Original article

Study of Antibacterial Synergistic Effect of *Origanum vulgare* L. Essential Oil and Silver Nanoparticles

Mohammadzade N [1], Mahdavi-Ourtakand M [2,*], Honarmand Jahromi S[1]

1. Department of Microbiology, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2. Department of Biology, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

***Corresponding author:** e-mail: m.mahdavi@iauvaramin.ac.ir, masumehmahdavi@gmail.com

Received: 9/29/2021 Accepted:10/7/2021

Abstract

The increasing use of antibiotics and the prevalence of resistant strains have necessitated the use of new antimicrobial drugs. Combination therapy is an effective strategy to combat antibacterial resistance. The aim of this study was to investigate the antibacterial synergistic effect of *Origanum vulgare* essential oil and silver nanoparticles on gram-positive and gram-negative bacteria. In this study, *O. vulgare* essential oil was extracted from the plant branch. A colloidal solution of silver nanoparticles with an average particle diameter of 68 nm was purchased. The antibacterial effect of *O. vulgare* essential oil and silver nanoparticles was investigated alone and then in combination by broth microdilution method and their minimum inhibitory concentration (MIC) against gram-positive and gram-negative bacteria was determined. The bacteria studied were *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. Based on the obtained results, the synergistic effect of *O. vulgare* essential oil and silver nanoparticles had significant antimicrobial effects on all studied bacteria. The results showed that the synergistic effect of *O. vulgare* essential oil and silver nanoparticles was effective in inhibiting and killing the studied bacteria. And they can be useful in developing new drugs against these bacteria.

Key words: Silver nanoparticles, *Origanum vulgare* essential oil, Antimicrobial, Synergistic effect

Iranian Journal of Biological Sciences
Vol 16, Issue 1, Spring 2021

مقاله تحقیقی

مطالعه اثر هم‌افزایی ضد باکتریایی اسانس گیاه مرزنجوش(*Origanum vulgare* L.) و نانوذرات نقره

ناهید محمدزاده[1]، معصومه مهدوی اورتاکند[2,*]، سحر هنرمند جهرمی[1]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: masumehmahdavi@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۷ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۷/۱۵

چکیده

افزایش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و شیوع سویه‌های مقاوم، کاربرد داروهای ضد میکروبی جدید را ضروری نموده است. درمان ترکیبی یک استراتژی کارآمد برای مقابله با مقاومت ضدباکتریایی می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر سینرژیک ضدباکتریایی اسانس گیاه مرزنجوش و نانو ذرات نقره بر روی باکتری گرم مثبت و گرم منفی است. در این مطالعه اسانس مرزنجوش از سرشاخه گیاه استخراج گردید. محلول کلوئیدی نانوذرات نقره با میانگین قطر ۶۸ نانومتر خریداری شد. اثر ضدباکتریایی اسانس مرزنجوش و نانوذرات نقره به تنهایی و سپس به صورت سینرژیک، به روش میکرودایلوشن براث بررسی و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) آنها در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، تعیین شد. باکتری‌های مورد مطالعه اشریشیاکلی، سالمونلا انتریکا، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس بودند. بر اساس نتایج به‌دست آمده، اثر سینرژیک اسانس مرزنجوش و نانو ذرات نقره اثرات ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای روی تمامی باکتری‌های مورد بررسی داشتند نتایج نشان داد که اثر سینرژیک اسانس مرزنجوش و نانو ذرات نقره در مهار و از بین بردن باکتری‌های مورد بررسی موثر بوده و می‌توانند در تهیه داروهای جدید بر علیه این باکتری‌ها، مفید باشند.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات نقره، اسانس گیاه مرزنجوش، اثرضدمیکروبی، سینرژیک.

مقدمه

عوامل ضد میکروبی برای مبارزه با عفونت‌های بیماری زا مهم می‌باشند. با این حال استفاده گسترده و سوءاستفاده از آنها باعث ظهور مقاومت به داروهای ضد باکتریایی می‌شود که به یک پدیده شایع تبدیل و بعنوان یک مشکل عمده مطرح می‌شود. به همین دلیل برخی از مطالعات با هدف توسعه مکمل‌های جدید از آنتی بیوتیک‌ها در حال انجام است. درمان ضد باکتریایی شامل استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی، آنتی بادی‌های درمانی و هم چنین ترکیبات مشتق شده از گیاهان و نانو ذرات فلزی می‌باشد (۱). دهه گذشته اولین گام مقابله با باکتری‌ها و اثرات ضد میکروبی آنها با استفاده از ترکیبات گیاهی برداشته شد. به‌ویژه ترکیبات حاوی فنل‌ها و ترپن‌ها که غشاء سیتوپلاسمی باکتری‌ها را تخریب می‌نمود. اما در حال حاضر یون‌های فلزی و نانوذرات بویژه ترکیبات نقره تشکیل گروه دیگری از آنتی بیوتیک‌های قوی را می‌دهند که در پزشکی و

فارماکولوژی استفاده می‌شود. این مواد به عنوان یک پوشش سطحی ضد باکتریایی عمل می‌کنند که در بخش‌های مختلف تجهیزات پزشکی مانند ایمپلنت، پروتز و کاتترهای وریدی و ادراری به کار می‌روند. یون‌های فلزی و نانو ذرات در شرایط in vitro امن تر و اثر ضد باکتریایی بیشتری دارند. نانو ذرات نقره می‌توانند غشاء باکتری‌ها را تخریب کنند و علت آن به دلیل ویژگی پراکسیداسیون چربی‌های غشاءاست. اما هنگامیکه داخل سلول قرار می‌گیرند ممکن است به DNA آسیب رسانده و منجر به اختلالات زنجیره تنفسی و تقسیم سلولی شود (۲). این ترکیبات به تنهایی فعالیت ضد باکتریایی دارند اما امکان استفاده از آنها در ترکیب با آنتی بیوتیک‌ها و ترکیبات گیاهی به منظور اثر بخشی بیشتر وجود دارد. بیوتکنولوژی دست به تولید گروه نوینی از داروهای بیولوژیک زده که روشی کاملا نو را در طراحی داروها ارائه می‌کند و به طور همسو گرایش فزاینده‌ای برای استفاده از فراورده‌های گیاهی در درمان بیماری‌ها مشاهده می‌گردد (۳). وجود اثرات ضد میکروبی قوی در فرآورده‌های گیاهی دارای اهمیت ویژه‌ای است چرا که امروزه یکی از معضلات مهم علم پزشکی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها در بسیاری از عوامل پاتوژن رایج است. یکی از این گیاهان مورد توجه در این حوزه مرزنجوش می‌باشد. مرزنجوش (*Origanum vulgare* L.) گیاهی از خانواده نعناع (Laminaceae) و دارای اثرات ضد میکروبی است، به طوری که در بسیاری از گزارش‌ها این گیاه در زمره قوی‌ترین گیاهان از این لحاظ قرار دارد. گیاه مرزنجوش هم به دلیل اثرات مهاری بر میکروب‌ها مانع فساد غذا می‌شود و هم به دلیل اثر مهاری بر پراکسیداسیون لیپیدها باعث حفظ مواد مغذی موجود در آن می‌شود. اثر آنتی اکسیدان و ضد میکروبی، در فعالیت این گیاه به عنوان ماده نگهدارنده غذا اهمیت دارند (۴). بر اساس نتایج آنالیزهای شیمیایی متعدد عصاره و اسانس‌های گیاه، ترکیبات فنلی به خصوص اسیدهای فنلی و فلاونوییدها به عنوان عوامل موثر احتمالی مطرح شده اند. علاوه بر خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدان گیاهان جنس مرزنجوش، مواردی که هم اکنون به طور جدی و دقیق مورد مطالعه هستند اثرات ضد دیابتی، ضد فشار خون بالا، ضد التهابی، سمیت سلولی و آنتی موتاژنی می‌باشد (۵). پژوهش حاضر برای بررسی اثرات سینرژیک ضد باکتریایی نانو ذرات نقره و اسانس گیاه مرزنجوش بر روی باکتری‌های گرم مثبت (باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (اشریشیاکلی و سالمونلا انتریکا) به منظور معرفی یک فراورده ایمن صورت گرفت.

مواد و روش ها

استخراج اسانس مرزنجوش و آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده آن

به منظور تهیه اسانس برگ ها و سرشاخه های گیاه مرزنجوش جمع آوری شده از اطراف گرگان، به وسیله آسیاب برقی خرد شده و سپس ۲۰۰ گرم از پودر گیاه خشک پس از توزین با دستگاه کلونجر به مدت۳ ساعت اسانس گیری شد .در ادامه، اسانس با سولفات سدیم بدون آب، آبگیری و در ظرف دربسته تیره رنگ، دور از نور و در یخچال نگهداری شد. نمونه آماده شده توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی (GC-MS) تزریق گردید از آنجایی که ترکیبات موجود در اسانس به لحاظ وزن مولکولی و قطبیت بعنوان مواد فرار شناخته می شوند از این رو عمل جداسازی و شناسایی ترکیبات متشکله اسانس بدست آمده توسط روش کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی انجام گردید. مشخصات و شرایط دستگاه GC: 7890A شرکت Agilent Technologies ، نوع ستون HP-5MS با قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلی متر، ضخامت فیلم ۰/۳۲ میکرومتر و طول ستون ۳۰ متر، گاز حامل هلیوم با سرعت ۱ میلی‌متر در دقیقه بود. مشخصات و شرایط دستگاه MS: مدل 5975C شرکتAgilent Technologies ، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای یونیزاسیون ۲۴۰ درجه سانتی گراد بود. طیف های جرمی بدست آمده از دستگاه GC-MS با طیف های جرمی استاندارد موجود در منابع مقایسه گردید (۶). برای تایید شناسایی های انجام شده توسط طیف های جرمی، از شاخص بازداری کواتس مطابق GC-MS استفاده شد. برای تهیه استوک ذخیره اسانس از محلول ۵ درصد DMSO استفاده شد. جهت

استریل کردن، محلول ذخیره از فیلترهای میکروبی سر سرنگی ۰/۲ میکرون عبور داده شد.

تهیه نانو ذرات نقره

محلول کلوئیدی نانو ذرات نقره با قطر میانگین ذرات ۱۰ نانومتر و غلظت 4000 ppm از شرکت نانوسید تهران خریداری شدند. مطالعه و بررسی مورفولوژی و ریز ساختار نمونه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی KYKY SEM (EM3200) انجام شد. نمونه ها بر روی پایه های میکروسکوپ فیکس شدند و توسط دستگاه، لایه ای از طلا روی آنها را پوشاند تا هدایت الکترونی پیدا کنند و الکترون ها سطحی دفع شوند، درنتیجه وضوح تصاویر نیز بهبود یابد. تعیین توزیع اندازه نانوذرات نقره توسط دستگاه زتا سایزر انجام گردید. بدین منظور محلول نانوذرات نقره به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه سونیکیت شد. سپس توسط دستگاه زتا سایزر (Malvern3600 Instruments Ltd., Malvern,UK) در دانشگاه تهران مورد آنالیز قرار گرفت.

تهیه سویه های استاندارد باکتری های گرم مثبت و گرم منفی

نمونه‌های باکتریایی مورد مطالعه در این تحقیق شامل *Escherichia coli* (ATCC 25922)، *Salmonella enterica* (ATCC 1231)، *Staphylococcus aureus* (ATCC 6536) و *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) بود که به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی ایران در انستیتو پاستور خریداری شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC[1]) اسانس مرزنجوش و نانوذرات نقره

این بررسی به روش میکرودایلوشن براث انجام شد. در این روش از میکروپلیت ۹۶ خانه ای استفاده گردید. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های ۶۴۰ تا ۰/۳۱ میکرولیتر بر میلی لیتر از اسانس گیاه مرزنجوش بر اساس روش سریال دایلوشن به یک ردیف از چاهک های میکروپلیت ۹۶ تایی افزوده شد. سوسپانسیون میکروبی که با نیم مک فارلند برابر شده بود به وسیله محیط کشت مولر هینتون براث به میزان ۱/۱۰۰، جهت به دست آوردن تعداد 1×10^6 CFU/ml رقیق شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک افزوده شد، در این آزمون به منظور کنترل محیط کشت، از محیط کشت خالی (بدون اسانس و سوسپانسیون میکروبی) استفاده گردید. به منظور کنترل زمینه از اسانس و محیط کشت (بدون سوسپانسیون میکروبی) استفاده شد. یک چاهک هم به منزله کنترل DMSO (محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی به همراه DMSO ۵ درصد) در نظر گرفت شد. همچنین سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت بدون اسانس به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. حجم نهایی تمام چاهک ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. در نهایت میکروپلیت ها بر روی شیکر (۲۵۰ rpm) به مدت ۱ دقیقه قرار داده شد تا مخلوط کاملا یکنواخت گردد. سپس میکروپلیت ها در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت۲۰-۲۴ ساعت، انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت وجود کدورت (در مقایسه با ردیف کنترل) حاکی از رشد باکتری و شفافیت نشان دهنده عدم رشد باکتری می باشد. پایین ترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد و فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. تمام مراحل برای ۲۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین با ۳ بار تکرار انجام شد. حداقل غلظت بازدارندگی نانوذرات نقره با غلظت ۱۶۰۰ تا ۰/۷۸ میکروگرم بر میلی لیتر نیز به همین روش تعیین شد.

بررسی برهمکنش ضدمیکروبی اسانس مرزنجوش و نانوذره نقره

بررسی برهمکنش ضدمیکروبی اسانس مرزنجوش و نانوذره نقره به روش تیتراسیون چکربورد انجام شد. با استفاده از MIC به دست آمده آنها در مرحله قبل بود و رقت‌های ۱۶۰ تا ۱/۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از اسانس مرزنجوش و رقت‌های ۴۰۰ تا ۳/۱ میلی گرم در لیتر از نانوذره نقره در چاهک ها در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از

[1] Minimum Inhibitory Concentration

این آزمون به صورت غلظت ممانعت کننده‌ی سهمی (FIC)[۲] بیان شد. از مجموع FIC هر یک از عوامل ضدمیکروبی، شاخص غلظت های ممانعت کننده‌ی سهمی (FICI)[۳] به دست می آید. پس از محاسبه FICI تفسیر نتایج با استفاده از دستورالعمل کمیته‌ی اروپایی آزمون سنجش حساسیت ضدمیکروبی (EUCAST) صورت پذیرفت. براین اساس چنانچه FICI کوچکتر یا مساوی با ۰/۵ باشد، برهمکنش از نوع هم افزایی (Synergism)، بزرگتر از ۰/۵ تا ۱ از نوع افزایشی (Additive) و بزرگتر از ۱ تا کوچکتر از ۲ از نوع عدم تأثیر (Indifferent) و مساوی یا بزرگتر از ۲ از نوع نامساوی (Antagonism) می‌باشد (۷).

نتایج

نتایج آنالیز ترکیبات اسانس مرزنجوش

آنالیز ترکیبات موجود در اسانس مرزنجوش توسط دستگاه GC-MS انجام شد. طیف ها ی مربوط به هر ترکیب تفسیر و ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس شناسایی شدند. بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس را کارواکرول (۴۷/۱۱ درصد)، گاما ترپینن (۱۵/۱۱درصد) و تیمول (۱۲/۹۷ درصد) تشکیل می دهند.

نتایج ارزیابی اندازه و شکل نانوذرات نقره

تصاویر حاصل از روش SEM نانوذرات نقره خریداری شده را با شکل کروی با سطحی صاف را نشان داد. همچنین نتایج پارتیکل سایز آنالایزر نشان داد که نانوذرات با میانگین اندازه ۶۸ نانومتر هستند (شکل ۱ و ۲).

نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و اثر برهمکنش ضدمیکروبی اسانس مرزنجوش و نانوذره نقره

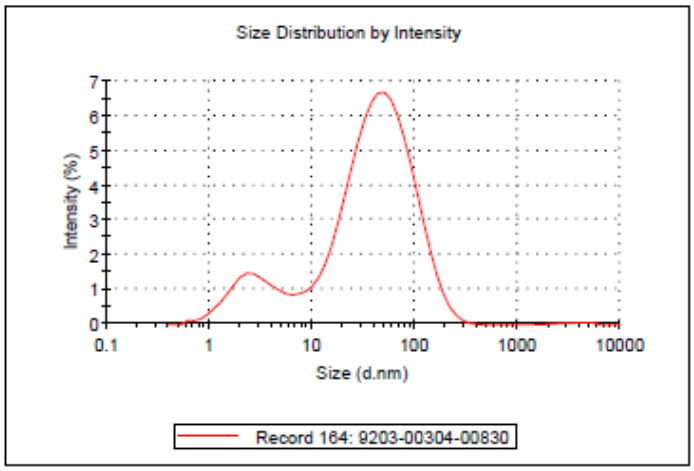
حداقل غلظت بازدارنده اسانس مرزنجوش به تنهایی و به صورت توام با نانوذره نقره برای باکتری‌های مورد مطالعه به روش میکرودایلوشن براث به دست آمد. در چاهک های کنترل محیط کشت، کنترل زمینه، کنترل DMSO هیچ کدورتی مشاهده نشد. چاهک کنترل مثبت کدر بود که حاکی از رشد باکتری ها می باشد. نتایج MIC اسانس مرزنجوش و نانوذرات نقره به تنهایی و نیز در ترکیب با یکدیگر برای ۴ سویه استاندارد در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اسانس مرزنجوش و نانوذره نقره به تنهایی روی سویه های مورد بررسی موثر هستند. همچنین ترکیب اسانس و نانوذره نقره روی باکتری های اشریشیاکلی، سالمونلا انتریکا، استافیلوکوکوس اورئوس اثر سینرژیک و روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس اثر افزایشی دارد.

بحث

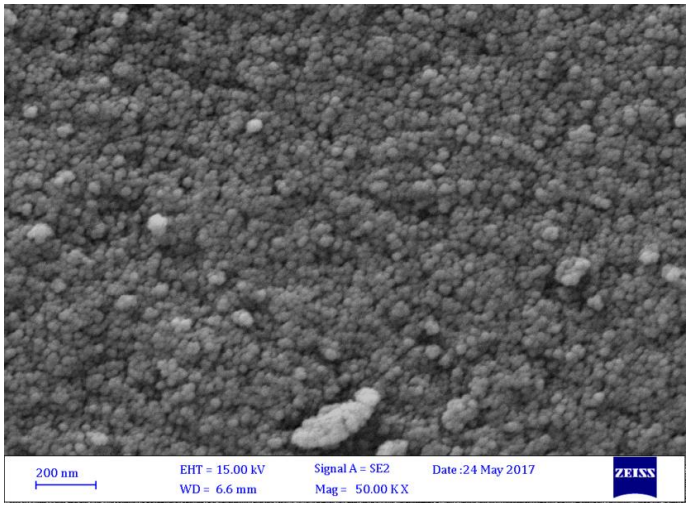
تاکنون چندین مطالعه روی اسانس گیاه مرزنجوش و ترکیبات آن انجام شده است. نگاهی اجمالی به نتایج بدست آمده در مطالعات گذشته، نشان میدهد که اسانس استخراج شده از اندام هوایی این گیاه حاوی ترکیباتی چون تیمول، کارواکرول، رزمارینیک اسید، بتابیزابول،کاریوفیلن و فلاوونوئیدها است (۸). به طورکلی با توجه به تعداد زیاد ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاهان، نمی توان مکانیسم واحدی برای اثرات ضد باکتریایی آنها در نظر گرفت بلکه این ترکیبات هدف های متعددی را در سلول دارند. از ویژگی های مهم اسانس‌ها و اجزاء تشکیل دهنده آنها خاصیت آبگریزی آنها می‌باشد که موجب نفوذ این مواد به لیپیدهای غشاء سلول باکتری و میتوکندری‌ها می‌شود و سبب اختلال در ساختمان های آنها و ایجاد نفوذپذیری بیشتر می‌گردد. این مسئله موجب خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی می‌شود. اگرچه خروج مقادیر محدود این مواد برای باکتری قابل تحمل است ولی در قابلیت زیستی آن اثر گذاشته و خروج مقادیر وسیع محتویات سلولی یا خروج یونها و ملکول های حیاتی موجب مرگ سلول خواهد شد. به طور کلی هر چه مقادیر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خواص آنتی باکتریال آنها علیه پاتوژنهای غذایی بیشتر خواهد بود (۹).

[2]Fractional Inhibitory Concentration
[3]Fractional Inhibitory Concentration Index

$$\mathbf{FICI} = \text{اسانس}\ \mathbf{FIC}\left(\frac{\mathbf{MIC}\ \text{سینرژیک‌اسانس}}{\mathbf{MIC}\ \text{منفرد اسانس}}\right) + \text{نانوذره}\ \mathbf{FIC}\left(\frac{\mathbf{MIC}\ \text{سینرژیک‌نانوذره}}{\mathbf{MIC}\ \text{منفرد نانوذره}}\right)$$



شکل ۲) نمودار پارتیکل سایز آنالایزر میانگین اندازه نانوذرات را ۶۸ نانومتر نشان می دهد.



شکل ۲) تصویر SEM از نمونه نانوذرات نقره با شکل کروی.

جدول ۱- نتایج MIC اسانس مرزنجوش و نانوذره نقره به تنهایی، MIC اسانس مرزنجوش و نانوذره نقره در ترکیب با یکدیگر، نتایجFIC اسانس مرزنجوش ونانوذره نقره، نتایج FIC index و نحوه برهم کنش ضد میکروبی آنها علیه سویه چهار سویه باکتری استاندارد

سویه ها	MIC اسانس مرزنجوش به تنهایی (µl/ml)	MIC نانوذره نقره به تنهایی (µg/ml)	MIC در ترکیب اسانس مرزنجوش (µg/ml)	MICدر ترکیب نانوذره نقره (µl/ml)	FIC اسانس مرزنجوش	FIC نانوذره نقره	FICI	اثربرهمکنش ضدمیکروبی
اشریشیاکلی	۵	۵۰	۱/۲۵	۱۲/۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	سینرژیک
سالمونلا انتریکا	۴۰	۱۰۰	۱۰	۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	سینرژیک
باسیلوس سوبتیلیس	۱۰	۲۰۰	۵	۵۰	۰/۵	۰/۲۵	۰/۷۵	افزایشی
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰	۱۰۰	۲/۵	۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۵	سینرژیک

بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس مرزنجوش در تحقیق حاضر را کارواکرول (۴۷/۱۱ درصد)، گاما ترپینن (۱۵/۱۱درصد) و تیمول (۱۲/۹۷ درصد) تشکیل می دهند. میزان ترکیبات ضدمیکروبی در بخش‌های مختلف یک گیاه و حتی در بافت‌های متفاوت و از فصلی به فصل دیگر متفاوت است به علاوه مقدار این ترکیبات بعد از گل دهی و بعد از طی مراحل بلوغ و حتی در گیاهان در معرض استرس بیشتر است (۱۰). مکانیسم اثر کارواکرول و تیمول به عنوان ترکیبات اصلی اسانس مرزنجوش بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است .کارواکرول و تیمول از نظر ساختمانی بسیار به یکدیگر شبیه هستند تفاوت آنها در موقعیت گروه هیدروکسیل در حلقه فنلی است که در تیمول در موقعیت متا قرار دارد .این دو ترکیب قادرند که غشاء خارجی باکتری های گرم منفی را متلاشی کرده و سبب خارج شدن لیپو پلی ساکاریدها و افزایش نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی شوند. کارواکرول علاوه بر ممانعت از رشد سلولهای باکتری ها، همچنین قادر به ممانعت از تولید توکسین توسط باکتری نیز میشود. در مطالعه آلتی و همکاران مشخص شد که کارواکرول قادر است از تولید توکسین ایجاد کننده اسهال توسط باسیلوس سرئوس ممانعت نماید. دو نظریه در این خصوص مطرح است یکی اینکه به علت تداخل کارواکرول با تولید ATP ممکن است ATP کافی برای خارج کردن توکسین از سلول که یک روند فعال و وابسته به انرژی می باشد مهیا نباشد و دیگر اینکه با پایین آمدن میزان رشد اختصاصی احتمالاً سلول تمام انرژی خود را صرف زنده ماندن خود می کند. از ترکیبات مهم دیگری که در اسانس مرزنجوش وجود دارد تیمول است که احتمالاً مکانیسم اثر این ترکیبات هم مانند سایر ترکیبات فنولی یعنی ایجاد اختلال در غشاء سیتوپلاسمی، بر هم زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی، انعقاد محتویات سلولی می باشد (۱۱).

در تحقیق حاضر، MIC در دامنه بین ۵- ۴۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اسانس گیاه مرزنجوش روی باکتری اشریشیاکلی بیشترین اثر ضدمیکروبی را دارد. در بین باکتری‌های مورد بررسی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس به عنوان باکتری‌های گرم مثبت از نظر میزان تأثیرپذیری از اسانس مرزنجوش مشابه هم بود و رتبه دوم را نشان داد. حداقل غلظت بازدارندگی سالمونلا انتریکا در غلظت۴۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به دست آمد و کمترین حساسیت را به اسانس مرزنجوش نشان دادند.

اثر ضدباکتری اسانس مرزنجوش بر علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها مانند باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس فکالیس و اشریشیاکلی بررسی و تایید شده است (۱۲). در پژوهشی که این زمینه انجام دادند نتیجه گرفتند که اسانس مرزنجوش بر روی ۱۰ باکتری از

جمله سالمونلا و استافیلوکوکوس و ۱۵ قارچ خاصیت ضدمیکروبی دارد که نتایج این تحقیق با نتایج مذکور در مورد باکتری های این مطالعه مطابقت دارد (۱۳). همچنین در مطالعه دیگر حداقل غلظت بازدارندگی اسانس مرزنجوش روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم ۰/۵ و ۱ میکرولیتر بر میلی لیتر بدست آمد (۱۴).

نتایج مطالعه حاضر در مورد نانوذره نقره مشخص نمود میزان MIC نانوذرات نقره علیه باکتری های مورد مطالعه بین ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. این نتایج با پژوهش‌های دیگری که در این زمینه انجام شده مطابقت دارد (۱۵). نانوذرات نقره به روش‌های متفاوتی روی باکتری ها تاثیر می‌گذارند. از جمله این روش ها اتصال آنها به گروه‌های سولفیدی است که منجر به دناتوراسیون پروتئین و کاهش باندهای دی سولفیدی می شوند، علاوه بر این نانو ذرات نقره می‌توانند به گروه‌های دهنده الکترون حاوی گوگرد، اکسیژن و یا نیتروژن که به طور طبیعی وجود دارند متصل شوند و باعث اختلال در متابولیسم میکروارگانیسم مورد نظر گردند. بنابراین نانو ذرات به غشای سلولی متصل و به داخل باکتری نفوذ کرده و یون‌های مثبت نقره را آزاد می‌کند و نهایتاً منجر به مرگ باکتری می‌گردد. تحقیقات اخیر دانشمندان نشان می دهد زمانی که ذرات نانو نقرات با باکتر ی‌ها و قارچ‌ها مواجه شوند، سیستم تنفسی آنها را از کار می اندازند، که این عمل باعث می شود متابولیسم سلولی آنها مختل شده و از رشد سلول جلوگیری شود. نانوذرات نقره با القای مرگ نیز می تواند باعث تخریب (Apoptosis) برنامه ریزی شده سلولی تخصصی باکتری‌ها گردد .از طرفی، تولید و نگهداری نانوذرات نقره احتمالاً خیلی ارزان تر و ساده تر از داروهای رایج است (۱۶). در مطالعه‌ی اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره علیه باکتریهای استرپتوکوکوس موتانس و اشرشیا کلی میزان MIC ذرات نانو نقره مورد سنجش قرار گرفت و نشان داده شد که MIC استرپتوکوکوس موتانس و اشرشیاکلی به ترتیب ۵۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر می‌باشد (۱۷). همچنین در مطالعه ی که در سال ۲۰۱۶ انجام شد و اثر نانوذرات نقره با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر سه سویه سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی بررسی و تایید شد (۱۸). در مطالعه‌ی Morones و همکاران در سال ۲۰۰۵ خاصیت آنتی باکتریال سه اندازه مختلف نانوسیلور با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر برروی استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد که معلوم شد اثر باکتریوسیدال نانوذرات نقره وابسته به سایز بوده و هرچه اندازه ذرات کوچکتر باشند به دلیل افزایش سطح تماس اثر آنتی باکتریایی آنها افزایش می‌یابد ضمنا در این مطالعه نشان داده شد که علاوه براندازه، مورفولوژی ذرات نیز در خاصیت ضدباکتریایی آن مؤثر است (۱۹). همچنین مطالعات نشان دادند که ذرات نانوسیلور علیه باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت مؤثرتر است که نتایج حاصل از این دو مطالعه در تایید نتایج مطالعه‌ی حاضر می‌باشد (۲۰ و ۲۱).

نانوذرات نقره به تنهایی فعالیت ضد باکتری دارند اما امکان استفاده از آنها در ترکیب با آنتی بیوتیک ها و ترکیبات گیاهی به منظور اثر بخشی بیشتر وجود دارد. پژوهش حاضر نیز با این هدف به بررسی اثر سینرژیک ضدباکتریایی نانوذرات نقره و اسانس مرزنجوش پرداخت. نتایج نشان داد که که اسانس مرزنجوش و نانوذره نقره به تنهایی روی سویه های مورد بررسی موثر هستند. همچنین ترکیب اسانس و نانوذره نقره روی باکتری های اشریشیاکلی، سالمونلا انتریکا، استافیلوکوکوس اورئوس اثر سینرژیک و روی باکتری باسیلوس سوبتیلیس اثر افزایشی دارد. پژوهش لی و همکارانش روی اثرات ترکیبی نانوذرات نقره و آنتی بیوتیک وسیع الطیف آموکسی سیلین علیه باکتریهای مقاوم به متی سیلین *S. aureus* و *E. coli* نشان داد که حداقل غلظت مهاری آموکسی سیلین در ترکیب با نانوذرات نقره علیه این دو میکروارگانیسم در مقایسه با آنتی بیوتیک به تنهایی، به ترتیب ۴ و ۸ برابر کاهش می یابد (۲۲). در مطالعه ای که به منظور تعیین اثر *E. coli* باکتری نانوذرات نقره توأم با عصاره اتانولی اکالیپتوس بر مهار رشد باکتری *E. coli* انجام شد مشاهده شد که بهترین اثر بازدارندگی رشد باکتری *E. coli* در غلظت ۵۰ میکروگرم از نانوذرات نقره با عصاره ۱۰۰ درصد اتانولی گیاه اکالیپتوس است (۲۳).

استفاده از نانوذرات فلزی به دلیل اندازه‌ی کوچک و در نتیجه بالا بودن نسبت سطح به حجم، سطح تماس بالایی با

محیط و میکروارگانیسم‌ها پیدا میکند که این می تواند منجر به افزایش فعالیت بیولوژیک و شیمیایی آنها شود. اما نانوذرات فلزی علیرغم اثرات قابل توجه ضدباکتریایی، دارای چند مشکل هستند. نانوذرات فلزی میتوانند عوارض سمی جبران ناپذیری روی برخی از سلولهای پستانداران داشته باشند. حتی مصرف خوراکی این نانوذرات میتواند آسیب های قابل توجهی بر بافتهای کبدی، کلیوی، قلبی و معدی وارد نماید (۲۴). از سوی دیگر باکتری‌ها نیز دارای راهکارهایی برای مقابله با نانوذرات فلزی هستند که عمده ترین آنها دستیابی به جهش های هدفمند و یک مرحله‌ای به میزان بالا و با هدف افزایش خروج یونهای فلزی به خارج از سلول است. با توجه به اینکه عصاره و اسانس‌های بدست آمده از گیاهان معطر دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضدقارچی، ضداکسایشی و ضدسرطانی بوده و قادر هستند رشد پاتوژن ها و تولید سم توسط ریزسازواره ها را کنترل کنند (۲۵). بنابراین به نظر می رسد کمپلکس نانوذره - اسانس می‌تواند موجب افزایش اثرات ضدباکتریایی این ترکیبات شود و مقاومت باکتریایی در برابر داروهای ترکیبی مانند اسانس‌های گیاهی و نانوذرات، در مقایسه با داروهایی که از یک ترکیب ساخته شده را کاهش دهند، علاوه بر استفاده از این داروهای ترکیبی ایمن می‌تواند راه موثری برای کاهش عوارض داروهای شیمیایی باشد.

نتیجه گیری

یافته‌های این پژوهش، خاصیت ضد باکتریایی هم افزایی اسانس مرزنجوش- نانو ذرات نقره را به خوبی آشکار ساخت و نشان داد که ترکیب نانو ذرات نقره و اسانس مرزنجوش که می‌تواند در صنایع غذایی به عنوان نگهدارنده و در صنایع دارویی برای درمان بیماری‌هایی همچون مسمومیتهای غذایی و عفونتهای گوارشی و ادراری مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1. Witte, W., 2004. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. 4(3): 187-191.
2. Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., Muthumary, J., Srinivasan, K., 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. Spectrochimica Acta Part A 79: 594-8.
3. Zarina, A., Nanda, A., 2014. Combined efficacy of antibiotics and biosynthesized silver nanoparticles from Streptomyces albaduncus. Int. J Pharm. Technol Res6(6):1862-1869.
4. Mombeini, T., Mombein,i M., Aghayi, M., 2009. Evaluation of pharmacological effects of Origanum genus (Origanum spp.). J Med Plants 8 (29):18-35
5. LaGow, B., 2004. PDR for herbal Medicine.Third edition,Thomson PDR, USA. pp: 808-9, 609- 10.
6. Adams, R. P., 2001. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Quadropole Mass Spectroscopy Carol Stream IL: Allured Publishing Crop 465p.
7. Pillai, S., K., Moellering, R. C., Eliopoulos, G.M., 2005. Antimicrobial combinations. In:Lorian V, ed. Antibiotics in laboratory medicine. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins 365-440.
8. Shahnia, M., Khaksar, R., 2013 Antimicrobial effects and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) methods of essential oils against pathogenic bacteria. Iranian J Nutr Sci Food Technol 7 (5) :949-955
9. Özkalp, B., Sevgi, F., Özcan, M. and Özcan, M.M., 2010. The antibacterial activity of essential oil of oregano (Origanum vulgare L.). J Food Agric Environ 8(2): 6-8.
10. Zhou, F., Ji, B., Zhang, H., Jiang, H.U.I., Yang, Z., Li, J., Li, J., Yan, W., 2007. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen Salmonella typhimurium. Journal of food safety 27(2): 124-133.
11. Xu, J., Zhou, F., Ji, B.P., Pei, R.S., Xu, N., 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli. Letters in Applied Microbiology 47(3): 174-179.

12. De Falco, E., Mancini, E., Roscigno, G., Mignola, E., Taglialatela-Scafati, O., Senatore, F., 2013. Chemical composition and biological activity of essential oils of Origanum vulgare L. subsp. vulgare L. under different growth conditions. Molecules 18(12): 14948-14960.
13. Chaudhry, N.M.A., Saeed, S., Tariq, P., 2007. Antibacterial effects of oregano (Origanum vulgare) against gram negative bacilli. Pakistan Journal of Botany 39(2): 609.
14. Faleiro, L., Miguel, G., Gomes, S., Costa, L., Venâncio, F., Teixeira, A., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., 2005. Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from Thymbra capitata L.(Cav.) and Origanum vulgare L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(21):8162-8168.
15. Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba ,S., Rai M., Morelli, G., Galdiero, M., 2015. Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents Molecules 20:8856-8874.
16. Dong, Y., Sun, X., 2019. Antibacterial Mechanism of Nanosilvers. Current Pharmacology Reports 5(6):401-409.
17. Woo Kyung, J., Hye Cheong, K., Ki Woo, K. ,So Hyun, K., Yong Ho, P., 2010 Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli Appl Environ Microbiol.J ADA 74(21): 78–107.
18. Helmlinger, J., Sengstock, C., Groß-Heitfeld, C., Mayer, C., Schildhauer, T.A., Köller, M., Epple, M., 2016. Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects. RSC advances 6(22): 18490-18501.
19. Morones, J.R., Elechiguerra. J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramirez, J.T., 2005. The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles. J Nanotechnology 16(10): 2346-53.
20. Marambio-Jones, C., Hoek, E.M., 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. Journal of Nanoparticle Research 12(5): 1531-1551.
21. Martínez-Castañon, G.A., Nino-Martinez, N., Martinez-Gutierrez, F., Martinez-Mendoza, J.R., Ruiz, F., 2008. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. Journal of Nanoparticle Research 10(8): 1343-1348.
22. Lee, H.Y., Park, H.K., Lee Y.M., Kim, K., Park, S.B., 2007. A practical procedure for producing silver nano coated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. J Chem Commun 28(28): 2959-61.
23. Naghsh, N., Soleymani, S., Torkan, S., 2013 Inhibitory effect of alcoholic eucalyptus extract with nanosilver particles on E. coli growth. J Gorgan Univ Med Sci 15 (2): 60-64
24. Zoroddu, M.A., Medici, S., Ledda, A., Nurchi, V.M., Lachowicz, J.I., Peana, M., 2014. Toxicity of nanoparticles. Curr Med Chem 21(33): 3837-3853.
25. Scandorieiro, S., de Camargo, L.C., Lancheros, C.A., Yamada-Ogatta, S.F., Nakamura, C.V., de Oliveira, A.G., Andrade, C.G., Duran, N., Nakazato, G., Kobayashi, R.K., 2016. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. Frontiers in Microbiology 7: 760.