

بررسی تأثیر نانوذله کیتوزان و اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Menthapiperita*) بر ایزوله های

بالینی اسینتوباکتر بومانی در شرایط In-vitro

سمیه دلفانی^۱، مرضیه رشیدی پور^۲، فرانک رضایی^۱، پگاه شکیب^{۳*}

۱- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات بهداشت تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

یافته / دوره ۲۳ / شماره ۵ / زمستان ۱۴۰۰ / مسلسل ۹۰

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۳/۱۱ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۶/۱۰

مقدمه: یکی از مهمترین مشکلات سیستم های بهداشت و درمان، افزایش شیوع عفونت های باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک ها است. امروزه استفاده از مواد طبیعی از جمله اسانس های گیاهی دارای خواص ضد میکروبی بعنوان جایگزین آنتی بیوتیک ها روبه افزایش است. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر نانوذله حاوی کیتوزان و اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Menthapiperita*) بر ایزوله های بالینی اسینتوباکتر بومانی در شرایط In-vitro می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی از بیمارستانهای منتخب شهرستان خرم آباد جداسازی و تعیین هویت شدند. پس از تهیه نانوذله حاوی کیتوزان و اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Menthapiperita*)، حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) نانوذله بر روی ایزوله های اسینتوباکتر بومانی با روش میکروبراث دایلووشن در پلیت ۹۶ خانه بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین شدند.

یافته ها: میانگین حداقل غلظت مهارکنندگی نانو ذره بدون اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی، نانوذره حاوی گیاه دارویی نعناع فلفلی و آنتی بیوتیک جنتامایسین به ترتیب 496 ± 47 ، 301 ± 48 و 78 ± 25 بود. که نشانه دهنده حساسیت بالای سوبه های مورد مطالعه نسبت به جنتامایسین در مقایسه با دو گروه دیگر ($P \leq 0/001$) و کارایی مؤثرتر نانوذره حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی در مهار رشد سوبه های سینتو باکتر بومانی در مقایسه با نانوذره بدون اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی می باشد ($P \leq 0/001$).

بحث و نتیجه گیری: نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان دهنده توانایی مؤثر نانوذله حاوی کیتوزان و اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی در مقایسه با نانوذره بدون اسانس (*Menthapiperita*) برای بازدارندگی رشد ایزوله های اسینتوباکتر بومانی می باشد.

واژه های کلیدی: نانوذله، اسانس نعناع فلفلی، اسینتوباکتر بومانی، کیتوزان.

*آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی.

پست الکترونیک: shakib.pegah@yahoo.com

مقدمه

جنس اسینتوباکتر اولین بار در سال ۱۹۱۱ توسط Beijerinck به عنوان کوکوباسیل های گرم منفی، هوازی، اکسیداز منفی و غیر متحرک معرفی شد (۱). اسینتوباکترها فرصت طلب بوده و سریعاً با محیط بیمارستان سازش یافته و در بسیاری از تحقیقات به عنوان دومین عامل جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان ها بعد از سودوموناس آئروژینوزا گزارش شده اند. بنابراین امروزه درگیری با عفونت های ناشی از اسینتوباکترها یکی از معضلات بهداشت و درمان محسوب می شود (۲). از جمله مهمترین گونه های اسینتوباکتر می توان به اسینتوباکتر بومانی اشاره کرد که باعث بیماری هایی از جمله عفونت ادراری، پنومونی، اندوکاردیت، سپتی سمی و مننژیت می شود (۳). توانایی زنده ماندن در محیط های زنده و غیرزنده با توانایی بالا در تشکیل بیوفیلم سبب شیوع بیشتر عفونت های ناشی از این باکتری شده است (۴،۵). همچنین ظهور سویه های مقاوم به چند دارو (Multi Drug Resistant (MDR یعنی سویه هایی از اسینتوباکتر بومانی که به سه کلاس آنتی بیوتیکی رایج مقاوم هستند و سویه هایی از اسینتوباکتر بومانی که به تمام کلاس های آنتی بیوتیکی مقاوم هستند بجز دو گروه، Extensive Drug Resistant (XDR) و Resistant مشکلات متعددی در خصوص درمان عفونت های ناشی از این باکتریها از جمله طولانی شدن مدت بستری، افزایش هزینه ها و در نهایت مرگ و میر بیماران ایجاد کرده است (۶).

افزایش میزان مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتریها و عوارض جانبی استفاده از آنتی بیوتیک ها سبب شده که تحقیقات زمینه بررسی تأثیرات عصاره های گیاهی بر عفونت های مختلف به عنوان جایگزینی برای آنتی بیوتیک ها بیش از گذشته مورد توجه قرار بگیرد. اگرچه استفاده از گیاهان از زمان های دور برای درمان بسیاری از بیماری ها مرسوم بوده ولی امروزه با انجام بسیاری از پروژه های تحقیقاتی تأثیرات

این عصاره های گیاهی بر بسیاری از بیماری ها به اثبات رسیده است (۷،۸).

گیاه نعناع فلفلی با نام علمی *Menthe piperita* L. یکی از مهم ترین گیاهان دارویی متعلق به خانواده *lamiaceae* است (۹). این گونه گیاهی در واقع هیبریدی از *Mentha aquatic* و *Mentha spicata* است (۱۰). از اسانس، برگ و اجزای مختلف این گیاه بعنوان داروی گیاهی استفاده می شود. همچنین در صنایع آرایشی، بهداشتی و غذایی مورد استفاده قرار می گیرد. از این رو اسانس نعناع فلفلی از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار است (۱۱). نعناع فلفلی دارای خواص ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد حشره و آنتی اکسیدانی می باشد (۹،۱۲). در مطالعات قبلی خواص ضدباکتریایی این گیاه علیه استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا و اشریشیاکلی و خواص ضد قارچی علیه کاندیدا آلبیکنس به اثبات رسیده است (۱۳-۱۵). نانوذرات نیز دارای خاصیت ضد میکروبی قوی هستند و در بسیاری از تحقیقات مورد توجه قرار گرفته اند. در مطالعه اشرفی و همکاران خواص ضد بیوفیلم نانوذره سنتز شده با اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی تأثیر بسیار مؤثری در مهار رشد سویه های استریپتوکوکوس موتانس را نشان داد (۱۶). بنابراین با توجه به خاصیت ضد میکروبی این اسانس اهمیت افزایش سویه های مقاوم به درمان اسینتوباکتر بومانی، در مطالعه حاضر تأثیر این نانوذله حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Menthapiperita*) بر ایزوله های بالینی اسینتوباکتر بومانی جدا شده از بیمارستان های خرم آباد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جامعه مورد مطالعه

در این مطالعه مقطعی جامعه مورد بررسی، ایزوله های اسینتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان های منتخب شهرستان خرم آباد می باشد که در بازه زمانی یک ساله اردیبهشت ۱۳۹۶ تا اردیبهشت

استفاده از توئین به عنوان امولسیفایر، (۷) بارگذاری و کپسوله شدن دارو روی سطح سوبسترا بود (۱۸).

تعیین MIC (Minimum Inhibitory concentration)

به منظور تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) نانوذله بر روی سویه های اسپینتوباکتر بومانی از روش میکروبراث دایلووشن در پلیت ۹۶ خانه استریل و بر اساس دستورالعمل CLSI استفاده شد. در مطالعه حاضر خاصیت ضد باکتریایی نانوذله در غلظت های ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا محلول ذخیره از نانوذله همراه با حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) ۱۰ درصد و محیط کشت استریل مولر هینتون براث (مرک آلمان) با غلظت (۴۰۰ μg/ml) تهیه شد. سپس به ردیف های سوم تا دوازدهم ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث استریل اضافه شد. از محلول ذخیره ساخته شده ۱۰۰ میکرولیتر به ردیف های یک و دو اضافه کرده و عمل رقیق سازی از ردیف دوم تا دهم انجام شد. به این شکل که از ردیف دوم ۵۰ میکرولیتر به ردیف سوم و از ردیف سوم ۵۰ میکرولیتر به ردیف چهارم و تا ردیف دهم به همین شکل رقیق سازی (سریال رقت ها در جدول نشان داده شده است) انجام شد. در نهایت از کشت ۲۴ ساعته میکروارگانیسم مورد نظر به میزان ۵۰ میکرولیتر معادل کدورت نیم مک فارلند CFU/ml $10^8 \times 1/5$ (با خوانش جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر) به ردیف های دو تا ده اضافه شد چاهک اول به عنوان شاهد محیط کشت و نمونه در نظر گرفته شده است. پلیت ها برای مدت زمان ۲۴ ساعت در دستگاه انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس از نمک ۲ و ۳ و ۵- تری فیل تترازولیوم کلرید به منظور شاخص بصری برای رشد باکتری ها استفاده شد. چاهک های فاقد رنگ به عنوان MIC گزارش شدند. برای کنترل منفی از حلال DMSO و برای کنترل مثبت از

۱۳۹۷ جدا شدند. این ایزوله های بالینی اسپینتوباکتر در مطالعات قبلی پس از جداسازی با تست های استاندارد میکروب شناسی از جمله رنگ آمیزی گرم (کوکوباسیل گرم منفی)، بررسی آنزیم اکسیداز (منفی)، کاتالاز (مثبت)، مصرف قندها (مصرف گلوکز و لاکتوز)، اندول (منفی)، حرکت (منفی)، اکسیداسیون/تخمیر (اکسیداتیو گلوکز)، مصرف سیترات (مثبت)، و رشد در دمای ۴۴ درجه سانتی گراد تأیید شدند. سپس برای تأیید گونه اسپینتوباکتر بومانی از تکثیر ژن bla-OXA51 با استفاده از روش مولکولی PCR استفاده شد. همچنین در مطالعات قبلی بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی این سویه با روش دیسک دیفیوژن نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، جنتامیسین (۱۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۷۵ میکروگرم)، پلی میکسین (PB 300) ، از ترونام (۳۰ میکروگرم)، تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، تورامایسین (۱۰ میکروگرم)، و سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) تهیه شده از شرکت Rosco Diagnostica مورد بررسی قرار گرفتند (۱۷).

تهیه نانوذله

سنتز نانوذله حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (Menthapiperita) و کیتوزان که در طرح های قبلی انجام شده بود به طور خلاصه شامل این مراحل می باشد (۱). تهیه اسانس آبی از گیاه نعناع فلفلی به روش تقطیر، (۲) شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس با استفاده از کروماتوگرافی گازی کوپل شده با طیف سنج جرمی، (۳) تهیه محلول های جداگانه ای از کیتوزان و تری پلی فسفات با درصدهای مختلف، (۴) اضافه کردن محلول حاوی اسانس به صورت آهسته به محلول کیتوزان در حال استریل شدن، (۵) سانتیفریوژن کردن در دور پایین و جدا کردن محلول رویی حاوی نانوذله از فاز ته نشین شده، (۶)

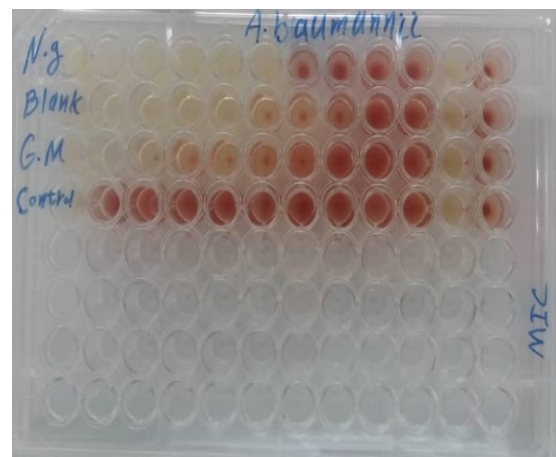
(Menthapiperita) بر ایزوله های بالینی اسپینتوباکتر بومانی و مقایسه آن با کنترل مثبت و منفی بر روی تمام سویه های مورد مطالعه از تست Wilcoxon signed ranks استفاده شد. در ضمن برای مقایسه تأثیر این مواد بر روی سویه های MDR و XDR از تست Mann-whitney U استفاده شد. $P \leq 0/05$ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از سنجش میزان حداقل غلظت بازدارندگی

نتایج حاصل از فعالیت ضد میکروبی نانوذله حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (Menthapiperita) بر ۳۳ ایزوله بالینی اسپینتوباکتر بومانی در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که در جدول مشاهده می کنید کمترین و بیشترین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتری (MIC) نانوذله حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (Menthapiperita) در میان ایزوله های اسپینتوباکتر بومانی مورد بررسی بترتیب برابر $3/12$ و $800 \leq$ میکروگرم بر میلی لیتر بود. میانگین حداقل غلظت مهار کنندگی نانو ذره بدون اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی، نانوذره حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی و آنتی بیوتیک جنتامیسین 47 ± 496 ، 48 ± 301 و 25 ± 78 بود (نمودار A). که بیانگر حساسیت بالای سویه های مورد مطالعه نسبت به جنتامیسین در مقایسه با دو گروه دیگر ($P \leq 0/001$) و همچنین کارایی مؤثرتر نانوذره حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی در مهار رشد سویه های اسپینتو باکتر بومانی در مقایسه با نانوذره بدون اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی باشد ($P \leq 0/001$).

آنتی بیوتیک جنتامیسین (آنتی بیوتیک وسیع الطیف که در درمان انتخابی بسیاری از گرم منفی ها نظیر سودوموناس و اسپینتوباکتر درمان انتخابی است) با غلظت های (۷۸-۲۰۰) میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد (شکل ۱) (۱۹). در این مطالعه دسترسی به ایزوله استاندارد نداشتیم. در مطالعه ای جدا گانه که نتایج آن در دست انتشار است میزان اثرات ضد جهشی نانوذله توسط آزمون ایمز بررسی شده است.



شکل ۱. تصویر میکروتیتربلیت ۹۶ خانه در تکنیک میکروداپلوشن، اولین چاهک مشاهده شده بدون رنگ به عنوان MIC گزارش شده است.

*ردیف اول: نانوذله حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (Menthapiperita).
ردیف دوم: بلانک (نانوذرات کیتوزان)،
ردیف سوم: آنتی بیوتیک جنتامیسین، ردیف چهارم: کنترل (DMSO)

تجزیه و تحلیل اطلاعات و روش های آماری

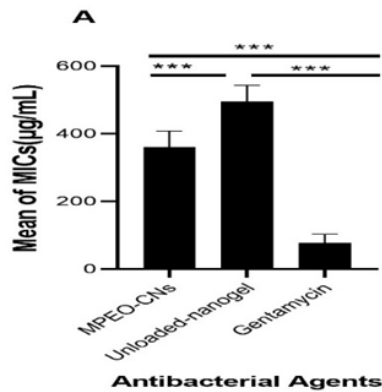
به منظور بررسی توزیع داده ها از آزمون one-sample Kolmogorov-smirnov test استفاده شد. از آنجایی که توزیع داده ها نرمال نبود، به منظور ارزیابی تأثیر ضد باکتریایی نانوذله حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی

جدول ۱. فعالیت ضد باکتریایی نانوذله حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (MIC بر حسب $\mu\text{g}/\text{ml}$)

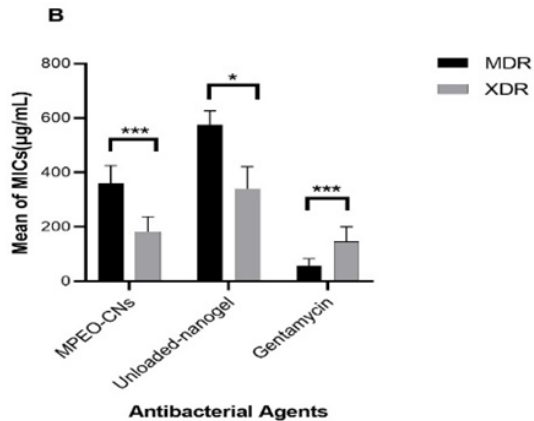
	No. of isolates with the indicated MIC range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)									
	MPEO-CNs	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰
unloaded-nanogel	0	0	0	0	0	4	0	3	13	13
Gentamycin	3	9	3	4	0	4	1	1	3	5
		0/۷۵	۱/۵۶	۳/۱۲	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۲۰۰	>400

* MPEO-CNs: Mentha piperita essential oils loaded in a chitosan nanogel

فلفلی ($P \leq 0/05$) و نانوذره حاوی اسانس فلفلی ($0/001$)، برای سویه های MDR به طور معنی داری بیشتر از سویه XDR بوده است. در حالی که میانگین حداقل غلظت مهار کنندگی جنتامایسین برای سویه های MDR کمتر از سویه های XDR بوده است ($P \leq 0/001$).



نتایج حاصل از تست الگوی حساسیت آنتی بیوتیک در مطالعات قبلی نشان داد که از ۳۳ ایزوله اسپینتوباکتر بومانی ۲۲ سویه مقاومت دارویی چند گانه MDR و ۱۱ سویه مقاومت XDR داشتند. با توجه به نمودار B میانگین حداقل غلظت مهار کنندگی نانو ذره بدون اسانس نعن



نمودار A. میانگین حداقل غلظت مهار کنندگی نانو ذره بدون اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (Unloaded-nanogel)، نانوذره حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (MPEO-CNs) و آنتی بیوتیک جنتامایسین برای همه سویه های مورد مطالعه. نمودار B: مقایسه میانگین حداقل غلظت مهار کنندگی MPEO-CNs، Unloaded-nanogel و آنتی بیوتیک جنتامایسین در میان سویه های MDR و سویه XDR

گیاهی بر اندازه نانو ذرات مؤثر است (۲۵،۲۶). از طرفی از گذشته های دور در طب سنتی از گیاهان برای درمان بسیاری از بیماریها استفاده می شد از جمله این گیاهان می توان به نعناع فلفلی اشاره کرد که بخاطر داشتن فلاونوئیدها، کارتنوئیدها، ویتامین ها و سایر ترکیبات موجود خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی قوی دارد (۲۷).

در بررسی تأثیر نانوژل حاوی اسانس نعناع فلفلی بر استرپتوکوکوس موتانس توسط اشرفی و همکاران مشخص شد که نانوژل از تشکیل بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس جلوگیری می کند، مطالعه حاضر با الهام از این مطالعه انجام شد (۱۶). در این تحقیق تأثیر نانوژل حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (Menthapiperita) بر ایزوله های بالینی اسپینتوباکتر بومانی بررسی شد با توجه به داده های حاصل از میزان MIC ایزوله های مورد بررسی، نتایج گویای فعالیت ضد باکتریایی نانوژل حاوی اسانس نعناع فلفلی بر ایزوله های بالینی اسپینتوباکتر بومانی در غلظت های مختلف بود، کمترین غلظت مهار کنندگی رشد

بحث و نتیجه گیری

امروزه ایزوله های اسپینتوباکتر بومانی به اغلب خانواده های مختلف آنتی بیوتیکی با مکانیسم های متنوع مقاوم می باشند (۲۰-۲۲). به همین دلیل یافتن عوامل مؤثر برای مقابله با عفونت ناشی از اسپینتوباکتر بومانی مورد توجه قرار گرفته است. از جمله عوامل مؤثر برای مقابله با این عفونت ها اسانس گیاهان و نانوذرات هستند. یکی از روش های سنتز نانوذرات، سنتز سبز است که امروزه مورد استقبال محققین قرار گرفته است زیرا در سنتز سبز از گیاهان به علت سازگاری محیطی، طبیعی بودن و هزینه پایین تر نسبت به سنتزهای فیزیکی و شیمیایی استفاده می شود (۲۳،۲۴). تخریب دیواره سلولی و تداخل در سنتز پروتئین از جمله مکانیسم های اصلی تأثیر نانوذرات بر عوامل میکروبی محسوب می شود. اندازه و غلظت نانوذرات عوامل مهم در فعالیت ضد میکروبی نانوذرات هستند نوسانات دما، pH و غلظت های مختلف بر هم کنش محلول نمکی و عصاره

جنتامایسین در مهار رشد سویه های اسینتوباکتر بومانی موثرتر است، ولی با توجه به بحث مقاومت آنتی بیوتیکی رو به افزایش این سویه‌ها و اینکه تهیه نانوذره اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی سنتز شده با روش سبز، کم هزینه، کم‌خطر و دارای اثر مهاری بر عوامل باکتریایی است، می‌تواند بعنوان یک گزینه مناسب جایگزین آنتی بیوتیک‌ها در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

از محدودیت‌های این طرح به عدم دسترسی به بسیاری از اطلاعات بیماران مانند وضعیت بیماران از نظر بیماری زمینه، داروهای مصرفی می‌توان اشاره کرد. بر اساس یافته‌های این تحقیق نانوژل حاوی اسانس نعناع فلفلی موجب مهار رشد ایزوله‌های بالینی اسینتوباکتر بومانی شد. بنابراین می‌توان این تحقیق را پیش زمینه‌ای برای مطالعات بعدی در نظر گرفت. بطوری که پس از بررسی عدم تأثیر سمی بر سلول‌های یوکاریوت و سنجش فعالیت ضد میکروبی نانوذره فوق‌علیه سایر باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت از نانوذره سنتز شده برای جلوگیری از فعالیت باکتریهای عامل عفونت استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کد اخلاق IR.LUMS.REC.1398.192 مورد تأیید دانشگاه علوم پزشکی لرستان بود و بدین وسیله کلیه نویسندگان از پرسنل مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان کمال تشکر را دارند.

باکتری (MIC) نانوژل حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Menthapiperita*) در میان ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی مورد بررسی برابر ۳/۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد. میانگین حداقل غلظت مهار کنندگی نانوذره بدون اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی در مقایسه با نانوذره حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی به ترتیب ۴۷ ± ۴۹۶ و ۴۸ ± ۳۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر بود که کارایی مؤثرتر نانوذره حاوی اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی در مهار رشد سویه‌های اسینتو باکتر بومانی در مقایسه با نانوذره بدون اسانس گیاه دارویی نعناع فلفلی را نشان می‌دهد.

در بررسی تأثیر نانوذره اکسید روی بر ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به کاربایم توسط علیکاهی و همکارانش مشخص شد که ایزوله‌های مورد بررسی به نانوذره اکسید روی حساس بوده و نانوذره اکسید روی در غلظت‌های مختلف باعث مهار رشد باکتریها می‌شود. در این مطالعه بیشترین حساسیت سویه‌ها به نانوذره در غلظت ۴۹۶ میکروگرم بر میلی لیتر و کمترین حساسیت در غلظت میکروگرم بر میلی لیتر ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است (۲۸). در بررسی تأثیر نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاه تلخه بر افلاکس پمپ در اسینتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های بالینی توسط بهداد و همکارانش نشان داد که از ۲۱ ایزوله اسینتوباکتر بومانی مورد بررسی پس از تیمار با نانوذره سنتز شده تنها ۱۲ ایزوله افلاکس پمپ فعال داشت. بنابراین اثر ضد افلاکس پمپ نانوذره سنتز شده در این تحقیق تأیید شد (۲۹). همچنین فعالیت ضد میکروبی نانوذرات دیگر از جمله نانوذره نقره سنتز شده با گیاه *Neurada procumbens*، نانوذره نقره سنتز شده با *Eucalyptus critriodora* علیه ایزوله‌های اسینتوباکتر بومانی گزارش شده است (۳۰، ۳۱).

بنابراین با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر و مطالعات گذشته اگرچه هنوز کارایی آنتی‌بیوتیک

References

1. Beijerinck M. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. Versl. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam. 1911;19:1092-103.
2. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. J Glob Infect Dis. 2010;2(3):263.
3. Irfan S, Turton J, Mehraj J, Siddiqui S, Haider S, Zafar A, et al. Molecular and epidemiological characterisation of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from public and private sector intensive care units in Karachi, Pakistan. J Hosp Infect.. 2011;78(2):143-8.
4. Nasrolahei M, Zahedi B, Bahador A, Saghi H, Kholdi S, Jalalvand N, et al. Distribution of bla OXA-23, IS Aba, Aminoglycosides resistant genes among burned & ICU patients in Tehran and Sari, Iran. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2014;13(1):1-4.
5. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002;15(2):167-93.
6. Singh H, Thangaraju P, Chakrabarti A. *Acinetobacter baumannii*: A Brief Account of Mechanisms of Multidrug Resistance and Current and Future Therapeutic Management. J Clin Diagn Res . 2013; 7(11):2602-5.
7. Pitarokili D, Couladis M, Petsikos-Panayotarou N, Tzakou O. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. J Agric Food Chem. 2002;50(23):6688-91.
8. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 2003;10(10):813-29.
9. De Sousa AAS, Soares PMG, de Almeida ANS, Maia AR, de Souza EP, Assreuy AMS. Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. J Ethnopharmacol. 2010;130(2):433-6.
10. Peirce A. American pharmaceutical association practical guide to natural medicines: Morrow; 1999. 1st Edition.
11. Tarhan S, Telci İ, Tuncay MT, Polatci H. Product quality and energy consumption when drying peppermint by rotary drum dryer. Ind Crops Prod. 2010;32(3):420-7.
12. Singh R, Shushni MA, Belkheir A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. Arab J Chem.. 2015;8(3):322-8.
13. Andoğan BC, Baydar H, Kaya S, Demirci M, Özbaşar D, Mumcu E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. Arch Pharm Res. 2002;25(6):860-4.
14. Saharkhiz MJ, Motamedi M, Zomorodian K, Pakshir K, Miri R, Hemyari K. Chemical composition, antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. ISRN Pharm.. 2012; 2012: 718645
15. Tassou C, Drosinos E, Nychas G. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4

- and 10 C. J Appl Microbiol. 1995;78(6):593-600.
16. Ashrafi B, Rashidipour M, Marzban A, Soroush S, Azadpour M, Delfani S, et al. Mentha piperita essential oils loaded in a chitosan nanogel with inhibitory effect on biofilm formation against *S. mutans* on the dental surface. Carbohydr Polym. 2019;212:142-9.
 17. Babaie Z, Delfani S, Rezaei F, Norolahi F, Mahdian S, Shakib P. Molecular Detection of Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Isolated From Patients in Khorramabad City, Iran. Infect Disord. Drug Targets. 2020;20(4):543-549.
 18. Keawchaon L, Yoksan R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. Colloid Surface B. 2011; 84(1), 163–171.
 19. Zhou T, Xiao C, Fan J, Chen S, Shen J, Wu W, et al. A nanogel of on-site tunable pH-response for efficient anticancer drug delivery. Acta biomater. 2013;9(1):4546-57.
 20. Al Bshabshe A, Joseph MR, Al Hussein A, Haimour W, Hamid ME. Multidrug resistance *Acinetobacter* species at the intensive care unit, Aseer Central Hospital, Saudi Arabia: a one year analysis. Asian Pac J Trop Med. 2016;9(9):903-8.
 21. Teerawattanapong N, Panich P, Kulpokin D, Ranong SN, Kongpakwattana K, Saksinanon A, et al. A systematic review of the burden of multidrug-resistant healthcare-associated infections among intensive care unit patients in Southeast Asia: the rise of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Infect Control Hosp Epidemiol. 2018;39(5):525-33.
 22. Qin H, Lo NW-S, Loo JF-C, Lin X, Yim AK-Y, Tsui SK-W, et al. Comparative transcriptomics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in response to antibiotic treatments. Sci. Rep. 2018;8(1):1-11.
 23. Singh A, Singh Ná, Afzal S, Singh T, Hussain I. Zinc oxide nanoparticles: a review of their biological synthesis, antimicrobial activity, uptake, translocation and biotransformation in plants. J Mater Sci. 2018;53(1):185-201.
 24. Roy A, Bulut O, Some S, Mandal AK, Yilmaz MD. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. RSC advances. 2019;9(5):2673-702.
 25. Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Povey M, York D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). J Nanopart Res. 2007;9(3):479-89.
 26. Irvani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. Green Chem. 2011;13(10):2638-50.
 27. Ahdolmaleki A, Rajabi A, Sanginabadi F. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of aqueous extract of peppermint (*Mentha piperita*). Sci J Kurd Univ Med Sci. 2013;18(1). (In Persian)
 28. Alikahi M, Noorbakhsh F, Mahdavi M. The effect of thyme essential oil and zinc oxide nanoparticles on *Acinetobacter baumannii*

- with multidrug resistance. Iran J Biologic Sci. 2019; 14 (1): 55-63.(In Persian)
29. Behdad R, Mirzaie A, Zare Karizi S. Green synthesis of silver nanoparticle using *Acroptilon repens* extract and evaluation of its anti-efflux activity against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J Microb World. 2017;10(3):210-21.
30. Alharbi FA, Alarfaj AA. Green synthesis of silver nanoparticles from *Neurada procumbens* and its antibacterial activity against multi-drug resistant microbial pathogens. J King Saud Univ Sci. 2020;32(2):1346-52.
31. Wintachai P, Paosen S, Yupanqui CT, Voravuthikunchai SP. Silver nanoparticles synthesized with *Eucalyptus critriodora* ethanol leaf extract stimulate antibacterial activity against clinically multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from pneumonia patients. Microb Pathog. 2019;126:245-57.

The effect of chitosan nanogel and essential oil of peppermint (Menthapiperita) on clinical isolates of Acinetobacter baumannii in-vitro

Delfani S¹, Rashidipour M², Rezaei F¹, Shakib P^{3*}

1. Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

2. Assistant Professor, Nutritional Health Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

3. Assistant Professor, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran, shakib.pegah@yahoo.com

Received: 11 Jun 2021

Accepted: 1 Sep 2021

Abstract

Background: One of the most important problems of health care systems is the increasing prevalence of antibiotic-resistant bacterial infections. Today, the use of natural substances such as plant essential oils with antimicrobial properties as an alternative to antibiotics is increasing. The aim of this study was to evaluate the effect of chitosan nanogels containing essential oil of peppermint (Menthapiperita) on clinical isolates of Acinetobacter baumannii in in vitro.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, Acinetobacter baumannii were isolated from selected hospitals in Khorramabad. After preparing nanogels containing peppermint essential oil (Menthapiperita), the minimum inhibitory concentration (MIC) of chitosan nanogels on Acinetobacter baumannii isolates was determined by micro broth dilution method in plate 96 wells according to CLSI instructions.

Results: The mean minimum inhibitory concentrations (MIC) of nanoparticles without essential oil of peppermint, nanoparticles containing peppermint and gentamicin were 47 ± 496 , 48 ± 301 , and 25 ± 25 , respectively. Indications of high sensitivity of the studied strains to gentamicin in comparison with the other two groups ($P \leq 0.001$) and more effective performance of Menthapiperita in MIC of Acinetobacter baumannii strains compared to nanoparticles without peppermint essential oil ($P \leq 0.001$).

Conclusion: The results of the present study indicate the effective ability of chitosan nanogels containing peppermint essential oil in comparison with non-essential nanoparticles (Menthapiperita) to inhibit the growth of Acinetobacter baumannii isolates.

Keywords: Nanogel, Essential oil of Mentha piperita, Acinetobacter baumannii, chitosan

***Citation:** Delfani S, Rashidipour M, Rezaei F, Shakib P. The effect of chitosan nanogel and essential oil of peppermint (Menthapiperita) on clinical isolates of Acinetobacter baumannii in-vitro. Yafte. 2022; 23(5):14-23.