

تاثیر تداخلی عصاره الکلی بره موم، اسانس آویشن و نانوذرات نقره روی باکتری ها و مخمر *کاندیدا آلبیکنز* در شرایط آزمایشگاهی



مریم اسکندری نیا^۱، سلمان احمدی اسب چین^{۱*} و عبدالغفار اونق^۲

^۱ ایران، بایلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه

^۲ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۴

چکیده

امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی به علت تهدید کردن سلامت بشر عامل نگران کننده‌ای برای کشورها محسوب می‌گردد. بنابراین محققین به دنبال ترکیبات ضد میکروبی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های طبیعی هستند که بتوانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک باشند. در مطالعات قبلی محققین، خواص ضد میکروبی بره موم، آویشن و نانوذرات نقره اثبات شده است. متأسفانه هر کدام از این مواد برای تاثیر حداکثر به صورت انفرادی، به غلظت بالایی از ماده اصلی موثر بر میکروارگانیسم‌ها نیاز دارند. از طرفی غلظت بالای این مواد دارای خاصیت سمی است و عوارض جانبی به همراه دارد. به همین سبب با فرض اینکه این مواد با غلظت کمتر و در ترکیب با سایر مواد ضد میکروبی همان تاثیر اولیه یا بیشتری دارد، مطالعه‌ای جهت بررسی تاثیر تداخلی عصاره اتانولی بره موم، اسانس آویشن و نانوذرات نقره بر باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه*، *لیستریا مونوسیتوژنز*)، باکتری‌های گرم منفی (*پروتئوس میرابلیس*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سودوموناس آنترژیوزا*) و مخمر *کاندیدا آلبیکنز* انجام شد. باکتری‌ها و مخمر *کاندیدا آلبیکنز* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. بره موم از کندوهای نواحی مختلف استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شد و عصاره اتانولی بره موم پس از ۳ روز تهیه شد. تاثیر تداخلی این مواد با روش میکرودايلوشن براث در محیط کشت مولر هیتون براث در حضور جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت در سویه‌های باکتریایی و نیستاتین جهت کنترل مثبت مخمر *کاندیدا آلبیکنز* بررسی شد. حداقل غلظت مهارکنندگی بدست آمده موثر بودن این مواد را بصورت تداخلی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: بره موم، آویشن، نانو ذرات نقره، حداقل غلظت مهار کنندگی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۰۱، پست الکترونیکی: Sa.Ahmadi@umz.ac.ir

مقدمه

با فرمولاسیون جدیدتر و قوی تر می‌گردد. نتیجه‌ی این مقاومت کاهش اثر این داروهاست که موجب می‌شود درمان بیماران دشوار، پر هزینه و یا حتی غیر ممکن شود. از طرفی به سبب طولانی شدن دوره بیماری، سالانه دولتها هزینه‌های زیادی را متحمل می‌شوند. به همین جهت تلاش بر این است که عصاره‌های طبیعی جایگزین

مقاومت در پاتوژن‌های انسانی یک چالش بزرگ در زمینه‌های دارویی و پزشکی است. این مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در نتیجه‌ی مصرف مداوم و بی‌رویه ترکیبات دارویی شیمیایی رخ داده و نهایتاً سبب ایجاد پدیده مهم مقاومت در میکروارگانیسم‌ها شده است. با ایجاد این پدیده اثر داروها ضعیف و یا ختنی شده و در نهایت باعث افزایش مقدار مصرف دارو و تمایل به استفاده از ترکیبات

تحقیقات دانشمندان مختلف، طیف وسیعی از اثرات این ترکیب شامل خواص آنتی‌اکسیدان، ضد باکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، ضد پوسیدگی دندان و ضدتوموری را نشان داده است (۱۵-۱۹).

ماده دیگری که از لحاظ دارویی حائز اهمیت می‌باشد گیاه آویشن است. آویشن گیاهی از خانواده نعنائیان است که به علت خواص خود از جمله خلط آور بودن، ضدسرفه، ضدبرونشیت، ضد کرم و ادرار آور بودن به طور گسترده در طب سنتی کاربرد دارد. نام علمی آن *Thymus vulgaris* است و با نام محلی آن زاتار (Zaatar) یا زایترا (zaitra) نیز خوانده می‌شود. خواص آروماتیک و دارویی جنس تیموس موجب شده که یکی از مشهورترین گیاهان در دنیا شود. گونه‌های تیموس عموماً به عنوان چای‌های گیاهی و نیز به عنوان چاشنی و به عنوان گیاهان دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۶). نتایج منتشر شده نشان می‌دهد که بیشتر ترکیبات فرار بدست آمده از بخش‌های هوایی گیاه شامل گرانیا، لینالول، گاما ترپینول، ترپینول، کارواکرول و تیمول می‌باشد. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که گونه‌های تیموس دارای خواص ضدباکتریایی، ضد ویروسی، ضدقارچی، ضد انگلی و خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (۱۴)، اسانس‌ها بر قارچ‌ها اثر مهاری دارند و اثر قارچ‌کشی اسانس‌های گیاهی از اثر باکتری‌کشی آنها ضعیف‌تر است. اثر ضد میکروبی اسانس مربوط به جزء تیمول و کارواکرول و به ویژه تیمول آن است. این اسانس می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات آتی به منظور ساخت ضد عفونی کننده‌ها و مکمل‌های غذایی جهت کنترل بیماری‌های انسانی و حیوانی باشد (۱۸).

همچنین نقره نیز از دیرباز در علم پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نقره عنصر سفید و براق فلزی می‌باشد و در موقعیت چهل و هفتم جدول تناوبی قرار گرفته و با نماد Ag که از کلمه *Argentum* می‌آید، نشان داده می‌شود. نقره خالص دارای بالاترین هدایت الکتریکی و گرمایی در

ترکیبات شیمیایی شود چرا که دارای اثرات جانبی کمتر هستند و نیز مقاومت دارویی ایجاد نمی‌کنند.

از جمله مواد طبیعی که دارای خاصیت ضد میکروبی است بره موم می‌باشد. بره موم (پروپولیس) (propolis) از لغت (پرو) به معنای پیش و (پلیس) به معنای شهر تشکیل شده است (۳). بره موم از فراورده‌های فرعی زنبور عسل می‌باشد و بشر طی قرن‌های گذشته از آن در طب سنتی استفاده کرده است. بره موم عبارتست از یک ماده رزینی، سفید و قهوه‌ای رنگ که توسط زنبور عسل از صمغ، جوانه و سایر بخش‌های گیاهان مختلف از جمله: اکالیپتوس، صنوبر، شاه بلوط، کاج، نارون، بید و سپیدار تهیه می‌شود (۱-۴). ترکیب شیمیایی بره موم به دلیل جمع آوری آن از بخش‌های مختلف گیاهان مناطق متفاوت می‌تواند بسیار متنوع باشد و بستگی به نوع پوشش گیاهی هر منطقه دارد (۱۰). ماده اولیه پس از جمع آوری تحت تاثیر آنزیم بتاگلوکوزیداز مترشح از غدد زیر حلقی زنبور عسل هیدرولیز شده و حشره از بره موم برای بستن درز و شکاف‌های کندو از آن استفاده می‌کند (۲۱). این ماده وقتی سرد است بصورت سخت و شکننده و وقتی گرم است بصورت قابل انعطاف و چسبناک است از این جهت به آن چسب زنبور عسل نیز می‌گویند، بو و رایحه مطلوبی دارد و بسته به نوع منبع و سن دارای رنگ‌های متفاوتی است (۲۰-۱۹). بره موم حاوی حدود ۵۰ درصد صمغ یا رزین گیاهان، ۳۰ درصد موم، ۱۰ درصد اسیدهای چرب ضروری، ۵ درصد گرده گل و ۵ درصد دیگر آن از ترکیبات آلی تشکیل شده است (۲۴).

پلی‌فنل‌ها به دلیل قابلیت مهار آنزیم‌ها از نظر فارماکولوژیکی جزء فعال بره موم بوده و از این نظر مورد توجه هستند. همچنین مطالعات بالینی نشان داده است که بره موم حاوی غلظت بالایی از فلاونوئیدها بوده که به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی بطور گسترده‌ای از آن برای تهیه مواد بهداشتی و دارویی استفاده می‌شود (۲۵).

طور وسیعی در پزشکی جهت مقابله با میکروب‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۲).

از مهمترین ویژگی‌های نانوذرات نقره می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: غیرمضر بودن و ایمن بودن آن برای انسان، دام، طیور، آبزیان، محیط زیست و دیگر موجودات زنده، قابلیت خوراکی برای انسان و دیگر موجودات زنده، قدرت بالای میکروب‌کشی، قارچ‌کشی، باکتری‌کشی و ویروس‌کشی، ماندگاری طولانی بدون ایجاد سازگاری و مقاومت در میکروارگانسیم‌ها، فعال در pH مختلف، مقاومت بالایی حرارتی تا دمای ۹۵۰ درجه سانتی‌گراد حتی در غلظت‌های پایین، قابلیت امتزاج بالا با دیگر مواد و افزایش پوشش دهی، دارای خاصیت چسبندگی و براق‌کنندگی موادی همچون رنگها و رزین‌ها می‌باشد.

در این تحقیق، تاثیر تداخلی عصاره اتانولی بره‌موم، اساس آویشن و نانوذرات نقره بر باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه*، *لیستریا مونوسیژنوز*) و باکتری‌های گرم منفی (*پروتئوس میرابیلیس*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سودوموناس آئروژینوزا*) و مخمر *کاندیدا آلبیکنز* انجام شد. انتخاب این میکروارگانسیم‌ها با توجه به اهمیت آنها در پزشکی و نقش آنها در بیماری‌های افراد صورت گرفته است.

مواد و روشها

تهیه عصاره الکلی بره‌موم: بره‌موم و عصاره‌های آن باید در ظروف بدون منفذ و بصورت سربسته در تاریکی، ترجیحاً در دمای کمتر از ۱۰-۱۲ درجه سلسیوس و به دور از گرمای زیاد و بصورت مستقیم، نگهداری شوند. برای آسان کردن شرایط نگهداری و مصرف بره‌موم، آن را خشک و یا پودر می‌کنند. همچنین برای استفاده بهتر از خواص بره‌موم به عصاره‌گیری آن نیاز است. محلول دارای ۷۰ درصد الکل فعال‌ترین محلول برای عصاره‌گیری بره‌موم است. مورد استفاده در این پژوهش از

بین تمامی عناصر می‌باشد. همراه با طلا، که از عناصر کمیاب و گرانبها هستند نقره به طور گسترده‌ای در تاریخ بشر برای هزاران سال به کار برده شده است. نقره قادر است ۶۵۰ نوع بیماری را که ناشی از میکروارگانسیم‌هاست از بین ببرد. طبق تحقیقات انجام شده مشخص شده است که نانوذرات فلزی علاوه بر اثر مهاری ذره، به دلیل اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم زیادی که دارند باعث تماس بیشتر با فضای بیرون می‌شوند و اثر ضدباکتریایی خود را القا می‌کنند. همچنین مشخص شده از بین نانوذرات فلزی، نانوذرات نقره در مقایسه با سایر نانوذرات فلزی دیگر، فعالیت ضدباکتری بیشتری دارد (۲۲).

پودر نقره از نظر هیپوکراتیس (Hippocrates)، پدر علم پزشکی نوین، دارای اثرات شفادهنگی و ضد مریضی بوده و در لیست درمانی برای زخم‌ها قرار داشت (۲۴). ترکیبات نقره به مقدار زیادی در کاربردهای پزشکی داخل شده‌اند. ترکیبات نقره سلاح اصلی در مقابل زخم‌های عفونی در جنگ جهانی اول بود تا اینکه آنتی‌بیوتیک‌ها تولید شدند. در سال ۱۸۸۴ پزشکان متخصص آلمانی محلول چشمی یک درصد نترات نقره را برای جلوگیری از Gonococcal Ophthalmia Neonatorum معرفی نمودند که گفته می‌شود اولین مقاله علمی مستند برای کاربردهای پزشکی نقره می‌باشد. به علاوه استفاده از کرم‌های سولفادین (Solpadeine) نقره برای مصارف ضد باکتریایی است که به طور گسترده‌ای برای زخم‌ها و سوختگی‌های شدید استفاده می‌شود (۲۴).

نانوپارتیکل‌ها از جمله نانوذرات نقره، بخش در حال توسعه بسیار سریع دانش نانو تکنولوژی می‌باشد. ویژگی‌های منحصر بفرد وابسته به سایز آنها، این مواد را در بیشتر جوانب فعالیت‌های بشری با ارزش و ضروری ساخته است. نانو ذرات نقره ذراتی با اندازه ۱-۱۰۰ نانومتر هستند که استفاده از آنها در مقابله با عفونت‌ها روز به روز در حال افزایش است به طوری که نانوذرات نقره امروزه به

آزمون تعیین حساسیت: از روش براث میکرودابلاوشن برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) و (MFC) استفاده شد. در این روش رقت‌های عصاره اتانولی بره‌موم، اسانس آویشن و نانوذرات نقره به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به طور جداگانه در هر چاهک حاوی محیط کشت مایع مولر-هینتون (به میزان ۸۰۰ میکرولیتر) میکروپلیت‌های ۴۸ خانه‌ای (۶×۸) تهیه گردید. در هر یک از ردیف‌های میکروپلیت، باکتری‌ها و در هر یک از ستون‌ها رقت‌های داروی انتخابی و به منظور کنترل مثبت و کنترل منفی در دو ستون پایانی به ترتیب داروی جنتامایسین یا نیستاتین و آب مقطر اضافه شد. در مرحله بعد سوسپانسیون باکتری‌های مورد مطالعه معادل لوله نیم‌مک‌فارلند (۱۰^۸×۱-۲) در سرم فیزیولوژی تنظیم و غلظت‌های ثابتی از آنها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر توسط سمپلر به هر چاهک اضافه و میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون نتایج هر خانه ثبت گردید. آزمایش با سه تکرار انجام شد. در مرحله آخر تأثیرات تداخلی مواد مورد بررسی قرار گرفت.

طبق تعریف (مطابق با دستورالعمل کمیته ملی راهنمای استاندارد آزمایشگاهی بالینی (NCCLS= National Committee for Clinical Laboratory Standard Guideline)، MIC برابر است با کمترین غلظتی از داروی مورد نظر که مانع رشد باکتری‌های مورد آزمایش گردد (غلظت آخرین چاهکی که در آن هیچ کدورتی ایجاد نشده باشد). همچنین طبق تعریف MBC برابر است با حداقل غلظتی از داروی مورد نظر که ۹۹/۹ درصد از تراکم اولیه باکتری را کاهش دهد.

در هر کدام از ردیف‌های میکروپلیت، باکتری‌ها (به ترتیب از بالا شامل استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه، لیستریا مونوسیتوژنز، پروتئوس میرابیلیس، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا) و در هر کدام از ستون‌ها به ترتیب از سمت راست: جنتامایسین (کنترل

کندوهای زنبور عسل واقع در نواحی مختلف آذربایجان غربی جمع آوری شد و در اسرع وقت به آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی منتقل و تا زمان عصاره‌گیری در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ابتدا قطعات بزرگ بره‌موم به قطعات ریز خرد شده سپس ۲۵ گرم آن در ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط و ۴۸ ساعت در دمای اتاق باقی مانده و ۲۴ ساعت در دمای اتاق در سطح افق تکان داده شد. سپس عصاره الکلی سه بار با گازاستریل چهارلایه و یک بار با کاغذ صافی نمره ۴۲ واتمن صاف شد. سپس عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت و کاملاً خشک شده و عصاره خالص آن بدست آمد. سپس عصاره خالص بدست آمده توزین و با استفاده از آب مقطر محلول ۲۰۰۰۰ ppm آن تهیه و تا زمان استفاده در ظرف شیشه‌ای تیره و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اسانس آویشن: اسانس آویشن خالص از شرکت بارچ اسانس کاشان خریداری شد.

نانوذرات نقره: نانوذرات نقره استفاده شده در پژوهش به اندازه ۳۰-۵۰ نانومتر از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیا-مشهد به شماره ساخت ۲۲_۷۴۴۰_۴ خریداری و رقت‌سازی شد.

تهیه سویه‌ها: میکروارگانیزم‌های به کار برده در این پژوهش از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد که شامل باکتری‌های استافیلوکوکوس - اورئوس (PTCC1112)، استرپتوکوکوس پنومونیه (PTCC1240)، لیستریا مونوسیتوژنز (PTCC1163)، پروتئوس میرابیلیس (PTCC1776)، کلبسیلا پنومونیه (RITCC1240)، سودوموناس آئروژینوزا (PTCC1310) و مخمر کاندیدا آلبیکنز (PTCC5027) می‌باشد.

نتایج حاصل از آزمون براث میکروداپلوشن یعنی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره اتانولی بره‌موم، اسانس آویشن و نانوذرات نقره نشان می‌دهد که عصاره بره‌موم اسانس آویشن و نانوذرات نقره بر تمام میکروارگانیسم‌ها موثر بوده است. اسانس آویشن در مقایسه با عصاره اتانولی بره‌موم با رقت کمتر روی میکروارگانیسم‌ها تاثیر داشت و نسبت به عصاره بره‌موم موثرتر بود. اما تاثیر تداخلی عصاره اتانولی بره‌موم با نانوذرات نقره بیشتر از تاثیر تداخلی اسانس آویشن و نانوذرات نقره شد. جنتامایسین ۸۰ و نیستاتین ۸۰ بعنوان کنترل مثبت استفاده شدند. جزئیات بیشتر در خصوص تیمارها در جدول‌ها آمده است.

مثبت)، آب مقطر (کنترل منفی) و از ستون ۳ تا ۸ رقت‌های داروی مورد استفاده از غلظت کم به زیاد (۱۲/۵_۲۵_۵۰_۱۰۰_۲۰۰).

رقت‌ها ابتدا در لوله‌های آزمایشگاهی تهیه شده و به ترتیب به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. در حالت تداخلی نیز به همین ترتیب رقت‌سازی نموده و از هر رقت به میزان ۵۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شد.

نتایج

در این مطالعه خاصیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی بره‌موم، اسانس آویشن و نانوذرات نقره بر باکتری‌ها و مخمر *کاندیدا آلبیکنز* با روش براث میکروداپلوشن بررسی شد.

جدول ۱- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) و عصاره اتانولی بره‌موم، اسانس آویشن و نانوذرات نقره (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

تیمار	استافیلوکوکوس اورئوس		استرپتوکوکوس پنومونیه		پروتئوس میرابیلیس		کلبسیلا پنومونیه		سودوموناس آئروژینوزا		کاندیدا آلبیکنز	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
بره‌موم	۲۰۰	-	۱۰۰	-	۲۰۰	-	۲۰۰	-	۲۰۰	-	۵۰	-
اسانس آویشن	۵۰	۲۰۰	۵۰	-	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۲۰۰	۲۰۰	-	۲۵	۱۰۰
نانوذرات نقره	۱۰۰	-	۵۰	-	۵۰	-	۲۵	۵۰	۵۰	-	۱۲/۵	-
جنتامایسین	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	-	-
نیستاتین	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۸۰	۸۰

جدول ۲- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) حاصل از تاثیر تداخلی عصاره اتانولی بره‌موم، اسانس آویشن و نانوذرات نقره بر باکتری‌های گرم مثبت (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

تیمار	استافیلوکوکوس اورئوس		استرپتوکوکوس پنومونیه		لیستریا مونوسیتوژنز	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
بره‌موم و نانوذرات نقره	۱۰۰	-	۵۰	-	-	۱۰۰
اسانس آویشن و نانوذرات نقره	۱۰۰	-	۱۰۰	-	-	۲۰۰
جنتامایسین	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰

جدول ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) حاصل از تاثیر تداخلی عصاره اتانولی بره‌موم، اسانس آویشن و نانوذرات نقره بر باکتری‌های گرم منفی (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

تیمار		پروتئوس میرابیلیس		کلبسیلا پنومونیه		سودوموناس آئروژینوزا	
		MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
بره‌موم و نانوذرات نقره		۱۰۰	۱۰۰	۲۵	۵۰	۵۰	-
اسانس آویشن و نانوذرات نقره		۲۰۰	-	۵۰	۱۰۰	۵۰	-
جنتامایسین		۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰

جدول ۴- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) حاصل از تاثیر تداخلی عصاره الکلی بره‌موم، اسانس آویشن و نانوذرات نقره بر مخمر کاندیدا آلبیکنز (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

تیمار		مخمر کاندیدا آلبیکنز	
		MFC	MIC
بره‌موم و نانوذرات نقره		-	۵۰
اسانس آویشن و نانوذرات نقره		-	۱۰۰
نیستاتین		۸۰	۸۰

جدول ۵- بررسی میاگین قطر هاله مهار رشد عصاره الکلی بره‌موم، اسانس آویشن و نانوذرات نقره روی باکتری‌ها و مخمر کاندیدا آلبیکنز بر حسب میلی‌متر.

تیمار	استافیلوکوکوس اورئوس	استرپتوکوکوس پنومونیه	لیستریا مونوسیتوژنز	پروتئوس میرابیلیس	کلبسیلا پنومونیه	سودوموناس آئروژینوزا	کاندیدا آلبیکنز
بره‌موم	15/33±0/93	۱۵	16±0/81	13/33±1/24	14±0/81	9	14/33±1/24
نانوذرات نقره	۱۰	15/33±0/93	۱۲	۲۰	12/33±0/8	26±1/6	۱۰
اسانس آویشن	29±0/77	31/33±0/93	39±0/81	۱۵	11/33±1/54	10	۱۲
جنتامایسین	۴۵	۴۵	۴۵	۴۱	۳۰	۴۰	-
نیستاتین	-	-	-	-	-	-	۲۵

جدول ۶- بررسی میاگین قطر هاله مهار رشد حاصل از تاثیر تداخلی عصاره الکلی بره‌موم، اسانس آویشن و نانوذرات نقره روی باکتری‌ها و مخمر کاندیدا آلبیکنز بر حسب میلی‌متر.

تیمار	استافیلوکوکوس- اورئوس	استرپتوکوکوس- پنومونیه	لیستریا مونوسیتوژنز	پروتئوس میرابیلیس	کلبسیلا پنومونیه	سودوموناس آئروژینوزا	کاندیدا آلبیکنز
بره‌موم و نانوذرات نقره	12/33±0/47	12/6±0/47	14±0/82	21±0/82	14/33±0/94	9	10/67±0/94
اسانس آویشن و نانوذرات نقره	10/33±0/45	24/66±0/45	30/66±0/93	19/33±0/93	10/66±0/93	26/33±0/93	۱۲

بحث

کنند. نکته قابل توجه این است که برای ارتقای آنتی بیوتیک‌های در دست و سنتز ترکیب‌های نوین ضد میکروبی باید به مکانیسم عمل ترکیب مورد نظر و راه‌های احتمالی

آنتی بیوتیک‌ها با تاثیر بر روی ارگانل‌های سلولی مختلف می‌توانند میکروارگانیسم‌ها را کشته یا رشد آنها را متوقف

شاخص قرار می‌گیرند تاثیر مثبت داروی مدنظر روی آنها میتواند چشم انداز امیدوار کننده ای را جهت ساخت دارو در مقیاس صنعتی در آینده فراهم کند. از جمله میکروارگانیزم‌های بیماریزا می‌توان به باکتری سودوموناس آئروژینوزا اشاره کرد که متاسفانه اکنون بیماریزای مهم مراکز درمانی بویژه بیمارستان‌های سوانح سوختگی هست و به شدت مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها است. در این مطالعه به منظور کنترل مثبت از داروی استاندارد جنتامایسین و نیستاتین ۸۰ استفاده شد که نتایج حاصل از تیمارها قابل مقایسه با این دارو می‌باشد. همچنین در این مطالعه به منظور بررسی اثرات سینرژیستی ترکیبات، تیمارها به صورت نصف دز و در تداخل با هم بر باکتری-ها ترتیب اثر داده شد و نتایج آن نشان داد که تداخل این ترکیبات نیز اثرات هم‌افزایی بر ممانعت از رشد باکتری‌های مورد مطالعه دارد. نتایج مربوط به تعیین غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره بره موم همراه با نانوذرات نقره در کلبسیلا پنومونیه ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر، در استرپتوکوکوس پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و کاندیدا آلبیکنز ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیژنوزا و پروتئوس میرابیلیس ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. MIC اسانس آویشن همراه با نانوذرات نقره در کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر، در استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه و کاندیدا آلبیکنز ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در لیستریا مونوسیژنوزا و پروتئوس میرابیلیس ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. نتایج این بررسی نشان داد که تیمار تداخلی روی رشد باکتری‌ها و کاندیدا آلبیکنز تاثیر داشت. این نتایج نشان داد که می‌توان از تیمارها به صورت نصف دز اما به صورت تداخلی استفاده کرد که در مقایسه با استفاده داروها بصورت انفرادی و دز کامل، اثرات مشابهی را در پی داشت.

باکتری برای مقابله با آن توجه کنیم. بره موم زنبورعسل ماده ای مرکب از صمغ درختان و گیاهان مختلف است که کارگران زنبورعسل آن را در سبد گرده های خود جمع آوری کرده، با ایجاد تغییراتی در آن، از آن به عنوان درزگیر و یا ضد عفونی کننده داخل کندوها و نیز مومیایی کردن لاشه حشرات تلف شده در داخل کندو استفاده می کنند. فلاونوئید موجود در بره موم سبب شده که بطور گسترده‌ای از آن برای تهیه مواد بهداشتی و دارویی استفاده شود. یوسف بیگی و همکاران نشان دادند که بره موم تهیه شده از مناطق شمال غرب ایران دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی است. همچنین اونق و همکاران نشان دادند که دز ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی تر از عصاره بره موم میتواند عفونت های قارچی را در مدت زمان کمتری نسبت به درمان استاندارد نیستاتین بهبود ببخشد (۲۱).

از طرفی روغن آویشن که تیمول نامیده میشود، یک عامل قوی ضد میکروبی است. روغن این گیاه را برای دفع انگل های روده، بخصوص کرم قلابدار، تجویز می کرده اند. اسانس آویشن از جمله ده اسانس معروف می باشد که جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد (۱۷). همچنین توکمه چی و همکاران نشان دادند که اسانس آویشن و زنیان قادر است رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا را مهار نماید، در مطالعه آنها حداقل غلظت مهار رشد اسانس ها به ترتیب ۳۱۰ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر عنوان شده است (۲۵).

دلیل انتخاب میکروارگانیزم از دسته های گرم مثبت، گرم منفی و مخمر که شامل استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه، لیستریا مونوسیژنوزا، پروتئوس میرابیلیس، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و قارچ کاندیدا آلبیکنز می باشند، توجه به این نکته است که ایا داروی مورد نظر بر باکتری های گرم مثبت، گرم منفی و نیز قارچ ها اثر یکسانی دارد و یا خیر، همچنین با توجه به اینکه این میکروارگانیزم ها در دسته بیماری زاها

تیمارها را داشته باشد و این نویدی بر اینکه ما بتوانیم ترکیبات طبیعی را جایگزین ترکیبات شیمیایی و سنتزی نماییم. جالب است محققین به بحث ضد ویروسی آن با توجه به شیوع بیماری کووید-۱۹ (ویروس کرونا) بیشتر بپردازند.

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عصاره اتانولی بره‌موم زنبورعسل ایران (استان آذربایجان غربی)، اسانس آویشن و نانوذرات نقره هم بصورت انفرادی و هم بصورت تداخلی بر رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر مهارکنندگی داشته است. تداخل تیمارهای ترکیبات طبیعی مانند بره‌موم و اسانس آویشن می‌تواند همان اثرات انفرادی هر کدام از

منابع

- ۱- محمدعلی ضیاء، رضا منانی، محسن محمودی، منصور بیات، فرهاد محقق. بررسی تاثیر عصاره ی الکلی بره موم (پروپولیس) حاصل از کندوهای زنبور عسل ایران بر رشد تریکوفیتون متاگروفایتیس، مجله دانشکده پزشکی اصفهان، جلد ۲۷(۹۵)، ۲۳۲-۲۴۱.
- 2- Ahamed, M., Alsalhi, M.S., Siddiqui, M.K.J. (2010) Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta*. 411(23-24):1841-1848.
- 3- Alyane, M.L., Kbsa, H.N., Boussenane, H. Rouibah., Lahouel, M. (2008). Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. 21(3); 201-209.
- 4- Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L., Cormier, M. (1992) *In vitro* antiviral activity of propolis. *Apidologie*. 23, 231-240.
- 5- Assegid, G., Lamprecht, I. (1997) Microcalorimetric investigations on the influence of propolis on the bacterium *Micrococcus luteus*. *Thermochimica Acta*. 290; 155-166.
- 6- Bartonicek, J., Kozanek, M., Jupiter, J. (2014). History of Operative Treatment of Forearm. Diaphyseal Fractures. *The Journal of Hand Surgery*. 39(2): 335-342.
- 7- Boonkaew, B., Kempf, M., Kimble, R., Cuttle, L. (2014). Cytotoxicity testing of silver-containing burn treatments using primary and immortal skin cells. *Burns*. 40(8): 1562-1569.
- 8- Campos, J.F., Dos Santos, U.P., Macorini, L.F. De Melo, A.M., Balestieri, J.B., Paredes-Gamero, E.J., (2014) Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology*. 65; 374-380.
- 9- Choi, O., Kanjun, K., Nam-Jung, K., Louis, R., Rao, Y., Hu, Z. (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*. 42(12):3066-3074.
- ۱۰- Crane, E. Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Recourses, Heinemann, London (1988).
- 11- Dorman, H.J.D., Deans, S.G., (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 308-316
- 12- Fernandes, F.F., Dias, A., Ramos, C., Ikegaki, M., Siqueira, A., Franco, M. (2007). The in vitro antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine*. 49(2): 93-5.
- 13- Eshraghi, S., Valafar, Sh. (2008) Evaluation of inhibitory effects of Iranian propolis against filamentous bacteria. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 24(1): 56-60.
- 14- Ghassan, M.S., Ad'hiah, A.H., Al-Sammarrae, K.W., Bagnati, R., Frapolli, R., Bello, E., Uboldi, S., Romano, M., Panini, N., Scanziani, E., Pezzolato, M. (2012) Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis *in vitro* and *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology*. 50(5); 1632-1641.
- 15- Hausen, B.M., Wollenweber, E., Senff, H., Post, B. (1987) Propolis allergy, origin properties, usage and literature review. *Contact Dermatitis*. 17(3): 163-170.
- 16- Hudaib, M., E. Speroni, A.M. Di Pietra and V. Cavrini, (2002) GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29: 691-700
- 17- Imelouane, B., Amhamdi, H., Watthelet, J.P., Ankit, M., Khedid, K., Elbachiri, A. (2009) Chemical Composition and Antimicrobial

- Activity of Essential Oil of Thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. International journal of agriculture and biology. 11(2)205-208.
- 18-Jalsenjak, V., S. Peljnajak and D. Kustrak, (1987). Microcapsules of sage oil, essential oils content and antimicrobial activity. Pharmazie, 42: 419-420
- 19-Leung AY and Foster S. Encyclopedia of common natural ingredients: used in food drugs, and cosmetics. A Wiley Interscience Publication_John Wiley and Sons, Inc. 1995; 62: 89-101.
- 20-Nebojsa, I.P., Dragan S.V., Miroslav M.N., Stanislava Z.G., Lato L.P., Desanka Z.S. (2012) Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: A polarographic approach. Food and Chemical Toxicology. 50(10)3614-3618.
- 21-Ownagh, A., Tukmechi, A., Adibhesam, M., Ebrahimzadeh, S. (2010) Comparative study on the effect of ethanol extract of propolis collected from west azarbaijan apiaries against dermatophytes and non-dermatophytes fungi. The Journal of Urmia University of Medical Sciences. 21 (3): 206-214
- 22-Sacchetta, G.,Maietta,S., Muzzolia, M., Scagliantib, M., Manfredinib, S., Radicec,M., Brunid,R. (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food chemistry. 91(4)621-632.
- 23-Taheri, Sh., Cavallaro, A., Christo, S., Smith, L., Majewski, M., Barton, M. (2014). Substrate independent silver nanoparticle based antibacterial coatings. Journal of Biomaterials 35(16): 4601-4609.
- 24-Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C., Bruni, A. (1996) Antimicrobial activity of some commercial extracts of Propolis prepared with different solvents. Phytotherapy Research 10: 335-6
- 25-Tukmechi, A; Malakinejad, H; Bazargani gilán, B; Ebrahimi, H. Antibacterial activity of Zataria multifora and Carum copticum essential oil on Aeromonas hydrophilla. Guilan: 11th Iranian microbiology congress (2010).
- 26-White, T.C., Marr, K.A., Bowden, R.A. (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clinical Microbiology Reviews 11(2): 382-402.

Interfering Effects of ethanolic extract of Propolis, *Thymus vulgaris* essential oil and Silver Nanoparticles on bacteria and *Candida albicans in vitro*

Eskandarnia M.¹, Ahmady-asbchin S.¹ and Ownagh A.Gh.²

¹ Dept. of Microbiology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

² Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Antimicrobial properties of propolis, *Thymus vulgaris* and silver Nanoparticles has been demonstrated. Each of these agents for maximum impact requires a high concentration of substances affecting microorganisms. Assuming an anti-microbial agent with low concentration and in combination with other anti-microbial agents as the initial impact or more, A study to evaluate the effect of ethanol extract of propolis interference, *Thymus vulgaris* essential oil and silver nanoparticles on gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*) and Gram-negative bacteria (*Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia* and *Pseudomonas aeruginosa*) and on *Candida albicans* was performed. Bacteria and *Candida albicans* used in this study are taken from Iranian Research Organization for Science and Technology. Propolis is collected from different area of west Azerbaijan beehives. The ethanolic extract of propolis have prepared after 3 days. The interfering effects of these agents are evaluated by Micro-broth dilution method on Muller Hinton Broth in the presence of gentamicin as positive control for bacteria and Nistatin against *Candida albicans*. Acquired Minimum Inhibitory Concentration (MIC) show the effective interfering of these agents. The results of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of propolis extract with silver nano particle on *Klebsiella pneumonia* was 25 µgr/ml, on *Streptococcus pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* was 50µgr/ml and on *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Proteus mirabilis* was 100 micrograms per milliliter. MIC of *Thymus* essential oil with silver nanoparticles on *Klebsiella pneumonia* and *Pseudomonas aeruginosa* was 50µgr/ml, on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* and *Candida albicans* was 100 µgr/ml and on *Listeria monocytogenes* and *proteus mirabilis* was 200 micrograms per milliliter. The Findings of this study showed that combination treatments had the effects on growth of bacteria and *candida albicans*.

Key words: Propolis, *Thymus vulgaris*, silver nanoparticles, Minimum Inhibitory Concentration (MIC).