تاثیر نانوذرات اکسیدروی و عصاره اتانولی زوفا (*Hyssopus officinalis*) بر رشد *Saccharomyces cerevisiae*

- **حمیدرضا حسینی*:** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه
- **رامین منافـفر:** گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
- **منوچهر قوجائی:** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، بناب

تاریخ دریافت: خرداد 1395 تاریخ پذیرش: شهریور 1395

چکیده

تحقیقات نشان داده است که نانوذرات اکسیدروی فعالیت ضدمیکروبی قوی برعلیه ریزاندامگان دارند. همچنین اثرات ضدمیکروبی مناسبی از عصاره گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis*) گزارش شده است. در تحقیق حاضر اثرات عصاره زوفا و نانوذرات اکسیدروی بصورت منفرد و هم در حالت ترکیب عصاره با نانوذرات بر روی سلول‌های مخمرهای تک سلولی *Saccharomyces cerevisiae* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا عصاره گیاه زوفا استخراج و سپس ترکیب آن با نانو ذرات اکسید روی صورت گرفت. نتایج نشان داد که عصاره گیاه زوفا در غلظت 0/02 میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای غلظت موثر است و به تدریج با افزایش غلظت موجب کاهش تعداد سلول‌های مخمر شد (p<0/05). نانوذرات اکسید روی در غلظت 0/005 میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای غلظت موثر بوده و به تدریج موجب کاهش تعداد سلول‌های مخمر شد. این تحقیق نشان داد که نانوذرات اکسید روی در غلظت های 0/04 و 0/06 میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث تحریک رشد در سلول‌های مخمری شد (p<0/05). نانوذرات در غلظت 0/0016 میلی‌گرم در میلی‌لیتر و نانوذرات اکسیدروی با 0/0012 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گیاه زوفا به تدریج موجب کاهش تعداد سلول‌های مخمر شد. همچنین تحریک رشد سلول‌های مخمر در غلظت های 0/04 میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسیدروی با 0/03 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گیاه زوفا مشاهده شد(p<0/05).

کلمات کلیدی: زوفا، عصاره گیاهی، مخمر، نانوذرات، اکسیدروی

مقدمه

اثرات ضدمیکروبی گیاهان دارویی در دهه اخیر بصورت جامع مورد بررسي قرار گرفته و مشخص شده است که اغلب عصاره‌ها و اسانس‌هاي استخراج شده از گیاهان دارويي داراي خواص ضدقارچي، ضدانگل، ضدباکتري و ضدويروس مي‌باشند (Kordali و همکاران، 2005؛ Tepe و همکاران، 2004). با توجه به این اثرات اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهي در زمینه‌هاي فارموکولوژیکي، داروشناسي‌گیاهي، میکروبیولوژي پزشکی و کلینیکي، آسیب‌شناسی گیاهی و نگهداری مواد غذايي، میوه‌ها و سبزی‌ها شدیداً غربالگری شده و مورد استفاده قرارگرفته‌اند (Mahdavi Maymand و Mirtajodin، 2010). زوفا با نام علمی *H.officinalis* یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای به‌شمار می‌رود. روغن زوفا دارای اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی است. مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد روغن زوفا دارای اثرات ضدمیکروبی برعلیه میکروب‌هایی چون *Streptococcus pyogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Candida albicans* است (Ghasemi Pirbalouti و همکاران، 2013).

اثبات شده است که نانوذرات نیز می‌توانند اثرات ضد باکتریایی خوبی داشته باشند (Jin و همکاران، 2009). در سال‌های گذشته نانو ذرات غیرآلی که از نظر فیزیکی، شیمیایی و خصوصیات زیستی ساختار ویژه‌ای دارند، بسیار مورد توجه زیست‌شناسان قرار گرفته‌اند (Baker، 2001). همچنین

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Hemitriza@gmail.com

خصوصیات مفید نانو مواد، کاربرد آن‌ها در انجام فرآیندهای متنوع و حساس به ویژه در زیست‌شناسی و کاربردهای داروسازی را سبب شده است. گزارش‌هایی از اثرات ضدمیکروبی نانو مواد وجود دارد. چرا که نانو مواد از جمله اکسید فلزات سنگین، تمایل بالایی به میانکنش با مولکول‌های زیستی دارند و سبب غیرفعال شدن آن‌ها می‌گردند و در نهایت میکروب را از بین می‌برند (Burda و همکاران، 2005). نانوذرات اکسیدروی ترکیباتی غیرسمی، زیست سازگار و پایدار نسبت به شرایط پردازش هستند. گزارشات حاکی از آن است که این ذرات، سمیت انتخابی بر میکروب‌ها دارند اما حداقل اثرات جانبی را بر روی سلول‌های انسانی و حیوانی نشان داده‌اند. مکانیسم ضدمیکروبی نانوذرات اکسیدروی از طریق تولید فوتوکاتالیستی هیدروژن پراکسید، آزادسازی یون‌های روی، تخریب پروتئین‌ها و لیپیدهای غشای سلول‌های میکروبی و سرانجام تراوش محتویات درون سلول به بیرون و مرگ سلول میکروبی می‌باشد (Huh و Kwon، 2011؛ Li و همکاران، 2008).

به دلیل آثار تخریبی شدید نانو ذرات بر روی ارگانیسم‌های زنده اخیرا اهمیت ساخت و استفاده از نانو ذرات ارگانیک مورد توجه قرار است. نانوذرات ارگانیک به دلیل دارا بودن ویژگی-های خاص و بیولوژیکی پایه می‌توانند اثرات خاصی داشته باشد. تمایل به تهیه ذرات با ابعاد نانو مبتنی بر اصول شیمی سبز و بررسی کاربرد آن‌ها روز به روز در حال افزایش است و بدین منظور انواع گوناگونی از ساختارهای زیستی از جمله گیاهان، جلبک‌ها و ریزاندامگانی از قبیل باکتری‌ها، کپک‌های رشته‌ای و مخمرها جهت تهیه نانوذرات استفاده می‌شوند(Mandal و همکاران، 2006). در سال‌های اخیر نیاز به بیوسنتز نانوذرات همزمان با افزایش بهای فرآیندهای فیزیکی و شیمیایی برای تولید این دسته از مواد افزایش یافته است. بنابراین محققان در جستجوی مسیرهای ارزانتری برای سنتز نانوذرات، استفاده از ریزاندامگان و پس از آن عصاره‌های گیاهان را به عنوان روش-های جدید سنتز این دسته از مواد مطرح کرده‌اند (Mohanpuria و همکاران، 2007). اغلب روش‌های سنتز شیمیایی منجر به حضور برخی ازگونه‌های سمی مواد شیمیایی با عوارض جانبی در برنامه‌های کاربردی پزشکی می‌شوند. لذا تولید نانوذرات زیستی سازگار با محیط زیست جزو برنامه‌های کاربردی تحقیقات دارویی هستند. در مقابل اثرات بسیار مخرب اغلب نانوذرات، نانوذرات ارگانیک اثرات متفاوت‌تر و مفیدتری را در ارگانیسم‌های زنده دارند. پایداری نانوذرات متصل به پلیمرهای زیستی آن‌ها در مایعات بیولوژیک درطول ذخیره‌سازی موجب شده است که بعنوان یک سیستم بالقوه در تحویل مواد داروئی بکار روند (Parashar و همکاران، 2009). بر این اساس ساخت نانوذارت فلزی ارگانیک بر پایه عصاره‌های گیاهی یکی از روش‌های ساده و موثر ساخت این دسته از مولکول‌ها می‌باشد (Ahmed و همکاران، 2016).

با توجه آثار مخرب زیست محیطی نانوذرات فلزی بر روی سلول‌های زنده و کاهش این آثار در صورت استفاده از نانو ذرات ارگانیک و همچنین امکان تولید نانوذرات ارگانیک با ساده‌ترین و کاربردی‌ترین روش آن یعنی استفاده از عصاره‌های گیاهی، در تحقیق حاضر تاثیر نانوذرات اکسید روی و عصاره گیاه زوفا بصورت منفرد و ترکیبی بر روی مخمرهای تک سلولی به عنوان یکی از مدل‌های آزمایشگاهی یوکاریوتی مورد تحقیق قرار گرفت. به منظور بررسی غلظت موثر و نحوه تاثیرگذاری مواد فوق بر روی سلول‌های یوکاریوت نیز از یک مدل تحقیقاتی یوکاروتی تک سلولی به نام مخمر *S.cerevisiae* که مدل ایده‌آلی برای مطالعات سلولی و مولکولی است استفاده شد (Wang و Chen، 2006).

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری گیاه زوفا: گیاه زوفا از عطاری تهیه و پس از خشک کردن، توسط آسیاب دستی کوچک پودر شد. مقدار 35 گرم از پودر گیاهی توزین و با 50 میلی‌لیتر الکل 96 درصد ترکیب و به مدت 24 ساعت در انکوباتور 40 درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از 24 ساعت نمونه از انکوباتور خارج شد و مایع رویی آن با کاغذ واتمن جدا گردید و مجددا 50 میلی‌لیتر الکل 96 درجه به رسوب حاصل برای عصاره‌گیری بیشتر اضافه شد. پس از 24 ساعت دوم محلول بدست آمده دوباره با کاغذ واتمن جدا و نمونه به پتری دیش شیشه‌ای منتقل شد و در انکوباتور 50 درجه سانتیگراد قرار داده شد تا الکل موجود تبخیر شده و عصاره خالص بدست آید. پس از 48 ساعت یک عصاره غلیظ فاقد الکل بدست آمد تا جهت بررسی تاثیر این عصاره بر روی مخمر مورد استفاده قرار گیرد. هرگرم از عصاره‌گیاهی‌حاصل‌در10 میلی-لیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) حل گردید. اضافه کردن این ماده ضروریست زیرا این ماده یک حلال آلی قطبی بی‌ضرر برای ترکیب نمودن مواد مختلف در معرض میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (مشرقی و همکاران، 1386).

آماده‌سازی نانوذرات اکسید روی: جهت تهیه استوک اصلی نانوذرات، مقدار50 میلی‌گرم از نانوذرات اکسید روی در 25 میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و بمدت 60 دقیقه در سونیکاتور قرار داده شد تا نانوذرات بطور کامل از یکدیگر جدا شوند. به-منظور ایجاد سوسپانسیونی از نانوذرات که ذرات آن از هم کاملا جدا شده‌اند غیر از سونیکاسیون، از ماده BSA (Bovine Serum Albumin)در غلظت 20 میلی‌گرم بر لیتر محیط کشت مخمر نیز استفاده شد (Wang و همکاران، 2008).

ساخت نانوذرات ارگانیک توسط عصاره گیاه زوفا: ساخت نانوذرات ارگانیک به روش ارائه شده توسط Ahmed و همکاران در سال 2016 صورت گرفت. بدین ترتیب ابتدا مقدار 4 میلی‌گرم از نانوذرات اکسید روی توزین و با 5 میلی‌لیتر از عصاره گیاه زوفا ترکیب شد. محلول بمدت 10 دقیقه در بن‌ماری 41 درجه سانتیگراد قرار داده شد و در مدت یک ساعت هر 10دقیقه یکبار شدیدا ورتکس شده و در طی این مدت در درون بن ماری (دمای 41 درجه سانتیگراد) نگهداری شد. پس از طی یک ساعت نمونه بمدت 24 ساعت در شیکر با دمای اتاق (25 درجه سانتیگراد) قرار گرفت و محلول برای انتقال به محیط های کشت آماده شد. آماده سازی محیط کشت مانند مراحل قبل انجام شد و محیط کشت به میزان مساوی 5 میلی‌لیتر به لوله های آزمایش منتقل گردید.

مرحله کشت مخمر و بررسی تاثیر عصاره بر سلول‌های مخمر *S.cerevisiae*: ابتدا لازم بود که مخمرهای تک سلولی در محیط کشت مناسب کشت داده شوند. برای این کار از ترکیب 5 درصد گلوکز به همراه 2 درصد عصاره مخمر به همراه

1درصد دی پتاسیم فسفات به اضافه آب مقطر استفاده شد که با تنظیم pH بر روی 6، محیط کشت آماده شده به مقدار مساوی 5 میلی‌لیتر به درون لوله‌های آزمایش منتقل و لوله‌ها بمدت 15 دقیقه اتوکلاو شدند. جهت کشت مخمر ابتدا باید آنرا فعال کرد. برای این منظور مقدار0/2گرم مخمر در 10 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک حل شد و بمدت 15دقیقه در انکوباتور 25 درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از خروج لوله‌ها از اتوکلاو و سرد شدن کامل آن‌ها به داخل هر یک از لوله‌ها مقدار مساوی 100 میکرولیتر از محلول مخمر اضافه گردید (Aoki و همکاران، 2002). ابتدا آزمایش با غلظت‌های مختلف برای تعیین محدوده غلظت‌های بهینه انجام شد. بدین منظور برای تیمار شاهد و هر غلظت از عصاره زوفا 3 لوله آزمایش (3 تکرار) در نظر گرفته شد. پس از کشت مخمر و اضافه کردن غلظت‌های گوناگون عصاره گیاهی محیط های کشت جهت رشد مخمر بمدت 48 ساعت در انکوباتور 26 درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از طی این مدت نمونه‌ها جهت شمارش مخمرها مورد بررسی قرار گرفتند. برای این امر رقیق‌سازی به نسبت 1 به 10 انجام شد تا شمارش به سهولت انجام شود. غلظت‌های بهینه تعیین شده برای تاثیر عصاره گیاه زوفا به شرح جدول 1 می‌باشد.

جدول 1: غلظت‌های بهینه استفاده شده از عصاره گیاه زوفا

میکرولیتر از عصاره زوفا حل شده در DMSO	غلظت (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)
100	0/02
200	0/04
300	0/06
400	0/08

بررسی تاثیر نانوذرات اکسید روی بر سلول‌های مخمر *S.cerevisiae*: محیط کشت به لوله‌های آزمایش منتقل گردید و داخل هرکدام طبق روش پیشین 5 میلی‌لیتر از محیط کشت اضافه گردید. داخل هر لوله آزمایش نیز 50 میکرولیتر از BSA اضافه گردید. مراحل کشت مخمر و آماده‌سازی آن مانند مرحله قبل انجام شد. برای تیمار شاهد و هر غلظت 3 لوله آزمایش (3 تکرار) در نظر گرفته شد. پس از کشت مخمر و اضافه کردن غلظت‌های گوناگون نانوذرات اکسیدروی، محیط‌های کشت جهت رشد مخمر بمدت 48 ساعت در انکوباتور 26 درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از طی این مدت نمونه‌ها جهت شمارش مخمرها مورد بررسی قرار گرفتند تا غلظت‌های بهینه مطابق جدول 2 حاصل شوند.

بررسی تاثیر ترکیبی نانوذرات اکسید روی به همراه عصاره گیاه زوفا بر سلول‌های مخمر *S. cerevisiae*: مراحل کشت مخمر نیز همانند مرحله قبل انجام شد. این مرحله نیز مانند مراحل قبلی چندبار تکرار گردید تا غلظت‌های بهینه تعیین شوند. 3 لوله آزمایش بعنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. برای هر غلظت نیز 3 لوله آزمایش (3 تکرار) در نظر گرفته شد. پس از کشت مخمر و اضافه کردن غلظت‌های گوناگون عصاره گیاهی+نانوذرات اکسیدروی، محیط‌های کشت جهت رشد مخمر بمدت 48 ساعت در انکوباتور 26 درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از طی این مدت نمونه‌ها جهت شمارش مخمرها مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های بهینه تعیین شده مطابق جدول 3 می‌باشد.

جدول 2: غلظت‌های بهینه استفاده شده از نانوذرات اکسید روی

میزان مورد استفاده از استوک (میکرولیتر)	غلظت در محیط (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)
12/5	0/005
25	0/01
50	0/02
100	0/04
150	0/06
200	0/08
300	0/12
400	0/16
500	0/2

جدول 3: غلظت‌های بهینه استفاده شده از نانوذرات اکسیدروی بهمراه عصاره اتانولی گیاه زوفا

(میکرولیتر از مخلوط نانوذرات اکسید روی + عصاره گیاهی)	غلظت نانوذرات اکسید روی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) + عصاره اتانولی گیاه زوفا (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)
2	0/0012 + 0/0016
5	0/003 + 0/004
10	0/006 + 0/008
25	0/015 + 0/02
50	0/03 + 0/04
100	0/06 + 0/08
200	0/12 + 0/16

آنالیز آماری: نرمال بودن داده توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. میانگین‌ها توسط آنالیز آماری Oneway ANOVA از تست DUNCAN آنالیز و مقایسه شدند. برای بررسی معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح 95 درصد از بسته نرم‌افزاری SPSS نسخه 19 استفاده شد.

نتایج

نتایج شمارش مخمرهای استرس یافته با عصاره گیاه زوفا: جدول 4 تاثیر و غلظت موثر عصاره گیاه زوفا را بر روی سلول‌های مخمر نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که عصاره گیاه زوفا در غلظت 0/02 میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای غلظت موثر بوده و و به تدریج با افزایش غلظت موجب کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های مخمر شده است($p<0/05$).

جدول 4: میزان موثر عصاره اتانولی گیاه زوفا بر تعداد سلول‌های مخمر در مدت 48 ساعت (تعداد به درصد از نمونه شاهد)

غلظت نانوذرات اکسید روی + عصاره اتانولی گیاه زوفا(میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	انحراف معیار± میانگین
شاهد پس از 48 ساعت	$100 \pm 0/0^{a}$
0/0012 + 0/0016	$95/80 \pm 4/91^{a}$
0/003 + 0/004	$79/00 \pm 4/34^{b}$
0/006 + 0/008	$59/73 \pm 4/60^{c}$

0/015 + 0/02	72/20 ± 7/07[b]
0/0300 + 0/04	75/28 ± 3/60[b]
0/06 + 0/08	41/58 ± 2/98[d]
0/12 + 0/16	30/07 ± 0/53[e]

نتایج شمارش مخمرهای استرس یافته با نانوذرات اکسید روی: جدول 5 تاثیر و غلظت موثر نانوذرات اکسیدروی را بر روی سلول‌های مخمر نشان می‌دهد. این بررسی نشان می‌دهد که این نانوذرات در غلظت 0/005 میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای غلظت موثر بوده و به تدریج موجب کاهش تعداد سلول های مخمر شده است. همچنین تحقیق نشان داد که نانوذرات فوق در غلظت های میانه 0/04 و 0/06 میلی‌گرم در میلی‌لیتر مجددا باعث تحریک رشد در سلول‌های مخمری شده است. بطوری که این کاهش در تیمارهای اول جبران شده و مجددا روند افزایشی در تعداد سلول های مخمر دیده می‌شود ($p<0/05$).

جدول 5 : میزان تاثیر نانوذرات اکسید روی بر تعداد سلول‌های مخمر در مدت 48 ساعت (تعداد به درصد از نمونه شاهد)

غلظت‌های مختلف عصاره (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	0/08	0/06	0/04	0/02	شاهد
درصد بقاء (میانگین±انحراف معیار)	36/31± 2/06[e]	66/39± 1/17[d]	71/54± 1/27[c]	91/05± 0/83[b]	100/00± 0/00[a]

اعداد در هر ردیف با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری می‌باشند ($p>0/05$).

نتایج شمارش مخمرهای کشت داده شده تحت تاثیر نانوذرات ارگانیک اکسید روی: جدول 6 نشان‌دهنده تاثیر نانوذرات اکسیدروی+عصاره گیاه زوفا بر روی سلول‌های مخمر می‌باشند. این بررسی نشان می‌دهد که این نانوذرات در غلظت 0/0016 میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسیدروی + 0/0012 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گیاه زوفا دارای غلظت موثر بوده و به تدریج موجب کاهش تعداد سلول‌های مخمر شده است. اما این تحقیق نشان داد که نانوذرات فوق در غلظت های 0/02 میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی با 0/015 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گیاه زوفا و 0/04 میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی با 0/03 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گیاه زوفا مجددا باعث تحریک رشد در سلول‌های مخمری شده است ($p<0/05$).

جدول 6: میزان موثر نانوذرات اکسیدروی بهمراه عصاره اتانولی گیاه زوفا بر تعداد سلول‌هایمخمر در مدت 48 ساعت (تعداد به درصد از نمونه شاهد)

غلظت نانوذرات اکسید روی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	میانگین ± انحراف معیار
شاهد پس از 48 ساعت	100 ± 0[a]
0/005	95/24 ± 2/26[ab]
0/01	79/21 ± 3/76[e]
0/02	85/48 ± 4/89[cde]
0/04	93/00 ± 4/08[abc]
0/06	94/99 ± 4/83[ab]
0/08	85/72 ± 4/44[cde]
0/12	82/48 ± 6/96[de]
0/16	78/22 ± 5/51[e]
0/2	88/74 ± 4/48[bcd]

اعداد در هر ستون با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری می‌باشند ($p>0/05$).

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه زوفا دارای خواص کشندگی در سلول‌های یوکاریوت می‌باشد. در این تحقیق غلظت 0/06 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره توانست نزدیک به 33 درصد رشد سلول‌های مخمر را در محیط کشت غنی کاهش دهد ($p<0/05$). همچنین نانو ذرات اکسید روی در غلظت 0/16 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از محیط کشت غنی مخمر توانست حدود 22 درصد رشد سلول‌های مخمر را کاهش دهد. البته در غلظت‌های میانه 0/04 و 0/06 میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی موجب تشدید رشد سلول‌های مخمر شدند درحالیکه در غلظت‌های کم و بیش موجب کاهش تراکم سلول‌های مخمر شده بودند. مهار رشد سلولهای یوکاریوت و پروکاریوت خصوصا باکتری‌های بیماری‌زا از جمله مشکلات قرن اخیر می‌باشد. اخیرا استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های قدیمی و مرسوم نگرانی‌هایی را ایجاد نموده‌اند. بر اساس مشاهدات سال‌های اخیر آنتی‌بیوتیک‌ها دیگر قادر نیستند سویه‌های مختلف باکتری‌ها را تخریب نمایند. لذا بر اساس درخواست سازمان بهداشت جهانی و مجامع علمی لازم است گزینه‌های جدیدی برای از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زا تحقیق و معرفی شوند. بر اساس اسناد و مدارک موجود حذف باکترهای بیماری‌زا توسط عصاره‌های گیاهی سابقه چندین صد ساله دارد. البته عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی با مکانیسم‌هایی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌ها را حذف می‌کنند که این مسئله در درمان عفونت هاي ناشي از سويه های مقاوم میکروبی از نظر بالینی حائز اهمیت است. با توجه به رويكرد دوباره براي مصرف داروها و فرآورده‌های گیاهی، بررسي خواص دارويي گیاهان بومی هر منطقه از اهمیت خاصي برخوردار می‌باشد (Eloff، 1999). Dehghanzadeh و همکاران خاصیت ضد میکروبی اسانس گیاه زوفاي برداشت شده از كوه‌هاي سپیدان در جنوب غربي ايران را بررسي نمودند و نشان دادند كه اسانس زوفا داراي اثر ضدباكتريايي و ضدقارچي است (Dehghanzadeh و همکاران، 2012). Kizil و همکاران به بررسي تركيبات شيميايي، فعاليت آنتي‌اكسيداني و اثر ضدباكتريايي گياه زوفا برداشت شده از جنوب شرقي آناتولي پرداختند(Kizil و همکاران، 2010). Marino و همکاران اثر سه تركيب اصلي اسانس زوفا را بر 6 گونه باكتري گرم مثبت و 9 گونه باكتري گرم منفي بررسي كردند (Marino و همکاران، 2012). از جمله مواد موثره گياهي كه تاثير زيادي بر ميكروارگانيسم‌ها دارد تركيبات فنولي و مهمترين آن‌ها كارواكرول و تيمول مي‌باشد (Burt، 2004). بر اساس تحقيق Dehghanzadeh و همکاران اسانس گياه زوفا داراي ميزان زيادي كارواكرول (7/37 درصد) و تيمول (18/95 درصد) مي‌باشد (Dehghanzadeh و همکاران، 2012).

تاثيرات ضدميكروبي نانوذرات نيز بسيار پذيرفته شده مي‌باشد. در تكنولوژي جديد فناوري نانو، از فلزات در

ابعاد نانو جهت مصارف ضدمیکروبی به میزان زیادي استفاده می‌شود(Singh و همکاران، 2009). Kim و همکاران اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره علیه مخمر، *E.coli* و *S. aureus* را مورد بررسی قرار دادند. بر اساس این تحقیقات رشد مخمر و باکتری *E.coli* در غلظت‌های پایینی از نانوذرات نقره متوقف شدند، در حالی که اثرات مهار رشدی روی *S. aureus* خفیف بود (Kim و همکاران، 2007). نتایج تحقیقات همچنین نشان دادند که نانوذرات نقره ممکن است با ایجاد گسستگی در ساختار غشای سلولی، اثر ضدقارچی خود را اعمال کند. نانوذرات نقره اثر ضدمیکروبی قوی روی *C. Albicans* که مشابه اثر ضدقارچی آمفوتریسین B (به عنوان کنترل) بود (Kim و همکاران، 2009). در مطالعه Brown و همکاران مشخص شد نانوذرات نقره به تنهایی روی ایزوله‌های مقاوم *Pseudomonas aeruginosa* و *Enterobacter aerogenes*اثر داشته و هنگام ترکیب با آمپی‌سیلین قدرت بیشتری خواهد داشت. درصورتی که نانوذرات طلا تنها در فرم کونژوگه با آمپی‌سیلین، توانایی تأثیر بر روی ایزوله‌های مقاوم را دارد (Brown و همکاران، 2012). مطالعات متعدد در زمینه بررسی تأثیر فرم کونژوگه نانوذرات مختلف به تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی بیوفیلم باکتریایی انجام شده است، از جمله اینکه Ansari و همکاران با بررسی اثر نانوذرات نقره بر روی بیوفیلم *E.coli* و *Klebsiella pneumoniae* مولد بتالاکتاماز های وسیع‌الطیف طی گزارشی از موفقیت خود در زمینه حذف بیوفیلم خبر دادند (Ansari و همکاران، 2014). پیش از این تاثیرات ضدمیکروبی نانوذرات اکسیدروی نیز گزارش شده بود. این نانوذرات فعالیت ضدمیکروبی قوی برعلیه باکتری-های گرم مثبت و گرم منفی به ویژه عوامل بیماریزای غذایی مهم مثل *E.coli*، *Listeria monocytogenes*، *S. aureus* و *Salmonella* دارد (Jin و همکاران، 2009). بررسي‌ها نشان داده که ذرات نانو نسبت به یون‌های فلزی سمیت سلولی بالاتري دارند. زیرا امکان نفوذ آن‌ها به درون غشاي سلولي و رهاسازي یون‌هاي فلزي در درون سلول بیشتر است (Wu و همکاران، 2010). Scheckel و همکاران گزارش کردند که آزاد شدن یون روي از نانو ذرات اکسیدروی به فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات اکسیدروي کمك مي‌کند (Scheckel و همکاران، 2010). همچنین، Dimpka و همکاران نقش بیولوژیکي رها شدن یون‌ها از ذرات نانو را نشان دادند به گونه‌اي که سمیت این ذرات هنگام استفاده از کلاته‌کننده‌های اختصاصی یون‌ها از بین رفت (Dimpka و همکاران، 2011). مکانیسم عمل اکسید روي نیز شبیه سایر نانوذرات است ولی بیشتر از طریق تخریب دیواره باکتري عمل می‌کند(Reeves و همکاران، 2008). لذا بنظر می‌رسد تولید نانوذرات ارگانیک هم می‌تواند موجب کاهش اثرات سمی آزاد شدن نانو ذرات در محیط شود و هم اینکه اثرات مهاری آن‌ها را تشدید کند.

براساس مطالعات به عمل آمده آثار مخرب نانوذرات در صورت استفاده در غلظت‌های مختلف و همچنین نوع و نحوه استفاده از نانو ذرات متفاوت می باشد. در تحقیق حاضر نیز مشاهده شده با افزایش غلظت نانوذرات در محیط متراکم مخمرهای تک سلولی، رشد در تیمارها افزایش یافته است یعنی در برخی غلظت‌ها این ماده اثرات تشدید کنندگی نیز بر رشد ارگانیسم‌های زنده داشته‌اند. در خصوص تشدید اثرات نانوذرات ساخته شده در سیستم ارگانیک، نتایج تحقیقات علمی ثابت کرده است که نانوذرات اکسیدروی زمانیکه بصورت سبز سنتز شوند در مقایسه با نانوذرات اکسیدروی ساخته شده در حالت شیمیایی، فعالیت ضدباکتریایی و ضد قارچی بیشتری نشان می-دهند. از نتایج به دست آمده چنین استدلال می‌شود که می‌توان از چنین نانوذراتی بصورت موثر در برنامه‌های کاربردی کشاورزی و ایمنی مواد غذایی استفاده نمود (Gunalan و همکاران، 2012). تحقیقات نشان داده‌اند نانوذرات سلنیوم، روی و منگنز غیرارگانیک نیز تاثیر ضعیف‌تری نسبت به حالت ارگانیک آنان در افزایش وزن لاروها و معدنی شدن مواد در استخوان‌ها داشته‌اند (Izquierdo و همکاران، 2016). با توجه به اثرات مثبت نانوذرات سنتز شده با عصاره‌های گیاهی، اخیرا نانوذرات طلا با استفاده از عصاره ماگنولیا وعصاره برگ کاکی سنتز شدند (Song و همکاران، 2009). Naghsh و همکاران نیز نشان دادند که مناسب‌ترین زمان اثر مهارکنندگی رشد باکتری *E.coli* شش روز بعد از تیمار با ترکیب توأم نانوذرات نقره در غلظت 25 ppm با عصاره 100 درصد اتانولی گیاه اکالیپتوس است (Naghsh و همکاران، 2013). با توجه به استفاده از روش-هاي نوین درمان و همچنین کاربردهاي شناخته شده گیاهان دارویی کاربرد این ترکیبات با روش‌های نوین درمانی مانند نانوتکنولوژي ضروري به نظر می‌رسد. بنابراین، ابتدا بایستی فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات را سنجید و سپس در صورت امکان برای مصارف دارویی از آن استفاده کرد. در تحقیق حاضر نانوذرات اکسیدروی درغلظت 0/16 میلی‌گرم در میلی لیتر توانست رشد مخمر را نسبت به تیمار شاهد 22 درصد کاهش دهد اما در همان غلظت و در حالت ترکیبی موجب کاهش 70% در تراکم سلول‌های مخمر در مقایسه با تیمار شاهد شد ($p<0/05$). با توجه به اینکه عصاره‌های گیاهی از مواد زیست تخریب‌پذیر هستند لذا استفاده از مقادیر کمتر نانوذرات برای حذف ریزاندامگان توجیه علمی و اقتصادی دارد. دلیل موثر بودن نانوذرات ارگانیک در مقایسه با نانوذرات شیمیایی ارائه نشده است ولی بنظر می‌رسد در این حالت مولکول‌های عصاره و نانوذرات می‌توانند اثرات همدیگر را تشدید نمایند (Kuppusamy و همکاران، 2014؛ Naqvi و همکاران، 2013). یا اینکه احتمالا نانوذرات متصل شده به بیومولکول‌ها قادر به نفوذ بهتر از غشائ سلول‌های زنده می‌باشند که بایستی مورد مطالعه قرار گیرند. از نتایج ارزشمند این تحقیق امکان ساخت نانوذرات ارگانیک با استفاده از عصاره گیاهی می‌باشد (Ahmed و همکاران، 2016). مطالعات نشان داده است که در حالیکه قارچها و باکتری نیازمند زمان انکوباسیون نسبتاً طولانی‌تری برای احیاء یون‌های فلزی و ساخت نانوذرات ارگانیک هستند، مواد شیمیایی گیاهی محلول در آب، آن را در یک زمان بسیار کمتر به نتیجه می‌رسانند. با جمع-بندی نتایج تحقیق حاضر و با استناد به گزارش‌های پیشین (Song و همکاران، 2009؛ Gunalan و همکاران، 2012؛ Izquierdo و همکاران، 2016) می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری نمود که عصاره-های گیاهی و نیز برخی نانوذرات فلزی بر رشد ریزاندامگان تاثیرگذار می‌باشند خصوصا اگر از این مواد بصورت ذرات ارگانیک و حالت ترکیبی استفاده شوند. نتایج این تحقیق ضمن

تائید یافته‌های پیشین مبنی بر اثرات کشندگی مواد فوق بر روی سلول‌های یوکاریوت، نشان داد که در صورت بهینه نمودن شرایط و غلظت مورد استفاده می‌توان رشد سلول‌های مخمر و شاید اغلب سلول‌های یوکاریوت را نیز تحریک نمود.

منابع

1. **مشرقی، م.؛ ملائی، ص .؛ غلامی، ز.؛ تولایی، ش.، 1386.** بررسی اثرات عصاره الکلی برگ و میوه سه گیاه داروئی بومی خراسان بر مدل رشد باکتری *E.coli* 0157 به روش اسپکتروفتومتری. مجله علمی دانشگاه پزشکی سمنان. سال 8، شماره 3.
2. **Ahmed, S.; Ahmad, M.; Swami, B.L. and Ikram, S., 2016.** A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications. A Green Expertise. Vol. 7, pp: 17–28.
3. **Ansari, M.A.; Khan, H.M.; Khan, A.A.; Cameotra, S.S. and Ruchita, P., 2014.** Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles against biofilm of extended spectrum β-lactamase isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae.* Appl Nanosci. Vol. 4, pp: 859-868.
4. **Aoki, H.; Miyamoto, N.; Furuya, Y.; Mankura, M.; Endo, Y. and Fujimoto, K., 2002.** Incorporation and Accumulation of Docosahexaenoic Acid from the Medium by Pichia methanolica HA-32. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. Vol. 66, pp: 2632-2638.
5. **Brown, A.N.; Smith, K.; Samuels, T.A.; Lu, J.; Obare, S.O. and Scott, M.E., 2012.** Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Appl Environ Microbiol. Vol.78, pp: 2768-2774.
6. **Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R. and El-Sayed, M.A., 2005.** Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. Chemical reviews. Vol.105. pp: 1025-1102.
7. **Dehghanzadeh, N.; Ketabchi, S. and Alizadeh, A., 2012.** Essential oil composition and antibacterial activity of *Hyssopus Officinalis L.* grown in Iran. Asian J. Exp. Vol. 3, pp: 767-771.
8. **Dimkpa, C.O.; Alyssa, C.; Britt, D.W.; McLean, J.E. and Anderson, A.J., 2011.** Responses of a soil bacterium, *Pseudomonas chlororaphis O6* to commercial metal oxide nanoparticles compared with responses to metal ions. Environmental Pollution. Vol. 159, pp: 1749- 1756.
9. **Eloff, J.N., 1999**. It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. J Ethnopharmacol. Vol. 67, pp: 355-360.
10. **Ghasemi-Pirbalouti, A.; Gorgij, A.; Rahimmalek, M. and Hamedi, B., 2013.** Phytochemical response of hyssop *(Hyssopus officinalis* L.*)* to foliar application of jasmonic acid. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs). Vol. 4, pp: 7-14.
11. **Gunalan, S.; Sivaraj, R. and Rajendran, V., 2012.** Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. Progress in Natural Science: Materials International, Vol. 22, pp: 693–700.
12. **Huh, A.J. and Kwon, Y.J., 2011.** Nanoantibiotics: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. Journal of Controlled Release, Vol. 156, pp: 128-145.
13. **Izquierdo, M.S.; Ghrab, W.; Roo, J.; Hamre, K.; Hernández-Cruz, C.M.; Bernardini, G.; Terova, G. and Saleh, R., 2016.** Organic, inorganic and nanoparticles of Se, Zn and Mn in early weaning diets for gilthead seabream (*Sparus aurata;* Linnaeus, 1758). Aquaculture Research, Vol. 47, pp: 318-328.
14. **Jin, T.; Sun, D.; Su, J.Y.; Zhang, H. and Sue, H.J., 2009.** Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli O157:H7.* Journal of Food Science. Vol. 74, pp: 46 –52.
15. **Kim, J.S.; Kuk, E.; Yu, K.N.; Kim, J.H.; Park, S.J.; Lee, H.J. and Kim, Y.K., 2007.** Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, Vol. 3, pp: 95-101.
16. **Kim, K.J.; Sung, W.S.; Suh, B.K.; Moon, S.K.; Choi, J.S.; Kim, J.G. and Lee, D.G., 2009.** Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. Biometals, Vol. 22, pp: 235-242.
17. **Kizil, S.; Hasimi, N.; Tolam, V.; Kilinc, E. and Karatas, H., 2010.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Hyssopus officinalis L.* essential oil. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj. Vol. 38, pp: 99-103.
18. **Kordali, S.; Cakir, A.; Mavi, A.; Kilic, H. and Yildirim, A., 2005.** Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish Artemisia species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 53, pp: 1408-1416.
19. **Kuppusamy, P.; Yusoff, M.M.; Maniam, G.P. and Govindan, N., 2014.** Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications–An updated report. Saudi Pharmaceutical Journal, Vol. 24, pp: 473–484.
20. **Kurtzman, C.P. and Piškur, J., 2006.** Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts (in Comparative Genomics: Using Fungi as Models. Berlin: Springer, pp: 29–46.
21. **Li, Q.; Mahendra, S.; Lyon, D.Y.; Brunet, L.; Liga, M.V.; Li, D. and Alvarez, P.J., 2008.** Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. Water Research, Vol. 42, pp: 4602-4591.
22. **Mahdavi-Maymand, Z. and Mirtajodin, M., 2010.** The collection and identification of the some plant species of Kerman province. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs), Vol. 1, pp: 1-24.
23. **Marino, M.; Bersani, C. and Comi, G., 2001.** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae.* International Journal of Food Microbiology, Vol. 67, pp: 187–195.
24. **Naghsh, N.; Soleymani, S. and Torkan, S., 2013.** Inhibitory effect of alcoholic eucalyptus extract with nanosilver particles on *E.coli* growth. J Gorgan Uni Med Sci. Vol. 15, pp: 60-64.
25. **Naqvi, S.Z.H.; Kiran, U.; Ali, M.I.; Jamal, A.; Hameed, A.; Ahmed, S. and Ali, N., 2013.** Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. International Journal of Nanomedicine, Vol. 8, pp: 3187-3195.
26. **Reeves, J.F.; Davies, S.J. and Dodd, N., 2008.** Hydroxyl radicals (OH and H_2O_2) are associated with titanium dioxide (TiO_2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Vol. 640, pp: 113-122.
27. **Scheckel, K.G.; Luxton, T.P.; El-Badawy, A.M.; Impellitteri, C.A. and Tolaymat, T.M., 2010.** Synchrotron speciation of silver and zinc oxide nanoparticles aged in a kaolin suspension. Environmental Science and Technology, Vol. 44, pp: 1307-1312.
28. **Singh, N.; Manshian, B.; Jenkins, G.J.; Griffiths, S.M.; Williams, P.M; Maffeis, T.G. and Doak, S.H., 2009.** Nano genotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials, Vol. 30, pp: 3891-3914.
29. **Tepe, B.; Donmez, E.; Unlu, M.; Candan, F.; Daferera, D. and Vardar-Unlu, G., 2004.** Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (montbret et aucher ex benth.) and *Salvia multicaulis* (vahl). Food Chemistry, Vol. 84, pp: 519-525.
30. **Wang, G.; Siggers, K.; Zhang, S.; Jiang, H.; Xu, Z,.; Zernicke, R.F.; Matyas, J. and Uludağ, H., 2008.** Preparation of BMP-2 containing bovine serum albumin

(BSA) nanoparticles stabilized by polymer coating. Pharm Res, Vol. 25, pp: 2896–2909.

31. **Wang, J. and Chen, C., 2006.** Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. Biotechnology Advances, Vol. 24, pp: 427-451.

32. **Wu, B.; Huang, R.; Sahu, M.; Feng, X.; Biswas, P. and Tang, Y.J., 2010.** Bacterial responses to Cu-doped TiO2 nanoparticles. Science of the Total Environment. Vol. 408, pp: 1755–1758.