

بررسی اثر عصاره آبی آلونته‌ورا لیتورالیس بر روی خواص بیوشیمیایی و ساختار سلولی اشرشیا کلی مقاوم به دارو (ESBL) با کمک میکروسکوپ الکترونی

• سمیرا تاج دولتی

دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران

• محمد ارجمندزادگان (نویسنده مسئول)

مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گروه میکروبیشناسی ایمنی شناسی،

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۳-۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۶-۰۶

Email: arjomandzadegan@arakmu.ac.ir



چکیده

گیاهان دارویی و مشتقات حاصل از آنها جهت مقابله با مقاومت دارویی به خوبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این تحقیق خواص بیوشیمیایی و ساختار سلولی اشرشیا کلی مقاوم به دارو (ESBL) پس از تاثیر عصاره آلونته‌ورا روی آن به کمک میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. عصاره آبی آلونته‌ورا با کمک روش تقطیر تهیه و با روش میکروپلیت دایلوژن، کمترین غلظت بازدارنده از رشد (MIC) روی اشرشیا کلی مقاوم به دارو تعیین گردید. اثر عصاره روی خواص بیوشیمیایی باکتری با استفاده از محیط کشت‌های مختلف و تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. ارزیابی تغییرات ساختاری اشرشیا کلی مقاوم به دارو در قیاس با شاهد، در غلظت‌های متوالی عصاره با استفاده از میکروسکوپ نوری، غربال‌گری شد و اولین غلظت تغییر دهنده ساختار تعیین گردید. سپس در این غلظت، ساختار دقیق اشرشیا کلی مقاوم به دارو و سویه حساس در معرض عصاره در مقایسه با شاهد، با کمک میکروسکوپ الکترونی گذاره با روش‌های مقطع‌گیری و رنگ‌آمیزی منفی بررسی شد. MIC معادل ۰/۰۰۴ میکروگرم بر لیتر عصاره آبی برای اشرشیا کلی مقاوم به دارو تعیین گردید. در غلظت کمتر از MIC، تا ۳۰ دقیقه پس از ترکیب عصاره با باکتری نتایج کلیه تست‌های بیوشیمیایی بدون تغییر بود. پس از این زمان، واکنش باکتری در معرض عصاره به آزمایشات بیوشیمیایی، تغییر یافته و تست‌های سیترات، اندول، حرکت و OF، منفی و محیط TSI بدون تولید گاز و قلیایی/قلیایی گردید. نتایج میکروسکوپ نوری نشان داد که عصاره باعث کاهش اندازه، کوکوباسیل شدن باکتری، تغییر در رنگ پذیری و نیز انهدام باکتری شده است. مقایسه سلول‌های مقاوم و حساس در معرض عصاره در رنگ‌آمیزی منفی میکروسکوپ الکترونی، تغییر در ابعاد، تجمعات و تقسیمات نامتقارن به فرم جوانه‌زنی را نشان داد. تصاویر حاصل از مقطع‌گیری، بیانگر تاثیر عصاره در ابعاد باکتری مقاوم به میزان حدود دو برابر حساس، ضخامت بیشتر دیواره باکتری مقاوم نسبت به حساس، اضمحلال دیواره و تغییر فرم سلول بود که در باکتری مقاوم شاهد (عدم مواجهه با عصاره) مشاهده نگردید. در این تحقیق نحوه تاثیرگذاری یک عصاره گیاهی روی باکتری‌های مقاوم به دارو در قیاس با شاهد تعیین گردید. عصاره آبی آلونته‌ورا لیتورالیس باعث تغییر خواص بیوشیمیایی و ساختار سلولی اشرشیا کلی مقاوم به دارو در مقایسه با شاهد می‌گردد.

کلمات کلیدی: عصاره آلونته‌ورا، اشرشیا کلی، خواص بیوشیمیایی، ساختار سلولی، میکروسکوپ الکترونی

- Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 43-52

Study on Effects of *Aloe vera littoralis* Aqueous Extract on Biochemical Properties and Cellular Structure of ESBL *E. coli* by Transmission Electron Microscopy

By: Tajdolati, S., Department of Basic Sciences, Islamic Azad University, Arak, Iran. Arjomandzadegan, M., (Corresponding Author) Infectious Diseases Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Received: 2016-06-14 Accepted: 2016-08-27

Email: arjomandzadegan@arakmu.ac.ir

Due to inappropriate use of antibiotics, the bacterial species have become resistant to antimicrobial medicines and treatments to health problems. Medicinal plants and derivatives are a good source for treatment and are effective against drug resistance. In this study, the effect of *Aloe vera* on biochemical properties and cell structure of drug-resistant *E. coli* was studied by electron microscopy. *Aloe vera* aqueous extract was produced by distillation method and the minimum growth inhibitory concentration (MIC) was determined by diffusion disk method and dilution microplate for drug-resistant *E. coli*. The effect of extract on biochemical properties of bacterial cultures was analyzed using blood agar, eosin methylene blue (EMB), biochemical tests IMVIC, citrate test, SIM test and urease test. The possible change in cell structure compared with control, was assessed in consecutive extract concentrations using scanning optical microscopy, and the first concentration altering the structure was determined. At this concentration, the exact structure of drug-resistant and sensitive *E. coli* strains was studied using TEM, negative staining and section methods. Kirby-Bauer method results demonstrated that drug-resistant *E. coli* (ESBL) was resistant to the studied antibiotics. MIC of 4 mg of drug-resistant *E. coli* was determined. At this concentration, up to 30 minutes of combination of extract and bacteria, the results of all biochemical tests were unchanged. After this time, tests of citrate, indole, mobility and OF were negative and TSI was without gas production and alk/alk. Optical microscopy results showed that the extract can destroy, reduce size and assembly of bacteria, induce to form cocobacilli and change the staining. Comparison of stained-resistant isolates and negative control samples in electron microscopy indicated the visibility of the bacterial assembly and asymmetric divisions from the cell pole. The results of two different morphology in cross-section of *Escherichia* showed an ordinary and dull form that is larger and has a thickness of 2.3nm. The aqueous extract prepared from the plant *Aloe vera*, had an equivalent effect to or a better effect than the commonly used antibiotics on bacteria isolated from patients with infectious matters. Therefore, appropriate drugs made of plants may be used to treat resistant infections..

Keywords: *Aloe vera* extract, *E. coli*, Biochemical Properties, Cell Structure, Electron Microscopy

دام‌های بی‌شماری را تاکنون نجات داده‌اند (۲)، استفاده از گیاهان دارویی از قدیم مورد توجه بوده و با توجه به خالص شدن و تفکیک مواد موثره موجود در گیاه در عصاره حاصل از آن و تاثیر بیشتر نسبت به مواد خالص شده از گیاه، استفاده از آن مطلوب شده است (۳). ایران به دلیل داشتن شرایط آب و هوایی و طبیعت متنوع، دارای منابع غنی و با ارزش گیاهان دارویی است. یکی از این گیاهان دارویی آلوئه‌ورا می‌باشد. گیاه آلوئه‌ورا (صبر زرد) (*Aloe vera littoralis*) از خانواده Liliaceae و بومی مناطق گرمسیری است (۴). این گیاه ژل داخلی بی‌رنگی در برگ‌های خود دارد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عصاره آبی و الکلی آلوئه‌ورا خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی دارند. اثرات ضد باکتریایی آن بیشتر به ژل داخلی این گیاه مربوط می‌شود (۵).

باکتری‌های مختلفی باعث عفونت در سیستم ادراری می‌شوند. این ارگانیزم‌ها در روده، نواحی مقعد و پرینه ساکن هستند. *اشرشیا کولی*

مقدمه

ساخت داروهایی که از عفونت‌های میکروبی پیشگیری نموده یا آن‌ها را درمان می‌کنند، یکی از پیشرفت‌های اصلی در زمینه بهبود کمیت و کیفیت زندگی در سال‌های اخیر است. داروهای ضد میکروبی از پر مصرف‌ترین انواع داروها هستند که در صورت استفاده صحیح از آن‌ها نجات بخش خواهند بود و در عین حال استفاده نادرست و نابجای آن‌ها باعث افزایش هزینه، عوارض و تداخلات دارویی بسیار، مقاومت دارویی و بی‌ارزش شدن این داروهای با ارزش می‌گردد. پدیده بروز "مقاومت دارویی" مدت‌ها است که توجه دانشمندان و محافل علمی را به خود جلب کرده است (۱).

گزارشات جدیدی مکررا از بروز مقاومت دارویی آنتی‌بیوتیک‌ها منتشر می‌گردد. علی‌رغم این که آنتی‌بیوتیک‌ها زندگی انسان‌ها و

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی**MIC (Minimum Inhibitory Concentration)**

حداقل غلظت مهارکنندگی با کمک روش میکرو برات دیلوشن (Micro Broth Dilution) در پلیت‌های ۹۶ خانه استریل تعیین شد. بدین منظور از محیط کشت مولر هینتون برات محتوی معادل نیم مک فارلند از باکتری مورد مطالعه، ۱۰۰ میکرولیتر داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر عصاره ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. بدین ترتیب غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. سپس از خانه دوم به سوم و به همین ترتیب تا خانه نهم رقت متوالی انجام شد. بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میکروپلیت‌ها با کمک دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شدند. وجود کدورت نشان‌دهنده رشد یا عدم رشد باکتری بود. غلظت موجود در یک چاهک قبل از چاهک دارای تغییر جهشی کدورت، به عنوان MIC تعیین گردید (۹).

بررسی خواص بیوشیمیایی باکتری‌های تحت تاثیر عصاره

برای بررسی اثرات عصاره آلوتهورا بر روی خواص بیوشیمیایی باکتری و مقایسه بین تعداد باکتری‌های مقاوم در معرض عصاره، در زمان‌های صفر، ۰/۵، یک، دو، سه، چهار، پنج، هفت و ۲۴ ساعت بعد از اضافه کردن عصاره، باکتری در محیط‌های افتراقی سیمون سترات، SIM، TSI و OF بلاداآگار، اتوزین متیلن بلو (EMB) و اوره کشت داده شد. باکتری شاهد به همین روش بدون عصاره در محیط‌های کشت ذکر شده کشت داده شد و بررسی مقایسه‌ای باکتری شاهد و توانایی رشد آن بر روی محیط‌های EMB و TSI، توانایی تولید گاز، توانایی تجزیه تریپتوفان، توانایی حرکت در محیط SIM و همچنین توانایی تولید اسید با باکتری‌های حساس و مقاوم در معرض عصاره انجام گردید (۱۰).

بررسی ساختار سلولی باکتری مقاوم با استفاده از**میکروسکوپ الکترونی**

بدین منظور در غلظت تعیین شده از باکتری و عصاره مجدداً آزمایش تکرار شد و هفت ساعت پس از مجاور بودن باکتری با عصاره، نمونه با سرعت ۲۰۰۰ دور بر ثانیه به مدت چهار دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل از سانتریفوژ از محلول رویی آن جدا گردید و با استفاده از سرم فیزیولوژی و آب مقطر با نسبت مساوی ۵۰:۵۰ سی سی شسته شد. مجدداً نمونه سانتریفوژ و محلول رویی آن دور ریخته شد. رسوب حاصله در بافر تثبیت‌کننده گلوتر آلدئید ۲/۵ درصد و طی مدت زمان ۲۴ ساعت جهت آماده‌سازی (Sample Preparation) به مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک دانشگاه تهران ارسال گردید (۱۲). سپس نمونه با بافرهای کاکودیلات سدیم و تتراکسید آمیوم مورد تثبیت مجدد قرار گرفت (آبگیری نمونه در الکل با درجات افزایشی ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ در الکل خالص سه بار) انجام گردید. پس از آن نمونه در پروپیلن اکساید به عنوان حلال حد واسط بین الکل و رزین، سه بار و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. نمونه در مخلوط رزین و پروپیلن اکساید با نسبت‌های مختلف گذاشته شد که نسبت‌ها به صورت زیر است: ابتدا با نسبت یک به سه رزین و پروپیلن اکساید، سپس با نسبت یک به یک و در

(۸۰ درصد موارد)، پروتئوس، سودوموناس، کلسیلا، استافیلوکوک آرئوس، هموفیلوس و استافیلوکوک کوآگولاز منفي از عوامل این عفونت‌ها محسوب می‌گردند. این باکتری‌ها به سرعت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده و می‌توانند به صورت هم‌زمان به چندین آنتی‌بیوتیک مقاومت داشته باشند (۶). هدف از این مطالعه، تعیین اثر عصاره گیاه آلوتهورا بر روی باکتری اشرشیاکلی مقاوم به دارو (ESBL) و بررسی ساختار سلولی باکتری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی می‌باشد.

مواد و روش‌ها**عصاره‌گیری**

گیاهان به صورت تازه از مزرعه گیاهان دارویی تهیه شده و چند بار با آب شستشو داده شدند. سپس در محلی تاریک طی چند روز خشک و وسیله دستگاه خردکن، آسیاب گردیدند. عصاره‌گیری از مقدار ۲۰۰ گرم از مواد آسیاب شده به همراه ۵۰۰ سی سی آب معمولی با دستگاه رفلاکس به مدت هشت ساعت در دمای جوش به روش تقطیر انجام شد (۷).

سویه مورد استفاده

سویه کلینیکی مقاوم به داروی اشرشیا کلی جدا شده از بیماران از بخش میکروبی مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک اخذ و به کمک روش‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند. بدین منظور از محیط‌های کشت بلاداآگار، (EMB) اتوزین متیلن بلو، تست‌های بیوشیمیایی IMVIC، تست سترات، تست SIM و تست اوره استفاده شد.

آنتی‌بیوگرام

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در این سویه با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (کربی- بائر) مطابق با معیارهای موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) تعیین گردید. دیسک‌ها محصول شرکت MAST (انگلستان) و شامل سفوتاکسیم، سفنازیدیم، سفوکسیتین، سفیم، سفتریاکسون، آموکسی کلاو، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، تتراسایکلین، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (کوتریموکسازول)، نیتروفورانتوئین، ایمینم و کلرامفنیکل بودند (۹).

روش دیسک دیفیوژن**(Disk Agar Diffusion)**

حساسیت باکتری مورد مطالعه به عصاره‌های گیاهی با روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. سوسپانسیون باکتری معادل غلظت نیم مکفارلند استاندارد از کلنی‌های ۲۴ ساعته باکتری روی محیط بلادا آگار با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید. از سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مکفارلند، کشت به صورت سفرفه‌ای روی محیط مولر هینتون آگار انجام شده و ۲۰ میکرو لیتر عصاره گیاهی از هر کدام از غلظت‌های ۴۰، ۸۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵ و ۰/۳۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دیسک‌های بلانک روی محیط کشت اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار داده شده و قطر هاله عدم رشد باکتری به میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (۱۱).

نتایج**نتایج آنتی‌بیوگرام**

بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله اشرشیا کلی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول (۸۸ درصد) دسفت‌یاکسون (۷۶ درصد)، آموکسی کلاو (۷۴ درصد)، سفنازیدیم (۷۲ درصد) و سفوتاکسیم (۷۲ درصد) بود. ایزوله اشرشیا کلی نسبت به ایمپنم حساسیت نشان داد (۶).

نتایج دیسک دیفیوژن

در باکتری اشرشیا کلی مقاوم به دارو هاله عدم رشد مشاهده نشد.

نتایج میکروپلیت دایلوژن

در روش میکروپلیت دایلوژن برای اشرشیا کلی مقاوم به دارو غلظت چهار میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان MIC تعیین شد.

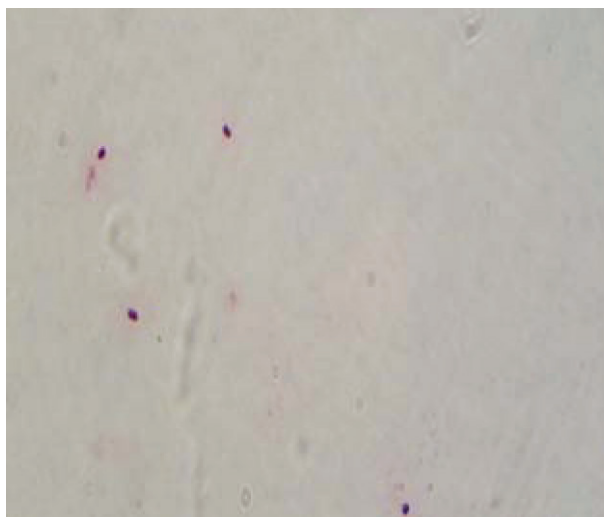
بررسی ساختار سلولی

نتایج حاصل از کشت و تست‌های بیوشیمیایی باکتری اشرشیا کلی

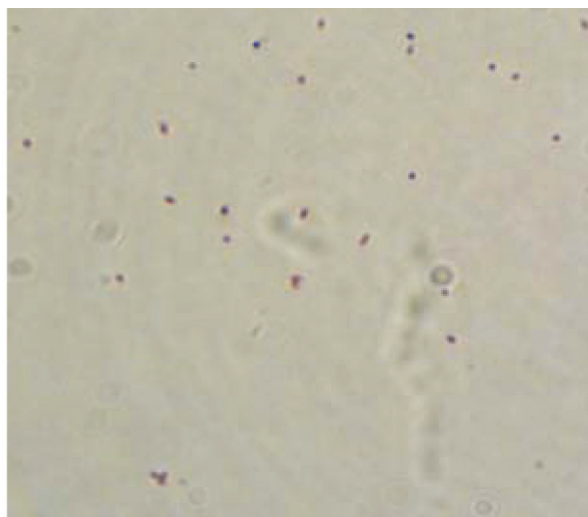
نهایت نسبت سه به یک (هرکدام به مدت دو تا سه ساعت). نمونه جهت پلیمریزه شدن در آون ۶۰ درجه به مدت دو الی سه روز قالب‌گیری شد و با استفاده از دستگاه اولترامیکروتوم برش‌گیری شد. برش‌ها روی گرید مسی آغشته به فرم وار کربن جهت محافظت از آسیب‌های احتمالی نمونه مانند ضربه خوردن و شکسته شدن قرار داده شد. با استات یورانیل یک درصد و سیترات سرب جهت ایجاد کنتراست مطلوب رنگ‌آمیزی انجام شد و در آخر نمونه خشک گردید. در مرحله آماده‌سازی، نمونه برای دو منظور آماده شد:

۱- آماده‌سازی جهت رنگ‌آمیزی منفی که در آن ساختار سلولی کلی باکتری مشاهده شد.

۲- روش مقطع‌گیری: در این روش با کمک سایر بافرها مانند کاکودیلات سدیم فرایند تثبیت تکمیل شد. نمونه وارد رزین شد و بعد از محکم شدن مقطع‌گیری گردید. این کار با کمک اولترامیکروتوم انجام شد. نهایتاً مقطع‌ها روی گرید قرار داده و با میکروسکوپ الکترونی گذاره TEM دیده شد (۷).



باکتری در معرض عصاره

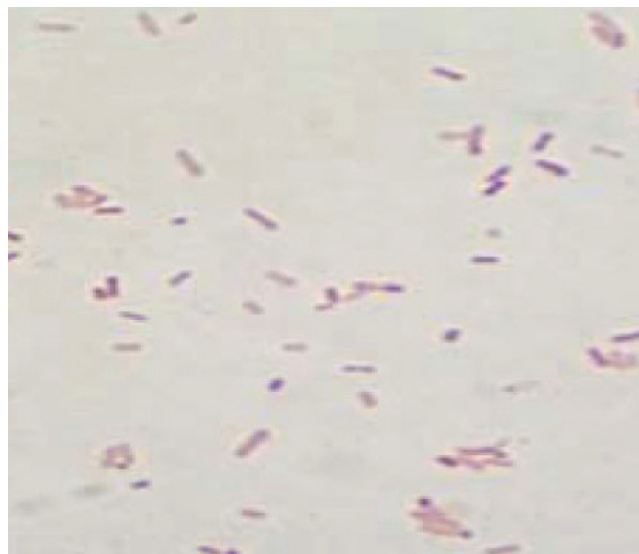


باکتری شاهد

شکل ۱- نتایج حاصل از بررسی ساختار سلولی سلول باکتری مقاوم که در زمان اول (نیم ساعت) در معرض عصاره آلوئه‌ورا قرار گرفته و باکتری شاهد که حالت مقایسه‌ای دارد. عصاره موجب کاهش تجمع سلولهای باکتری شده است. (بزرگنمایی ۱۰۰×)



باکتری شاهد



باکتری در معرض عصاره

شکل ۲- نتایج حاصل از بررسی ساختار سلولی باکتری مقاوم که در معرض عصاره قرار گرفته و باکتری شاهد در مدت زمان آخر (۴۲ ساعت). عصاره آلونته ورا موجب افزایش حالت کوکوباسیل، افزایش انهدام و تغییر در خصوصیات رنگ پذیری باکتری شده است (بزرگنمایی ۱۰۰×).

تغییری پیدا نکرده بود. لازم به ذکر است در مواردی پیتیدوگلاپیکان به حالت مضرس و قطعه‌قطعه درآمده و احتمالاً ساختار تقسیم باکتری از حالت تشکیل سپتوم تغییر کرده بود. جدا شدن سلول دختری از مادری اولاً به صورت نامتناسب (غیر هم اندازه) بود، ثانياً ساختار به گونه‌ای بین حالت جوانه‌زدن و تقسیم دوتایی معمولی بود. ضخامت دیواره در همه جا قابل مشاهده بود. انهدام باکتری بعد از حجیم شدن و نیز تغییر ساختار سلولی به کرات مشاهده شد. همان موادی که در سیتوپلاسم قبل از انهدام قابل مشاهده بود، بلافاصله بعد از انهدام بصورت آزاد مشاهده شد.

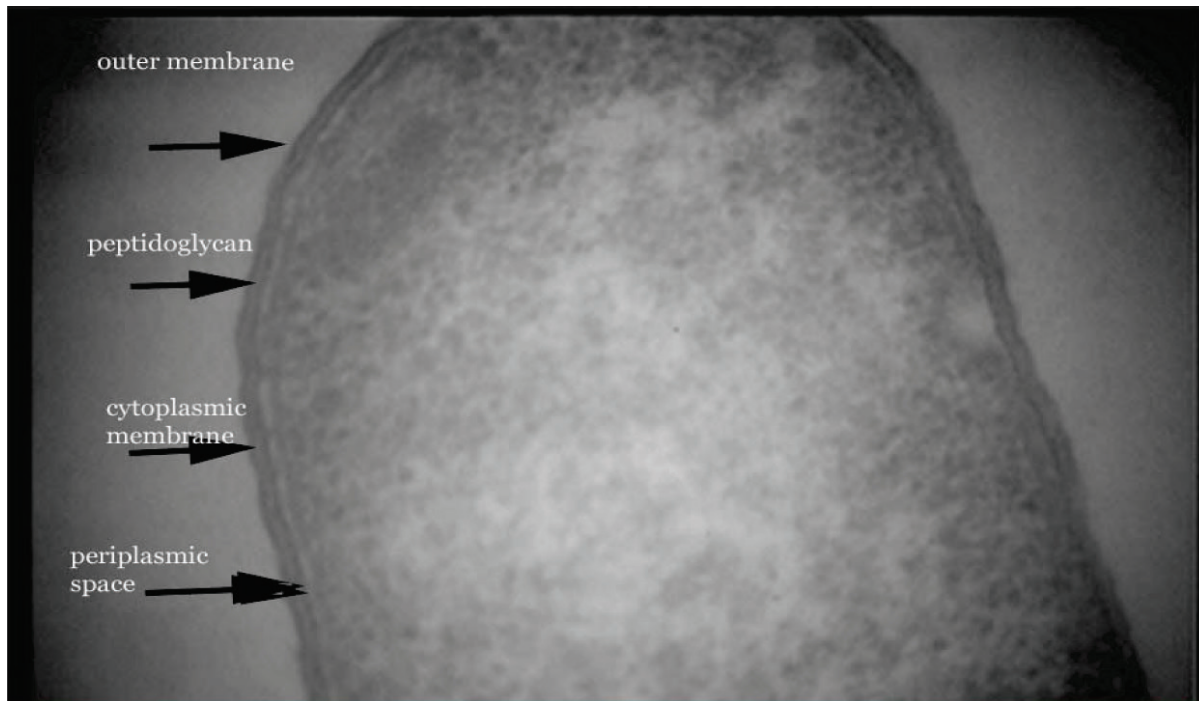
در باکتری مقاوم بدون عصاره تقسیم به صورت معمول صورت پذیرفت. اضمحلال یا کوچک شدن دیواره مشاهده نشد، اما مواردی از بزرگ شدن سلول تا حدودی قابل مشاهده بود (در حد پنج تا ۱۰ درصد). مقایسه ESBL بدون عصاره و به عنوان شاهد با ESBL در معرض عصاره قرار گرفته نشان داد که هیچ‌کدام از موارد فوق‌الذکر از جمله تقسیم‌های نامتناسب به فرم جوانه‌زنی، تورم بیش از حد باکتری، فرم تکثیری نامتناسب درون سیتوپلاسمی، ضخامت بیش از حد دیواره سلولی، ساختار سلولی تجزیه شده، باکتری بسیار طویل، باکتری منهدم شده و دیواره مضمحل شده مشاهده نشد. نحوه تخریب یا به‌صورت انفجاری است یا اضمحلالی که در عکس‌ها با بزرگنمایی کم قابل مشاهده است. پوشش باکتری در ESBL شاهد که در معرض عصاره قرار نگرفته

مقاوم به دارو (ESBL) اثبات نمود که تا ۳۰ دقیقه پس از ترکیب عصاره با باکتری، نتایج کلیه تست‌های بیوشیمیایی مثبت بوده ولی پس از این زمان کلیه تست‌های سیترات، TSI، قلیایی/قلیایی بدون تولید گاز، OF، اندول و تحرک منفی شدند (۵). نتایج حاصل از بررسی ساختار سلولی سلول باکتری در معرض عصاره قرار گرفته و شاهد در زمان‌های مختلف نشان داد که با افزایش زمان، عصاره موجب افزایش حالت کوکوباسیل، افزایش انهدام و تغییر در خصوصیات رنگ‌پذیری باکتری شد. اثر عصاره آبی آلونته‌ورا روی ساختار سلولی باکتری /شرشیا کلی مقاوم در مقایسه با نمونه شاهد با کمک لام رنگ‌آمیزی شده گرم نیز همین نتیجه را اثبات نمود.

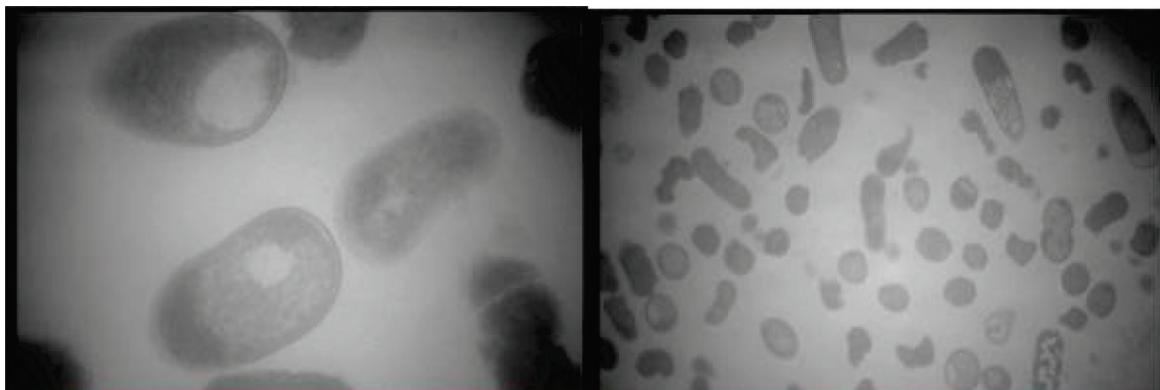
نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی

مشاهده مقطع‌گیری ESBL در معرض عصاره

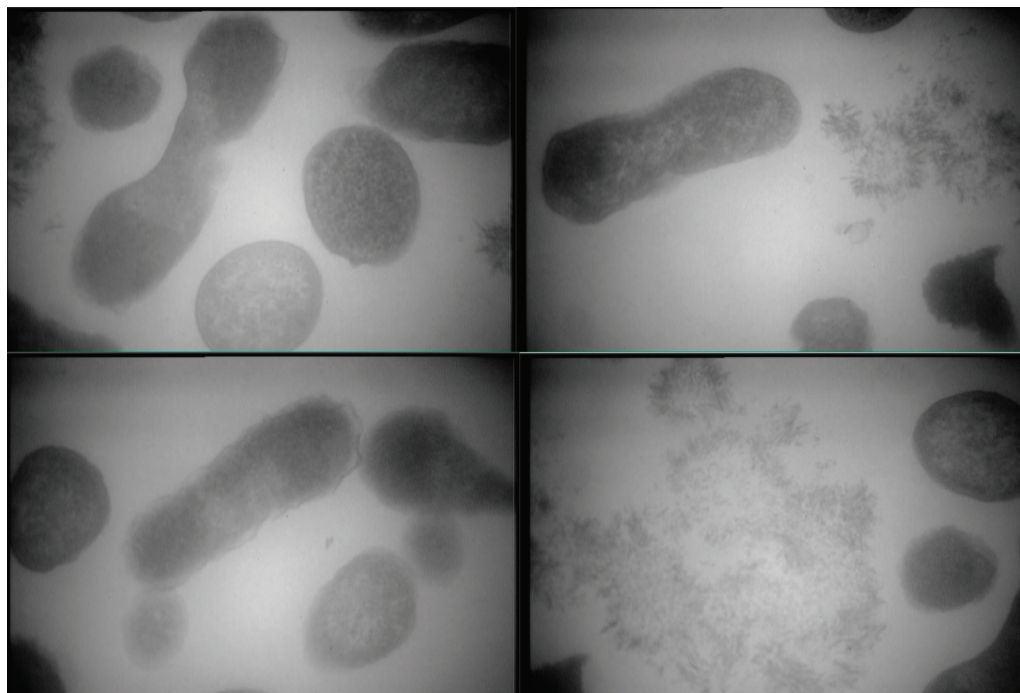
باکتری تغییر ماهیت و تغییر ساختار سلولی داده و دیواره سلولی ضخیم شده بود. مواردی از انهدام و اضمحلال باکتری مشاهده گردید. DNA در سطح سلول پخش شده و پروتئین و اسید نوکلئیک باکتری در حال تقسیم بودند. ساختار مورئین در برخی موارد از حالت محکم و غیر قابل انعطاف به حالت مضرس و قابل انعطاف تبدیل شده بود. باکتری از حالت میله‌ای ساده به شکل‌های دمبلی (۱۰ درصد)، متورم (۳۰ درصد)، بسیار طویل (۲۰درصد)، بیضی شکل (۳۵ درصد) و اشکال دیگر تغییر کرده بود. ضخامت دیواره در مواردی که هنوز پیتیدوگلاپیکان سالم بود



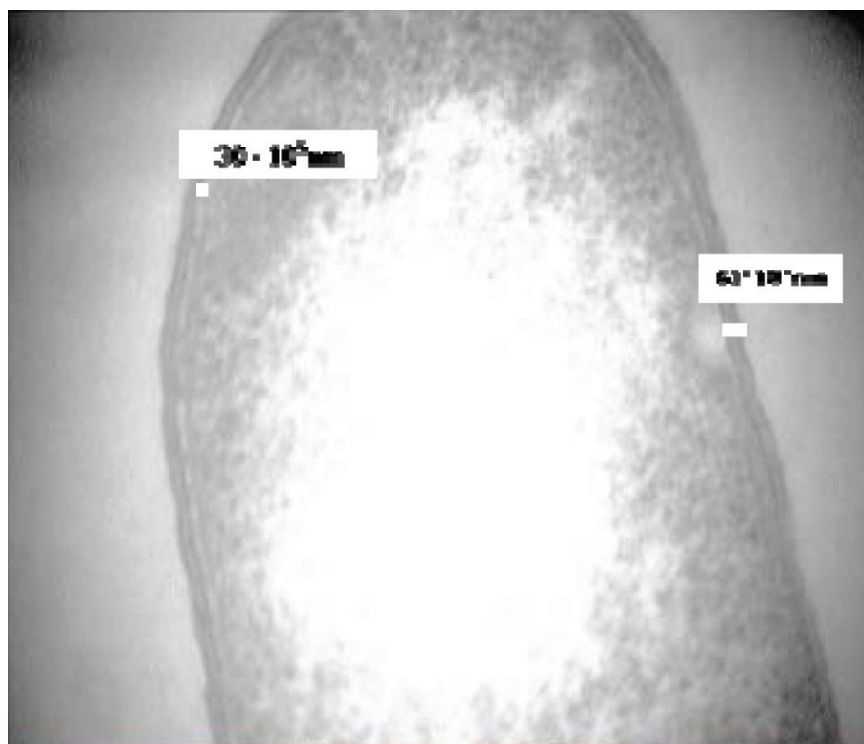
شکل ۳- مقطع گیری و مشاهده لایه های مختلف غشا خارجی، لایه پپتیدوگلیکان، غشا سیتوپلاسمی باکتری و فضای پری پلاسمیک و ضخامت دیواره سلولی (بزرگنمایی ۴۰۰۰۰)



شکل ۴- شمای کلی مقطع گیری از تجمعات باکتری ESBL در معرض عصاره با بزرگنمایی (۸۰۰۰ برابر)



شکل ۵- مشاهده باکتری تغییر ساختار سلولی داده مقاوم در معرض عصاره: ساختار مورثین در برخی موارد از حالت محکم و غیر قابل انعطاف به حالت مژرس و قابل انعطاف تبدیل شده بود. باکتری از حالت میله ای ساده به فرم دمبلی و متورم تغییر کرد. انهدام باکتری بعد از حجیم شدن مشاهده شد. همان موادی که در سیتوپلاسم قبل از انهدام قابل مشاهده بود، بلافاصله بعد از انهدام بصورت آزاد مشاهده شد (بزرگنمایی ۱۶۰۰۰، ۵۰۰۰۰)



شکل ۶- مقطع گیری و مشاهده لایه های مختلف غشا خارجی، لایه پپتید و گلایکان، غشا سیتوپلاسمی باکتری و فضای پری پلاسمیک و ضخامت دیواره سلولی (بزرگنمایی ۴۰۰۰۰)

بود، کمی ضخیم‌تر بود. فرم مضمحل شده باکتری در ESBL بیشتر دیده شد (۷۰ درصد) و پدیده پلاسمولیز در ESBL کمتر مشاهده شد.

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی منفی باکتری ESBL در معرض عصاره

تجمعات باکتریایی مشهود بود. تقسیم‌ها نامتقارن و از کنار قطب صورت گرفته بود. دو نوع مورفولوژی متفاوت هم در رنگ‌آمیزی منفی و هم در مقطع گیری در ESBL مشاهده شد: فرمی از باکتری با ظاهری شبیه اش‌رشیا معمولی و کدر، و فرمی از باکتری که بزرگ‌تر و دارای ضخامت ۲/۳ نانومتر و طول حداقل دو برابر بود.

بحث

در این تحقیق اثر یک عصاره گیاهی روی باکتری مقاوم به دارو بررسی شد. تاکنون در تحقیقات مختلف، اثر عصاره‌ها، صرفاً در کنترل رشد باکتری‌ها (عمدتاً سویه‌های استاندارد) مورد ارزیابی قرار گرفته است. در مقاله حاضر، نحوه تاثیر عصاره آبی آلوئه‌ورا روی خواص بیوشیمیایی سویه ESBL/اش‌رشیا کلی، تعیین و نیز محل و نحوه تخریب سلولی با کمک میکروسکوپ الکترونی اثبات گردید.

پدیده مقاومت دارویی با مصرف غیر اصولی آنتی‌بیوتیک‌ها در جوامع انسانی ایجاد شده و به صورت مختلف مشاهده می‌شود. خانواده انتروباکتریاسه به خصوص اش‌رشیا کلی مقاومت زیادی به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این ارگانیسوم‌ها با سرعت زیادی در حال افزایش است. در حقیقت، سرعت ایجاد مقاومت در انتروباکتریاسه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های جدید سریع‌تر از سرعت ایجاد و تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید می‌باشد (۸).

با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، تلاش برای استفاده از ترکیبات موجود در گیاهان برای درمان عفونت‌های مختلف افزایش یافته است. در مورد بررسی اثر ضد میکروبی گیاهان دارویی، در کشور ما و در بسیاری از کشورهای جهان مطالعات زیاد و گسترده‌ای انجام گرفته است که این تحقیقات بر روی میکروارگانیسوم‌های مختلف صورت گرفته است. مطالعات فوق‌الذرات ضد میکروبی گیاه مورد بررسی در این تحقیق را بر اساس نتایج بدست آمده از هاله ممانعت از رشد تأیید کرده است (۱۰).

در ایران با وجود مطالعات متنوع در زمینه خواص مختلف آلوئه‌ورا، مطالعات محدودی در زمینه خواص ضد میکروبی این گیاه روی باکتری‌های کلینیکی انجام شده است (۱۳). در مطالعه حاضر، اثر ضد میکروبی عصاره آبی آلوئه‌ورا لیتورالیس و تشابه اثر عصاره آلوئه‌ورا با هاله تشکیل شده توسط دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در غلظت مشابه، نشان داده شد.

اش‌رشیا کلی می‌تواند به عنوان عامل بیماری‌زای اصلی و با فرصت طلب، بیماری ایجاد کرده و نیز باگذشت زمان به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم گردد. لذا بررسی‌ها برای بدست آوردن مواد ضد میکروبی ارزشمند و طبیعی مانند گیاه آلوئه‌ورا امری ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق به واسطه وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال گیاه آلوئه‌ورا و مواد مؤثره ضد باکتریایی، تأثیر ضد میکروبی عصاره آبی گیاه آلوئه‌ورا مورد بررسی قرار گرفت.

آگاری و همکاران مطالعه مقایسه‌ای روی اثر لیف و ژل آلوئه‌ورا بر عوامل باکتریایی و قارچی مختلفی انجام دادند. در تحقیق ایشان، برگ گیاه روی هر دو میکروارگانیسوم سودوموناس و کاندیدا آلیکانس مؤثر بود. آن‌ها با اثبات مؤثر بودن هر دو بخش گیاه توصیه نمودند که بهتر است از هر دو بخش لیف و برگ این گیاه استفاده شود. نتایج آگاری مشابه نتایج تحقیق حاضر بود (۴).

در ۲۰۱۲، آبراهام و همکاران، خواص ضد میکروبی عصاره آلوئه‌ورا بر استافیلوکوکوس اورئوس را ارزیابی نمودند. عصاره خام در نتیجه فشردن آن‌ها در غلظت‌های مختلف آماده گردید و کشت حاوی استافیلوکوکوس اورئوس برای مهار این ارگانیسوم در شرایط آزمایشگاهی با روش انتشار در آگار بررسی شد. ارتباط معناداری بین غلظت و قطر هاله عدم رشد اثبات گردیده و مشخص شد این گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی بر روی استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. آن‌ها نتیجه گرفتند که انجام مطالعات بیشتر سبب گسترش کاربرد این عصاره خواهد شد (۱۵).

خرم و همکاران در سال ۲۰۰۹ به مقایسه فعالیت ضد میکروبی ژل تازه، ژل محافظ، ژل خنک‌کننده و کرم آکنه آلوئه‌ورا در برابر تعدادی از میکروارگانیسوم‌ها پرداختند. مشخص شد که ژل تازه و ژل محافظ دارای حداکثر قطر هاله مهارکننده در برابر باسیلوس سابتیلیس و ژل خنک‌کننده و کرم آکنه دارای حداکثر قطر هاله مهارکننده در برابر استافیلوکوکوس اورئوس / ۳۰ نانومتر) بوده است. علاوه بر این، حداقل قطر هاله مهارکننده توسط هر چهار نوع ژل روی اسپرژیلوس فیکوم معادل هم بود (۱۶).

کارپاگام و همکاران در سال ۲۰۱۱ فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف آلوئه‌ورا را با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی روی سویه‌های اش‌رشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سابتیلیس، کلبسیلا پنومونیه و استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار دادند. تفاوت قابل توجهی در اثر مهارکنندگی در میان عصاره‌های مختلف مشاهده شد. نفت خام و عصاره آبی هیچگونه فعالیتی را در برابر باکتری‌ها از خود نشان ندادند. عصاره متانولی، اتانولی و عصاره استونی فعالیت ضد باکتریایی علیه اش‌رشیا کلی و باسیلوس سابتیلیس نشان داده و عصاره متانولی فعالیت ویژه‌ای علیه استافیلوکوکوس اورئوس داشت که ممکن است به علت تفاوت ماده مؤثره بین آن‌ها در عصاره‌های مختلف باشد (۱۷). در این تحقیق تأثیر نوع عصاره‌گیری در آثار ضد میکروبی آن اثبات گردید. همچنین اثبات شد که عصاره تهیه شده از برگ کامل، شامل ژله داخلی و لیف به صورت همراه، آثار ضد میکروبی مناسبی روی باکتری‌های کلینیکی دارد (۴).

جورج و همکاران اثر خمیر دندان آلوئه‌ورا بر باکتری‌های متنوع را مورد بررسی قرار دادند. نتیجه تحقیق اثر مناسب ژل خمیر دندان را روی این میکروب‌ها نشان داد (۱۴).

با توجه به نوین بودن بررسی‌های الکترونی این عصاره بر روی باکتری مورد نظر، نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره آبی آلوئه‌ورا دارای اثرات ویژه‌ای روی ساختار اش‌رشیا کلی است. همین مساله در خصوص تأثیر ویژه عصاره روی فیزیولوژی باکتری نشان داده شد. به طوری که مجاورت باکتری با عصاره آبی آلوئه‌ورا موجب از بین رفتن توانایی باکتری در مصرف تریپتوفان، گلوکز و لاکتوز، از بین رفتن توانایی

منابع مورد استفاده

- 1- Saurina GI, Quale JM, Manikal VM, Oydna E, Landman D.(2000). Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY: Epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45:895-898.
- 2- T. Eric Blank, David W. Lacher, Isabel C.A. Scaletsky, (2003). Enteropathogenic *Escherichia coli* O157 strains from Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 9(1):113-115.
- 3- Mahdi Kargarani ; Ali Reza Moradabadi; Mohammad Arjomandzadegan, Effects of the Aqueous Extract of Aloe vera on the Morphological and Physiological Properties of *E. coli*, Iranian Red Crescent Medical Journal. 19(2): e23896.
- 4- Sadrnia M, Arjomandzadegan M. Comparative Study on the Effects of Aloe Vera Extract in Clinical Strains of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* Compared to Antibiotics of Choice. *Arak Medical University Journal*. 2014; 17 (6) :39-46.
- 5- Arjomandzadegan M1, Emami N1, Habibi G, Anti-mycobacterial activity assessment of three ethnobotanically plants against *Mycobacterium tuberculosis*, An In vitro study, *Int J Mycobacteriol*. 2016 Dec;5 Suppl 1:S108-S109.
- 6- Chithra, P.; Sajithlal, G.B. and Chandrakasan, G. (1998d). In-

حرکت و ناتوانی در تولید اسید و گاز شد. همچنین عصاره آبی آلوه ورا موجب کاهش قابل توجه تعداد سلول باکتری شد.

نتیجه گیری

این بررسی نشان داد که عصاره آلوه ورا دارای اثرات ضد باکتریایی علیه باکتری *اشرشیا کلی* مقاوم به دارو است و می‌تواند باعث ایجاد تغییرات در ساختار سلولی و خواص بیوشیمیایی در این باکتری شود. همچنین در این بررسی تغییرات آشکاری در شکل باکتری شامل تغییر اندازه، افزایش شکل کوکوباسیل، کاهش رنگ‌پذیری، افزایش انهدام و کاهش تجمع باکتری نسبت به نمونه شاهد مشاهده گردید. مجاورت باکتری با عصاره آبی آلوه ورا موجب از بین رفتن توانایی باکتری در مصرف تریپتوفان، گلوکز و لاکتوز، از بین رفتن توانایی حرکت و ناتوانی در تولید اسید و گاز شد. لذا با ساخت داروی مناسب با منشاء گیاهی می‌توان به درمان عفونت‌های مقاوم امیدوار بود. امید است که در آینده‌ای نزدیک تحقیقات جامع و کامل‌تری در ادامه این طرح انجام شود.

تشکر و قدردانی

این بررسی با کمک مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شده است. بدین‌وسیله از کلیه همکارانی که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند سپاسگزاریم و تشکر نموده، پیروزی و بهروزی هر چه بیشتر برایشان آرزو داریم.



شکل ۷- رنگ آمیزی منفی از باکتری مقاوم در معرض عصاره و مشاهده باسیلهای بلند تغییر ساختار سلولی داده (بزرگنمایی ۴۰۰۰)

- fluence of *Aloe vera* on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 59(3): 195-201 Monstein, A. et al. (2007). Multiplex PCR amplification assay for the detection of bla SHV, bla TEM, bla CTX-M genes in Enterobacteriaceae. AP-MIS:1400-8.
- 7- Tasli ,H. Bahar, I.H. (2005). Molecular characterization of TEM and SHV derived Extended-Spectrum Beta- Lactamase in hospital based Enterobacteriaceae in Turkey. *Jpn. J. Infect Dis.* 58:162-167
- 8- Chithra, P.; Sajthlal, G.B. and Chandrakasan, G. (1998a). Influence of *Aloe vera* on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 181: 71-76.
- 9- Fit NI, Chirila F, Nadas G, Pall E, Muresan R. Comparative testing of antimicrobial activity of aqueous extracts of *Aloe vera* and *Lycium barbarum*. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Veterinary Medicine*. 2013; 70(1): 72-613.
- 10- Dababneh B.F. (2008). Antimicrobial activity of selected Jordanian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 6, (2)134-139.
- 11- Pandey R. and Mishra A. (2009). Antibacterial Activities of Crude Extract of *Aloe barbadensis* to Clinically Isolated Bacterial Pathogens, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 3,1, 1-6 .
- 12- Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Eighteenth Informational Supplement , M100, Appendix A. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - formerly NCCLS), Villanova, PA.
- 13- plasmid mediated antibiotic resistance with focus on extended spectrum β -lactamases Alma brolund (2013).
- 14- George D, Bhat SS, Antony B. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of *Aloe vera* tooth gel and two popular commercial toothpastes: An in vitro study. *Gen Dent*. 2009;57(3):238-41.
- 15- Abraham, O; Odiba, P; Achumu, L; UpuO; Yahaya, O; Miacchi, O; and Ndubuisi, C (2012). Antimicrobial properties of *Aloe vera* juice on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Science and the Environment*, 3:1-4.
- 16- Khurram, S; Rauf, A; Shaista, N; SalmanS; and Zafar, I. (2009). Comparative antimicrobial activity of Aloe Vera gel on microorganisms of public health significance. *Pharmacology online*. 1:41423.
- 17- Karpagam, T; Aruna Devaraj, R. (2011) Studies on the Efficacy of *Aleo vera* on antimicrobial activity. *IJRAP*. 2(4):1286-1289.

