بررسی اثر هم افزایی نانوذرات نقره با اسانس برگ گیاه اکالیپتوس علیه سودوموناس آئروژینوزا

مسعود مبینی[1*], مریم اصغر حیدری[1]

۱. کارشناس ارشد زیست شناسی گرایش میکروب شناسی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

نویسنده مسئول: مسعود مبینی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران.

تلفن: ۰۹۳۸۶۹۸۸۸۰۵ mobini.m۶۱@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۵/۳/۱۸

چکیده

مقدمه: با توجه به گسترش نگران کننده مقاومت به عوامل ضد میکروبی کلاسیک، روش درمانی نوآورانه برای مبارزه با عوامل بیماریزای مقاوم به آنتی بیوتیک مانند ترکیبات مشتق شده از گیاهان و نانوذرات ضروری به نظر می رسد این مطالعه به منظور بررسی اثر هم افزایی عصاره اکالیپتوس و نانوذرات نقره علیه سودوموناس آئروژینوزا انجام شد.

روش کار: این مطالعه آزمایشگاهی در آزمایشگاه دانشگاه آزاد تنکابن انجام شد. در این پژوهش به منظور بررسی فعالیت های ضد باکتری اسانس اکالیپتوس، نانو ذرات نقره و اسانس تلفیق شده از سه روش دیسک دیفیوژن، روش چاهک و روش رقت در لوله استفاده شد. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS-20 آنالیز شدند.

نتایج: روش دیسک و چاهک در هیچ غلظتی از سه ترکیب رشد سودوموناس آئروژینوزا را مهار نکرد.در روش رقت در لوله حداقل غلظت مهار رشد و کشندگی اسانس اکالیپتوس علیه سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب برابر با ۵/۱۲ و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، نانو ذرات نقره به ترتیب برابر با ۱۲/۳ و ۲۵/۶ قسمت در میلیون و اسانس تلفیق شده به ترتیب برابر با ۲۵/۶و ۵/۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر همراه با ۵/۱ قسمت در میلیون نانو ذره بود.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که نانو نقره با غلظت ۱/۵ قسمت در میلیون در ترکیب با اسانس اکالیپتوس با غلظت ۲۵/۶ میلی گرم بر میلی لیتر اثر هم افزایی بر مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا دارد. درمان ترکیبی باعث افزایش تاثیرپذیری و کاهش استفاده از هر یک از مواد و متعاقباً کاهش سمیت هریک در درمان عفونت های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا می شود.

واژگان کلیدی: اثر سینرژیسم، اسانس اکالیپتوس، نانوذرات نقره، سودوموناس آئروژینوزا، حداقل غلظت مهار کنندگی.

مقدمه

مقاومت باکتری ها به آنتی بیوتیک ها روز به روز در حال افزایش است که این مسأله باعث می شود تا بشر به فکر جایگزین کردن عوامل ضدمیکروبی مؤثر و با عوارض جانبی کمتر به جا ی مواد ضدمیکروبی با اثر کمتر و عوارض ناخواسته بیشتر باشد (۱).

سودوموناس آئروژینوزا یک باکتری گرم منفی است که همچنان به عنوان یکی از علل عمده عفونت های بیمارستانی فرصت طلب مطرح است. دلیل اصلی برجستگی آن به عنوان یک پاتوژن، مقاومت ذاتی آن به اکثر آنتی بیوتیک های معمول است. عفونتهای ایجاد شده با این نوع باکتری در جراحی ها و سوختگی ها ممکن است بصورت عفونتهای پوستی سپتیسمی، پنومونی، مننژیت و غیره ظاهر شود. بطور کلی، سودوموناس آئروژینوزا ۲۳% از کل باکتریهای جدا شده از بیماران، ۱۶% از پنومونیهای بیمارستانی، ۱۲% از عفونتهای مجاری ادراری کسب شده از بیمارستان، ۸% از عفونتهای زخم بعد از عمل جراحی و ۱۰% از عفونتهای خون بیمارستانی را تشکیل می دهد (۲).

با توجه به شیوع بالای عفونتهای ناشی از سودوموناس آئروژینوزا، اثرات جانبی آنتی بیوتیکهای رایج و نیز بروز مقاومت سویه های مختلف این باکتری به آنتی بیوتیک های مصرفی، استفاده از روشهای نوین در درمان عفونتهای ناشی از این باکتری ضروری به نظر میرسد. بروز مقاومتهای دارویی و توانایی باکتریها در ایجاد عفونتهای حاد سبب شده است تا علاقه مجددی به گیاهان به منظور بررسی اثرات ضد میکروبی آنها به وجود آید. اکالیپتوس یکی از معروفترین گیاهان دارویی است که از دیرباز اثرات ضد میکروبی و خواص دیگر آن مورد توجه بوده است. این گیاه منبع غنی از پلی فنلها و ترپنوئیدها بوده و ترکیب اصلی برگ آن اکالیپتول یا سینئول (۷۰ تا ۸۰ درصد) است (۳).

ترکیبات این گیاه، فعالیت ضد میکروبی بر علیه طیف وسیعی از ویروسها، باکتریها از جمله کلبسیلا، پرسینیا انتروکولیتیکا، سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا دیسانتری، باسیلوس سرئوس وسودوموناس آئروژینوزا و قارچ کاندیدا آلبیکنس از خود نشان داده است (۴، ۵).

به دلیل خواص و ویژگیهای جدیدی که مواد با ابعاد نانومتری از خود نشان داده اند، امروزه تمایل بسیار زیادی به فراوری و کاربرد آنها وجود دارد. به طور اساسی، ویژگیهای مربوط به نسبت بین سطح و حجم ماده در مقیاس نانومتری تغییرهای چشمگیری از خود نشان می دهند. به عبارت دیگر، در مقیاس نانومتری ویژگی های سطحی و حجمی ماده با یکدیگر ارتباط و تناسب می یابند؛ مولکول های سطحی میتوانند باعث ایجاد سختی زیاد در فلزها شوند و تولید مواد دارویی با عملکرد و بازده بهتر را در پی داشته باشند. نانوفناوری زیستی یکی از امیدوارکننده ترین حوزه های علم و فناوری نانو در عصر جدید است. این فناوری در حوزه های گوناگون علم ازجمله زیست شناسی در حال ظهور است (۶).

علاوه بر استفاده از خواص داروئی گیاهان، امروزه کاربرد نانو تکنولوژی در پزشکی و خواص منحصر به فرد نانوساختارهای فلزات، توجه های زیادی را به خود جلب کرده اند. نانوذرات (NPs) ضدمیکروبی در مقایسه با آنتی بیوتیک های رایج، دارای مزایایی مانند سمیت کمتر برای میزبان، غلبه بر مقاومت میکروارگانیسم ها و قیمت پایین تر هستند و در مقایسه با کوچکترین ذرات آنتی بیوتیکی مدت اثر بیشتری در بدن دارند. از این رو نانو ذرات دارویی به عنوان معجزه طب مدرن نامیده می شوند (۷). از طلا، نقره و مس در ساخت نانو ذرات با فعالیت ضد میکروبی استفاده شده است (۸). نانوذرات نقره بر علیه طیف وسیعی از باکتریها از جمله سودوموناس آئروژینوزا سمیت ضد میکروبی قوی از خود نشان می دهند (۹) و ترکیبات آن عفونت زخم را به طور موثری مهار می کنند (۱۰) ویژگیهای عمده نانو ذرات نقره شامل غیر سمی بودن، پایداری زیاد، آبدوست بودن، مقاومت حرارتی، عدم ایجاد و افزایش مقاومت در میکروارگانیسم ها است (۱۱).

هم افزایی بین دو دارو عبارت است از برهمکنش مثبت و تقویت اثر دو دارو، در هنگام ترکیب با یکدیگر، که اثر مهاری بیشتری از مجموع اثر هر کدام از این مواد به تنهایی ایجاد کرده و سبب کاهش دوز مصرف یکی یا هر دو ماده می شود (۱۲). مطالعات فراوانی روی اثر هم افزایی دارو ها ترکیبات مختلف با یکدیگر انجام شده از آن جمله می توان به مطالعه ی میرزایی و همکاران در سال ۱۳۹۲ بر روی اثر ضد میکروبی پتتید گیاهی MBP-1 و نانوذرات نقره و ترکیب آنها بر علیه عفونت پوستی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا اشاره کرد. نتایج این پژوهش نشان داد که پپتید گیاهی MBP-1 و نانو ذرات نقره دارای اثر ضد میکروبی بر علیه سودوموناس آئروژینوزا بوده و همچنین ترکیب MBP-1 و نانو ذرات نقره دارای اثر هم افزایی جهت بهبود سریعتر عفونت پوستی ناشی از آن در مدل موشی می باشند (۱۳). علی رغم این مساله مطالعه ای دقیقاً با موضوع مطالعه ی حاضر صورت نگرفته است و ما در این مطالعه قصد داریم

اثر ضد میکروبی استفاده همزمان از اسانس گیاه اکالیپتوس و نانوذرات نقره را بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی بررسی کنیم.

روش بررسی

جمع آوری نمونه

این مطالعه در آزمایشگاه دانشگاه آزاد تنکابن انجام شد. برگهای تازه گیاه اکالیپتوس، از مناطق مختلف شهرستان تنکابن جمع‌آوری شد و در هرباریوم گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به مشخصات ظاهری و توصیفات گیاه شناسی به عنوان Eucalyptus camaldulensis تشخیص داده شد. پس از جمع آوری گیاهان، برگ ها در شرایط مناسب و در سایه خشک گردید و سپس جهت تهیه عصاره، توسط آسیاب برقی پودر شدند.

تهیه اسانس: جهت استخراج اسانس گیاه اکالیپتوس از روش تقطیر با آب[1] و دستگاه اسانس گیری کلونجر[2] استفاده شد، بدین ترتیب که ۱۰۰ گرم از برگ خشک گیاه ابتدا خرد و به بالن ۲ لیتری کلونجر منتقل شد و مقدار ۱ لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. عملیات اسانس‌گیری بمدت ۴ ساعت ادامه یافت. از آنجائیکه اسانس‌ها نسبت به نور، اکسیژن و دما حساسند بلافاصله اسانس استخراج شده به یک شیشه تیره در بسته منتقل و تا زمان استفاده، در یخچال نگهداری شد. از حلال DMSO جهت تهیه ی غلظت های مختلف و همچنین کنترل منفی استفاده شد. غلظت ۰.۱ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس به عنوان استوک تهیه شد. همچنین از محلول استوک نانوذره ی نقره غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون به عنوان استوک تهیه شد.

سویه های مورد مطالعه: باکتری سودوموناس‌آئروژینوزا PTCC 1074 از مجموعه میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. آزمون‌هایی نظیر بررسی مورفولوژی میکروارگانیسم ها و رنگ آمیزی، آزمون های بیوشیمیایی و غیره به منظور تایید میکروارگانیسم استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی: جهت به دست آوردن سوسپانسیون های یکنواخت و همگن از معیار کدورت سنجی استاندارد نیم مک فارلند استفاده شد. سوسپانسیون تهیه شده با کدورت معادل نیم مک فارلند حدود 10^8 سلول می باشد.

تهیه نانوذره نقره: نانوذره نقره با غلظت ۴۰۰۰ قسمت در میلیون به صورت آماده از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد) خریداری شد. سپس به هر اندازه که عصاره رقیق شد نانوذره نیز به همان اندازه رقیق شد. اندازه قطر این ذرات ۲۰ نانومتر بوده و به شکل کروی اند. آنالیز SEM و TEM از نانوذرات فوق نیز از شرکت تولید کننده دریافت شد.

بررسی اثر ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوژن: ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به محیط کشت مولر هینتون آگار وارد شد. سپس از آن کشت سفره ای تهیه گردید. روی هر پلیت ۶ عدد دیسک حاوی غلظت های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲.۵، ۶.۲۵ و ۳.۱۲ میلی گرم در میلی لیتر از اسانس یا نانوذره نقره و یا عصاره تلفیق شده اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شد. این عمل برای هر عصاره سه بار تکرار و در پایان میانگین قطر هاله های ایجاد شده محاسبه شد (۱۴).

بررسی اثر ضد میکروبی به روش چاهک: از سوسپانسیون میکروبی ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت مولرهینتون آگار وارد شد. سپس از آن کشت سفره ای تهیه شد. در محیط ۵ چاهک به قطر ۱ سانتی متر در شرایط استریل ایجاد و در چاهک های ایجاد شده ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲.۵، ۶.۲۵ و ۳.۱۲ میلی گرم در میلی لیتر از اسانس یا نانوذره نقره و یا اسانس تلفیق شده اضافه شد. برای مدتی صبر میکنیم تا عصاره ها در محیط پخش گردند، بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شد. این عمل برای هرعصاره سه بار تکرار شده ودر پایان میانگین قطر هاله های ایجاد شده محاسبه شد (۱۵).

تعیین MIC و MBC: در این مرحله از روش رقیق سازی مایع بر اساس توصیه ی NCCLS برای تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس یا نانوذره نقره و یا اسانس تلفیق شده، استفاده شد. بدین ترتیب که رقت های ۱.۲، ۱.۴، ۱.۸، ۱.۱۶، ۱.۳۲ و ۱.۶۴ از اسانس، نانوذره تهیه شد تا غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲.۵، ۶.۲۵ و ۳.۱۲ میلی گرم در میلی لیتر از اسانس و غلظت های غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲.۵، ۶.۲۵، ۳.۱۲ و ۱.۵ قسمت در میلیون از نانوذره حاصل شود. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون شامل 10^8 CFU ml^{-1} باکتری به محیط مولرهینتون براث حاوی غلظتهای مختلف از کشندگی اسانس یا نانوذره نقره و یا اسانس تلفیق شده، تلقیح شد. سپس محیطهای کشت در دمای 37 درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بعد از انکوباسیون MIC تعیین شده و برای تعیین MBC متعاقباً ۱۰ میکرولیتر از لوله های قبل از لوله MIC بر روی محیط مولرهینتون آگار کشت داده شد و مجدداً در دمای ذکر شده برای هر پاتوژن انکوبه شد و MBC تعیین شد (۱۶).

ارزیابی اثر سینرژیستی: پس از بدست آوردن مقدار MIC و

۱. Hydrodistilation
۲. Clevenger apparatus

MBC هر یک از عوامل ضد میکروبی مورد بررسی به منظور بررسی تاثیر تلفیق مقادیر مختلف عوامل ضد میکروبی مقادیر برابر MIC، دوبرابر MIC و نصف MIC اسانس را با MIC نانوذره (ثابت) به روش رقت در لوله ارزیابی شد (۱۷، ۱۸).

آنالیز آماری: در این مطالعه به منظور بررسی متغیر های کیفی، مقایسه درصد متغیرها و تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS20 استفاده شد. نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ برای آنالیز تمام داده ها بکار برده شد. جهت بررسی وجود تفاوت بین اسانس، نانوذره و حالت ترکیبی از آزمون ناپارامتریک فریدمن و به منظور بررسی تفاوت بین هر یک با دیگری به طور مجزا از آزمون زوجی استفاده شد. مقدار p کمتر از ۰.۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج روش انتشار در دیسک و چاهک

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، روشهای انتشار در دیسک و چاهک در بررسی تاثیر اسانس گیاه اکالیپتوس، نانوذره نقره و اسانس تلفیق شده بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا چندان موثر نبودند، بطوریکه هاله عدم رشد مناسب در هیچ کدام از غلظت‌ها مشاهده نشد.

نتایج روش رقت در لوله

MIC وMBC بعد از ۳ بار تکرار برای غلظت های مختلف اسانس اکالیپتوس و نانوذره نقره در جدول ۱ و ۲ آمده است.

بر اساس یافته‌های حاصل MIC (حداقل غلظت باز دارندگی) در برابر اسانس اکالیپتوس پس از سه بار تکرار برابر ۱۲.۵ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. MBC (حداقل غلظت کشندگی) در غلظت ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر اسانس بدست آمد.

همانطور که در جدول۲ نشان داده شده است، مقدار MIC و MBC نانوذره ی نقره برای سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب شامل غلظت‌های ۳.۱۲ قسمت در میلیون و ۶.۲۵ قسمت در میلیون بود.

بعد کشت لوله ها بر روی محیط مولر هینتون آگار لوله ی مربوط به ۱۲.۵ میلی گرم بر میلی لیتر اسانس اکالیپتوس با نانوذرات نقره ۱.۵ قسمت در میلیون هیچ گونه رشدی مشاهده نشد که به عنوان MBC تلقی شد.

نتایج آنالیز آماری

آزمون ناپارامتریک فریدمن نشان داد بین تاثیر اسانس اکالیپتوس، نانوذره و حالت تلفیقی به طور کلی علیه سودوموناس آئروژینوزا تفاوت معنی داری وجود ندارد (p=0.135). برای مقایسه هر یک با دیگری از آزمون زوجی استفاده شد که نتایج این آزمون تفاوت معنی دار تاثیر نانوذره (p= 0.205) و حالت تلفیقی (p= 0.205) را نسبت به اسانس اکالیپتوس نشان نداد. همچنین تفاوت معنی داری بین نانوذره و حالت تلفیقی نسبت به یکدیگر مشاهده نشد (p= 0.204).

بحث و نتیجه گیری

بنابر نتایج حاصل از این مطالعه تاثیر تلفیق نانوذرات با اسانس اکالیپتوس مثبت ارزیابی شد ولی به لحاظ آماری در مقایسه با اسانس اکالیپتوس یا نانوذره معنی دار نبود. مهمترین مسئله ای که این ادعا را اثبات می کند، مهار کامل رشد سودوموناس آئروژینوزا، در غلظت ۶.۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر اسانس اکالیپتوس با نانوذرات نقره ۱.۵ قسمت در میلیون بود که در واقع سبب افزایش تاثیر پذیری دو عامل ضدمیکروبی یاد شده و کاهش میزان استفاده از آنها شد. این در حالیست که ما رشد سودوموناس آئروژینوزا را در غلظت های یاد شده برای اسانس و نانو نقره به تنهایی شاهد بودیم (جدول ۱و۲).

نانوذرات نقره به چندین طریق ممکن علیه باکتری ها عمل می کنند: بر همکنش یون های نقره با گروه های تیول آنزیم ها و پروتئین هایی که برای زنجیره تنفسی باکتری ها و انتقال مواد مهم از غشای سلولی به بیرون و به داخل سلول اهمیت دارند، (۱۹) یا اتصال یون های نقره به دیواره سلولی یا غشای بیرونی باکتری و تغییر عملکرد غشای سلولی باکتری (۲۰). نقره می تواند سیستم آنزیماتیک زنجیره تنفسی را مهار و سنتز DNA را تغییر دهد (۲۱)(۲۲).

خواص کشندگی زیستی نانوذرات نقره به شدت به خواص فیزیکی-شیمیایی مانند اندازه، شکل و بار سطحی وابسته است. با این وجود، نتایج اخیر نشان می دهد که مهمترین عامل، قابلیت رهایش یون های نقره به وسیله ی نانوذرات است که تصور می شود عامل اصلی سمیت باکتریایی باشد. مهندسی نمودن نانوذرات نقره به منظور تنظیم پدیده رهایش یون نقره، علاوه بر کنترل فرایند رهانش، مسیر قدرتمندی را برای ساخت داروهای ضدباکتریایی جدید فراهم می سازد (۲۳).

مطالعات بسیاری در زمینه ترکیب نانوذرات نقره با ترکیبات

طبیعی از جمله عصاره ها انجام شده از آن جمله مطالعه ی شریفی راد و همکاران در۲۰۱۴ است که اثر سینرژیسم ضد میکروبی آلیسین سیر و نانوذرات نقره را روی عفونت پوستی ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) بررسی کردند. نتایج مطالعه مقدار MIC و MBC آلیسین به ترتیب برابر با ۲.۲ و ۵.۶ میلی گرم بر میلی لیتر نشان داد. مقدار MIC و MBC نانوذره AgNPs نیز به ترتیب ۳.۱ قسمت در میلیون و ۷.۵ قسمت در میلیون بود. اما MIC و MBC آلیسین و نانوذره همراه با هم به ترتیب ۰.۴ میلی گرم بر میلی لیتر و ۱.۱ قسمت در میلیون بود. نتایج In vivo برای کنترل، نانوذرات نقره، آلیسین و نانوذره همراه با آلیسین به بترتیب برابر با ۳۷۷×۱۰^{۸}، ۸۰×۱۰^{۶}، ۴۳×۱۰^{۵} و صفر CFU بر میلی لیتر بود (۲۴).

در پژوهشی در سال ۲۰۱۲، تعیین اثر نانو ذرات نقره توام با عصاره اتانولی اکالیپتوس بر مهار رشد E.coli به روش دیسک آنتی بیوگرام مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین اثر مهار کنندگی بر روی رشد این باکتری ۶ روز پس از تیمار با ترکیب توام نانو نقره در غلظت ۵۰ قسمت در میلیون با عصاره اتانولی اکالیپتوس در شرایط in vitro بدست آمد (۱۷).

در مطالعه دیگری، اثر سینرژیک عصاره الکلی اکالیپتوس و نانو نقره در مهار رشد قارچ آسپرژیلوس نایجر را مورد سنجش قرار دادند. قارچ ابتدا با نانو نقره تحت تیمار قرار گرفت و همچنین با مخلوط نانو نقره (۱۲.۵ قسمت در میلیون) و عصاره اتانولی اکالیپتوس(با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) مورد ارزیابی قرارگرفت. سپس، مرفولوژی تغییرات و تعداد کلنی در گروه مورد و شاهد مقایسه شد. نتایج این تحقیقات نشان داد، نرخ رشد آسپرژیلوس نایجر به طور قابل توجهی پس از ۸ روز درمان کاهش یافته است. نتایج این پژوهش نشان داد که مخلوط نانو ذرات نقره و عصاره اتانولی اوکالیپتوس در درمان بیماری های قارچی انسان مفید خواهد بود(۱۸).

در مطالعه ای در سال ۱۳۹۲، اثر ضد میکروبی پتتید گیاهی MBP-1 و نانوذرات نقره و ترکیب آنها بر علیه عفونت پوستی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا بر اساس تستهای حساسیت ماکرودیلوشن و میکرودیلوشن مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج نشان داد حداقل غلظت ممانعت از رشد(MIC) و حداقل غلظت کشنده باکتری(MBC) برای این پپتید ۵۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در میلی لیتر و برای نانوذرات نقره ۳.۱۲ و ۶.۲۵ قسمت در میلیون اندازه گیری شد. MIC و MBC ترکیب نانو ذرات و پپتید، به ترتیب mg.ml ۱.۵۶-۴۰۰ قسمت در میلیون و mg.ml ۳.۱۲۵-۵۰۰ قسمت در میلیون به دست آمد. نتایج این پژوهش نشان داد که پپتید گیاهی MBP-1 و نانو ذرات نقره دارای اثر ضد میکروبی بر علیه سودوموناس آئروژینوزا بوده و همچنین ترکیب MBP-1 و نانو ذرات نقره دارای اثر هم افزایی جهت بهبود سریعتر عفونت پوستی ناشی از آن در مدل موشی است(۱۳).

در مطالعه حاضر موثرترین ترکیب در مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا، ترکیب mg.ml ۱۲.۵ اسانس با ۱.۵ قسمت در میلیون نانوذرات نقره بود که در واقع سبب افزایش تاثیر پذیری دو عامل ضدمیکروبی یاد شده و کاهش میزان استفاده از آنها شد.

نتایج این پژوهش نشان داد افزودن اسانس اکالیپتوس به نانوذرات نقره، سبب کاهش MIC نانوذرات نقره و افزایش اثر آن بر روی سودوموناس آئروژینوزا می شود. پیش‌بینی می‌شود که با توجه به اختلالي که نانوذرات در دیواره سلولي و غشاء سیتوپلاسمي باکتری ایجاد مي کنند، توانایی اثر عصاره که پیش از این توانایي ورود به باکتری مقاوم را نداشت، بیشتر شده و توانسته با ورود به سلول اثر باکتری کشی خود را اعمال کند.

در پایان شایان ذکر است، با توجه به اهمیت گیاهان و لزوم حفظ آنها، استفاده از راهکارهای افزایش غلظت موثر و کاهش میزان استفاده از آنها می تواند از نظر زیست محیطی و اقتصادی به صرفه باشد. از سوی دیگر هرچه که غلظت نانو ذرات نقره مورد استفاده کمتر شود، قطعا از خاصیت سمي و مخرب آن ها کاسته خواهد شد لذا استفاده از اسانس برگ گیاه اکالیپتوس در کنار نانو ذره می تواند راهکاری برای استفاده بهینه از هر دو عامل درماني و کاهش سمیت هر دو ماده استفاده شده در اثر استفاده از دوز پایین تر باشد. نتایج اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره، قطعا به کاربرد بیشتر آنها به عنوان گروه جدیدی از عوامل ضد باکتریایی منجر می شود. داده های این مطالعه نشان داد نانو نقره در تلفیق با اسانس اکالیپتوس فعالیت کشندگی بر روی سودوموناس آئروژینوزا دارد و در نتیجه می تواند فرصت مناسبی برای صنایع داروسازی و نانو فراهم کند.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح پژوهشی می باشد که توسط معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن تامین اعتبار شد. مولفین این اثر از تمامی اعضای معاونت پژوهشی و آزمایشگاه دانشگاه آزاد واحد تنکابن تشکر و قدردانی می کنند.

منابع

1. Rios JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity.J Ethnopharmacol 2005; 100(1-2): 80-84.
2. Van Deleden Ch, Iglewski B.H. Cell to cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerg. Infect. Dis 1998; 4: 551-559.
3. Samsam Shariat H, Moattar F. Plants and natural medicines. Isfahan: Mashat 1981; 431–32[Persian]
4. Sattari M, Shahbazi N, Najar Peeryeh Sh. An assessment of antibacterial effect of alcoholic and aquatic extracts of Eucalyptus leaves on Pseudomonas aeruginosa. Modares J of Med Sci : Pathobiology 2006; 8(1): 19-23[Persian]
5. Srinivasan D, Nathan S, Suresh T. Antimicrobial activity of certain indian medicinal plants used in folkoric medicine. J. Ethnopharmacol 2001; 74: 217-220.
6. Narayanan K. B, Sakthivel N," Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents", Jornal of Advances in Colloid and Interface Science2011; 169: 59–79.
7. Taylor, E., & Webster, T. J. Reducing infections through nanotechnology and nanoparticles. International journal of nanomedicine 2011; 6:1463
8. Rao, C. R., Kulkarni, G. U., Thomas, P. J., & Edwards, P. P. Metal nanoparticles and their assemblies. Chemical Society Reviews 2000; 29(1): 27-35.
9. Kora AJ, Arunachalam J. Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on Pseudomonas aeruginosa and its mechanism of action. World J Microbiol Biotechnol 2011; 27(5):1209-1216.
10. Wright,J B , Lam, K., Hansen, D , Burrell ,R E. Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. American Journal of Infection Control 1999; 27:344-350.
11. Marambio-Jones, C., Hoek, E.M.V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J Nanopart Res 2010; 12(5): 1531-1551.
12. Biavatti MW. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. Braz J Pharm Sci 2009;45(3):371-378.
13. Mirzaei F, Salouti M, Shapouri R, Heidari Z. Antimicrobial effect of plant peptide MBP-1 and silver nanoparticles, along with their synergistic effect on skin infection due to Pseudomonas aeruginosa: in vitro and animal model. Pajoohandeh Journal 2013; 18 (2) :64-68[Persian]
14. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard M02-A10. 10th. CLSI, Wayne. 2009; PA. 29: 1.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution: antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically M-7-A5. 5th. NCCLS Wayne. 2000; PA, 20: 2.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standards. NCCLS Document M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne. 2001.
17. Naghsh, N., Ghiasian, M., Soleymani, S., & Torkan, S. Investigation of Eucalyptus and nanosilver as a new nanomixture for growth inhibition of E. coli. IJMCM 2012a; 2: 138-140.
18. Naghsh, N., Ghyasiyan, M., Soleimani, S., & Torkan, S.. Comparison between alcoholic eucalyptus and nano-silver as a new nanocomposition in growth inhibition of Aspergilus niger. Indian Journal of Science and Technology 2012b; 5(S3): 2445-2447.
19. Cho , K.H., Park , J E., Osaka ,T , Park , S G. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient . Electrochimica Acta 2005; 51: 956-960
20. Percival ,S L , Bowler ,P G , Russell ,D. Bacterial resistance to silver in wound care. Journal of Hospital Infection 2005; 60: 1-7

21. Brett ,D W. A discussion of silver as an antimicrobial agent: alleviating the confusion. Ostomy Wound Manage 2006; 52(1): 34-41
22. Hidalgo, E , Dominguez ,C . Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts . Toxicol Lett 1998;98(3):169-179
23. Loris Rizzello , Pier Paolo Pompa "Nanosilver-based antibacterial drugs and ,.devices: Mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines", Chem. Soc. Rev 2014; 43: 150
24. Sharifi Rad J, Hoseini Alfatemi SM, Sharifi Rad M, Iriti M. Antimicrobial Synergic Effect of Allicin and Silver Nanoparticles on Skin Infection Caused by Methicillin Resistant Staphylococcus aureus spp. Ann Med Health Sci Res 2014; 4 (6): 863-868

جدول ۱: نتایج بررسی میزان حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) غلظت های مختلف اسانس اکالیپتوس بر روی سودوموناس آئروژینوزا (برحسب میلی‌گرم بر میلی لیتر)

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶
غلظت اسانس(mg.ml)	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲.۵	۶.۲۵	۳.۱۲
کدورت در لوله	-	-	-	-	+	+
رشد باکتری در محیط جامد	-	-	-	+	+	+

(در جدول فوق علامت + نشان دهنده رشد میکروارگانیسم و علامت – نشان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم است)

جدول ۲: نتایج بررسی MIC و MBC نانوذرات نقره به روش رقت در لوله (قسمت در میلیون)

غلظت نانوذرات(قسمت در میلیون)	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲.۵	۶.۲۵	۳.۱۲	۱.۵
کدورت در لوله	-	-	-	-	-	-	+
رشد باکتری در محیط جامد	-	-	-	-	-	+	+

(در جدول فوق علامت + نشان دهنده رشد میکروارگانیسم و علامت – نشان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم است)

جدول ۳: نتایج بررسی تاثیر تلفیق نانوذرات نقره (غلظت ۱.۵ قسمت در میلیون) با اسانس اکالیپتوس (غلظت های ۲۵، ۱۲.۵ و ۶.۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) بر روی رشد سودوموناس آئروژینوزا

	غلظت نانوذرات= ۱.۵ قسمت در میلیون			
غلظت اسانس اکالیپتوس(mg.ml)	MIC.4	MIC.2	MIC	۲MIC
	(۳.۱۲)	(۶.۲۵)	(۱۲.۵)	(۲۵)
کدورت در لوله	+	-	-	-
رشد باکتری در محیط جامد	+	+	-	-

(در جدول فوق علامت + نشان دهنده رشد میکروارگانیسم و علامت – نشان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم است)

Synergic effect of eucalyptus leaves oil and Nano silver against Pseudomonas aeruginosa

Masoud Mobini [1*], Marryam AsgharHeydari [1]

1.MSc in Biology, Islamic Azad University, Young Researchers and Elite Clup , Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran.

***Corresponding Author:** Masoud Mobini, Young Researchers and Elite Clup , Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran

Email: mobini.m61@gmail.com

Abstract

Introduction: By respect to the spread of getting resistance to antimicrobial agents, new therapeutic methods such as plant-derived compounds and nanoparticles to killing the antibiotic-resistant pathogens are urgently required. This study was done to evaluate the synergic effect of leaves *eucalyptus* extract and nanosilver particles against *Pseudomonas aeruginosa*.

Material and methods: This experimental study was performed in Islamic Azad University. The disc diffusion method, well diffusion method and broth dilution assay was used in this study. Data were analyzed by SPSS-20 software.

Results: Result showed that all material has no effect on Pseudomonas aeruginosa by disk diffusion and well diffusion. In Broth dilution method, the MIC of eucalyptus leaves oil and Nano silver particles against Pseudomonas aeruginosa were 12.5 mg.ml and 3.12 ppm respectively and the MBC were 25 mg.ml and 6.25 ppm. The MIC and MBC of eucalyptus oil-Nano silver particles were 6.25 and 12.5 mg.ml respectively along with 1.5 ppm of Nano silver particles.

Conclusion: This study showed that Nano silver with 1.5 ppm concentration mixed with 6.25 mg.ml of eucalyptus oil has synergic effect on inhibiting the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. The combined therapy caused increased effect and decreases the use of medicine and subsequently the decrease of toxification effect of medicine in order to therapy of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa.*

Keywords: Synergic effect*, Eucalyptus leaves oil,* Nano silver*, Pseudomonas aeruginosa, MIC*