Althaea officinali) بر روی ۱۰گونه از باکتری های گرم مثبت و منفی از جمله (استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا ، کلبسیلا پنومونی و اشریشیا کولی) گزارش نمودکه این عصاره اثر ضد میکروبی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا داشته و بر سایر باکتری اثر ندارد این نتیجه با نتایج یافته های ما مطابقت دارد از آن جایی که در پژوهش حاضر نیز میزان حساسیت برخی از باکتری به نسبت بیشتر بوده است(۲۱). شل و همکاران (۲۰۰۵)در کشور افریقا از قسمت های برگ و ریشه گیاه پنیرک (Malva parviflora) عصاره های آبی، اتانول و سیکلوهگزان تهیه و اثر ضد میکروبی آن بر روی باکتری های باسیلوس سوبتی لیس، اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه کردند.در این مطالعه بیشترین اثر ضد باکتری به ترتیب قسمت ریشه و عصاره سیکلو هگزان،اتانول و آبی 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 که نتیجه ای از تقابل بین ترکیبات مختلف، تاثیرات سمی و دارویی آن ها از طریق تقویت فیزیولوژی یا کاهش تاثیرات مضر می باشد. با آن که عصاره پنیرک(Malva neglecta) حاضر از مناطق متفاوت جغرافیایی جمع آوری شده بود ولی بر خلاف گزارشات شل اثرات ضد باکتریایی یکسانی نشان داد (۲۲، ۲۰).

اولین مطالعات علمی در مورد اثرات ضد میکروبی نانو ذرات نقره علیه میکروب های مختلف توسط Ghandour و همکارانش(۱۹۹۸) انجام گرفت.آن ها دریافتند که نانو ذرات نقره اثر ضد میکروبی بر روی باکتری هایی مثل اشریشیا کلی دارند (۲۳)، و علت این فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات نقره را احتمال می دهند وابسته به یون

Archive of SID

www.SID.ir

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(۲۴). این کار در سال ۲۰۰۴ توسط Sondi و همکارانش در کرواسی و پس از آن توسط Feng و همکارانش در سال ۲۰۰۵ بر روی اشریشیا کلی به عنوان یک باکتری گرم منفی تکرار 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 می باشند 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 دارد (۲۵).

در سال ۲۰۰۹ Nilda vanesa و همکارانش توانستند باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را با استفاده از نانو ذرات نقره مهار نمایند. آن ها ثابت کردند فلز نقره در حالت نانو بودن اثر ضد میکروبی می تواند داشته باشد. که این نتایج با مطالعه ما مطابقت دارد (۲۶). Aruna Jyothi Kora در سال ۲۰۱۱خواص ضد باکتریایی نانو ذرات نقره بر روی باکتری مقاوم سودوموناس آئروژینوزا بررسی و نتایج ضد باکتریایی نانوذرات نقره گزارش نمود، این نتایج با بررسی هایی که بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی و مدل حیوانی انجام گرفته شد، مطابقت دارد(۲۷) . 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 ۲۰۱۰ در هندوستان با نانوذرات نقره بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا انجام شده است، کاملاً مطابقت دارد (۲۸). نتایج این پژوهش مشخص نمود که کمترین MIC غلظت نانو با اثر ضد باکتری غلظت ۶/۲ ppm برای استافیلو کوکوس اورئوس و بیشترین آن غلظت ۱۲/۵ ppmبرای سالمونلا تیفی موریوم به دست آمد که با نتایج حاصل از مطالعه کیم و همکارانش در سال ۲۰۰۷ 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 (۲۹).

در سال های اخیر تحقیقات مشابهی توسط Jun Sung Kim و همکارانش بر روی باکتری‌هایی مثل E.coli، استافیلوکوکوس اورئوس و حتی مخمرها انجام گردیده است که همگی اثر آنتی میکروبی نانوذرات نقره را تایید کرده اند و بیان نمودند نانو ذرات نقره می تواند با اتصال به گروه های سولفید که منجر به دناتوراسیون پروتئین و کاهش باند های دی سولفیدی شود(۳۰)، علاوه بر این نانو ذرات نقره می‌تواند با 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 شود. بنابراین نانو ذرات نقره نمی تواند 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 شود 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 ونهایتاً منجر به مرگ باکتری می گردد(۳۲،۳۱).

Humberto و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در مکزیک اثر مهاری نانودرات نقره را بر روی باکتری هایی که مقاومت های دارویی زیادی از

Archive of SID
www.SID.ir

خـود نشـان مـی دهنـد مثـل بـاکتری هـای سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلـی مقـاوم بـه آمپی سیلین، اسـترپتوکوکوس پـایوژنز مقـاوم بـه اریترومایسین را نشان دادند آن ها مشاهده کردند که نانوذرات نقره اثر باکتریوستاتیک قابل ملاحظه ای بر روی این بـاکتری هـا دارنـد. Morones و همکارانش در سال ۲۰۰۵، اثرات آنتـی باکتریـال نانو ذرات نقره را علیه باکتری هـای گـرم منفـی E.coli، ویبریو کلـرا، سـودوموناس آئروژینـوزا و سالمونلا تیفی را ثابت نمودند و اظهار داشتند کـه نانوذرات نقره بـه سـطح غشـای سـلول بـاکتری متصل می شوند و پـس از آن بـه درون بـاکتری نفوذ نموده و با رها سازی یون ها خاصـیت آنتـی میکروبی خود را نشان می دهند (۳۳).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج بررسی های شرایط آزمایشگاهی و مـدل حیـوانی نشـان دادنـد کـه عصـاره هـای استخراج شده از گیاه دارویی پنیرک دارای فعالیت ضد میکروبی علیـه اسـتاف اورئـوس و سـالمونلا تیفی موریوم می باشند و لذا می تواننـد در تولیـد داروهای گیاهی جدید با کمترین عوارض جـانبی و به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک های رایج علیه باکتری های فوق بکار برده شوند.

References

۱) ادیب فر، پ، ۱۳۷۱، میکـروب شناسـی پزشـکی، چـاپ سوم، انتشارات آییژ، تهران، ص ص: ۴۸۴-۴۶۱.

2) Orrt, F.A.,,Land, M. (2006). Meteicillin resistant *Staphylococus aureus* prevalence: current susceptibility patterns in Trinidad. BMC Infect Dis, 6;83.

3) Peter Borriello, S., Murray, P..R., Funke, G.D. (2006), *Microbiology and Micl Infections in Topley & Wilson*, London U.K., pp;1399.

4 Seyyed Mansour Seyyednejad, Haniyeh Koochak, Esmaeil Darabpour, Hossein Motamedi. A survey on *Hibiscus rosa–sinensis*, Alcea rosea L. and Malva neglecta Wallr as antibacterial agents. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. Volume 3, Issue 5, May 2010, Pages 351–355.

5) Richardson, F. Richardson, R. and shepherd. (2006). weeds of the South East: An Identification Gahde for Australia. R.J. Richadson and F. Richadson Meredith Victoria.

6)Elechiguerra, j, Burt, J., Morones, JR. Interaction of silver nanoparticles with HIV-I, Jornal of Nanobiotechnology. 2005, 3:6 doi:10.1186/1477-3155-3-6.

7) Wijnhoven, S.W.P., Peijnenburg, W.J.G.M., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Oomen, A.G., Heugens, E.H.W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., van de Meent, D., de Jong, W.H., van Zijverden, M., Sips, A.J.A.M., Geertsma, R.E.Nanosilver – a review of available data and knowledge gaps in human andenvironmental risk assessment, Nanotoxicology. 2009, 3(2)P: 109-138.

8) Sondi, B. S. Sondi, J. Colloid. Interface. Sci. 2004,P: 177-275.

9) Chambers, H. F. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev. 10: 781–791.

10)Livermore, D. M. 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. Int. J. Anti microb. Agent 16:3–10.

11) Sattari, M. Shahbazi, N. Najar Peeryeh, S. (2006). An assessment of antibacterial effect of alcoholic and aquatic extracts of Eucalyptus leaves on *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Sci, 8(5); 19-23. (Full text in Persian)

12) Igbal, A. Beg, A.Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. J Ethnopharmacol, 74(2); 113-123.

13) Mohsen Nezhad, F. Zeighami, H.

Archive of SID
www.SID.ir

Mota, A. Sattari, M. Yadegar, A. (2009) Antibacerial activity of Eucalyptus extracts on methicillin resistance Staphylococcus aureus. Res J Biol Sci, 4(8); 905-908.

14)Trujillano-Martin, I. García-Sanchez, E. Martinez, I.M. Fresnadillo, M.J.Garcia-Sanchez, J.E. García-Rodraguez, J.A. (1999) In vitro activities of five new antimicrobial agents againts *Brucella melitensis*. Int J Antimicrob Agent, 12(2); 185-186.

15) Naeini, A. Khosravi, A. Tadjbakhsh, H. Ghazanfari, T. Yaraee, R. Shokri, H. (2010) Evaluation of the immunostimulatory activity of *Ziziphora tenuior* extracts. Comp Clin Pathol19(5); 459-463.

16) Oort, F.A., Land, M. (2006). Meteicillin resistant *Staphylococus aureus* prevalence: current susceptibility patterns in Trinidad. BMC Infect Dis, 6;83.

17) White, P.L., Naugle,,A.L., Jackson, C.R., Fedorka, P.J.,,Rose, B.E., Pritchart, K.M., ,et al. (2007). *Salmonella enteritidis* in meat,Poultry, and paseurized egg products regulated by the U.S. Food Safety and Inspection Service,1998 through 2003. J Food Protec, 70(3);582-592.

18) Lawson, L.D. (1998). Phytomedicines of Europe: Their Chemistry and Biological activity, Am, Chemi. Soci. Washing. DC. Pub

19)Rosario Rojas, Beatriz Bustamante, jose bauer,Irma Fernadez, Joaquina, Olgo Lock.(2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants, Journal of Ethnopharmacology, 88; 199–204.

20)Dulger, B,Gonuz. (2004). Antimicrobia Activity of Certain Plants Uesd in Turkish Traditonal Medicine,asian Journal of Plant Sciencat, 3(1);104-107.

21) Shahidi Bonjar. (2004). Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran, Journal of Ethnopharmacology, 94; 301–305.

22) Shale, T.L., Stirk, W.A., Staden, J. (2005). Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds, Journal of Ethnopharmacology, 96; 325–330.

23)Catalina, M.J., Eric, M.V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implication for human health and the environment. J Nanopart Res, 12; 1531-1551.

24) Li, Y., Leung, P., Yao, L., Song, Q.W., Newton, E. (2006). Antimicrobial effectof surgical masks coated with nanoparticles. J Hosp Infect, 62; 58–63.

25) Ivan, S., Branka, S.S. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science, 275; 177-182.

26) Nilda Vanesa Ayala-Núñez, Humberto H. Lara Villegas, Liliana del Carmen Ixtepan Turrent and Cristina Rodríguez Padilla(2009). Silver Nanoparticles Toxicity and Bacterial Effect Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Nanobiotechnol, 5; 2-9.

27) Aruna, J. K., Arunachalam, j (2011). Assessment of Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its Mechanism of Action. World J Microbiol Biotechnol, P; 1209-1216.

28) Kora, A.J., and Arunachalam, J. (2010). Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles *on Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action. World J Microbiol Biotechnol. , 4(8): 905-908.

29) Kim, J.S., Kuk, E., Nam, Y.K., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J. and et al. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine:

Archive of SID
www.SID.ir

Nanotechnology, Biology, and Medicine, 3; 95–101.

30) McDonnell, G.E. (2007). Chemical Disinfection. In and: Antisepsis, disinfection,and sterilization, 111–5.

31). Lok, C.N., Ho, C.M., Chen, R., He, Q.Y., Yu, W.Y., Sun, H., et al. (2006). Proteomic nalysis of the mode of antibacterial action of Silver nanoparticles. J Proteome Res, 5; 916–24.

32) Sondi, I., Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobialagent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sci, 275; 177–82.

33) Hmberto, H. L., Nilda, V. (2010). Ayala. Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles against multidrug-resistant Bacteria. World J Microbiol Biotechnol, 26; 615-621.

Archive of SID

www.SID.ir