



## Investigating the Effects of Some Growth Regulators In Vitro Culture (*Rhododendron yakusimanum* L.)

Mohammad Ebrahimzadeh

Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch, Varamin, Tehran

**Place of Research:** Department of Biology, Islamic Azad University, Branch of Varamin and Pishva.

Article Info

Abstract

### Article History:

Received 02.14.2024  
Revised 05.21.2024  
Accepted 07.10.2024  
Online 07.12.2024

### KeyWords:

In vitro culture,  
*Rhododendron yakusimanum*,  
growth regulators,  
organogenesis.

### \*Corresponding author:

E-mail address

m.ebrahimzadeh530@gmail.com

**Introduction:** *Rhododendron yakusimanum* plant (*Rhododendron yakusimanum* L.) is one of the ornamental plants in the world that is propagated by the traditional method of cutting leafy stems. Unfortunately, this method is not completely successful and cutting losses are high. Also, in this method, it is possible to spread infected plants.

**Aim:** In this research, it was tried to investigate the propagation of this plant using different hormone concentrations.

**Materials and Methods:** First, the branches were separated from the greenhouse plants and the surface contamination of the samples was removed using %70 alcohol and %2 sodium hypochlorite, respectively, with 20 seconds and 15 minutes. The sterilized pieces were cultured in media containing different concentrations of growth regulators 2,4 -D (2-0 mg/L) and 2ip (10-0 mg/L) for the purpose of calligenesis. After 90 days, the callus volume was measured and analyzed using SPSS software. To study the organogenesis of the resulting calli, they were planted in environments designed with the hormones IAA (4-0 mg/L) and 2ip( 5-0 mg/L) and the growth of aerial parts was investigated. The rooting of elongated branches was also evaluated in different environments. evaluated.

**Results:** The highest callus volume was obtained at the concentration of 5 mg/ml of 2ip and 0.5 mg/L of 2,4 -D in lighting. the best medium for organogenesis was 4 mg/L of 2ip and 0.5 mg/L of IAA. The results indicated the root growth in the environment outside the root in the perlite bed.

**Conclusion:** Rooted microstems of rhododendron were successfully transformed into mature plants after acclimatization in the greenhouse by using in-glass culture of branching isolates.

**Cite this article:** Ebrahimzadeh M. Investigating the Effects of Some Growth Regulators In Vitro Culture (*Rhododendron yakusimanum* L.) Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(4):1-10

**Publisher:** Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

**Print ISSN:** 1735-4226

**Online ISSN:** 1727-459X

**This is an open access article under the:** <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



## اثرات برخی تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت شیشه گیاه *Rhododendron yakusimanum* L.

محمد ابراهیم زاده

استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا

چکیده

اطلاعات مقاله

**مقدمه:** گیاه رودوندرون یا کوزیمانوم (*Rhododendron yakusimanum* L.) از تیرهٔ اریکاسه از جمله گیاهان زینتی است که در دنیا به روش سنتی قلمه‌زدن ساقه‌های برگدار زیاد می‌شود. متأسفانه این روش به طور کامل موفقیت‌آمیز نیست و تلفات قلمه‌ها بالاست. همچنین در این روش امکان گسترش گیاهان آلوده فراهم می‌شود.

**هدف:** در این تحقیق سعی گردید با استفاده از غلظت‌های مختلف هورمونی تکثیر این گیاه مورد بررسی قرار گیرد.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا سرشاخه‌ها از گیاهان گلخانه‌ای جدا شده و آلودگی سطحی نمونه‌ها با استفاده از الکل 70% و هیپوکلریت سدیم 2%، به ترتیب با زمانهای 20 ثانیه و 15 دقیقه برطرف گردید. قطعات سترون‌شده به منظور کالزایی به محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D (۲۰۰ میلی گرم برلیتر) و 2ip (۱۰۰ میلی گرم برلیتر) کشت داده شدند. پس از 90 روز حجم کالوس‌ها اندازه‌گیری شده و با کمک نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مطالعه اندام‌زایی کال‌های حاصله به محیط‌های طراحی شده با هورمونهای IAA (۴۰۰ میلی گرم برلیتر) و 2ip (۵۰۰ میلی گرم برلیتر) واکشت شده و رشد اندام هوایی مورد بررسی قرار گرفت. ریشه‌زایی شاخه‌های طویل شده نیز در محیط‌های مختلف ارزیابی شد.

**نتایج:** بیشترین حجم کالوس در غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر 2ip و ۰/۵ میلی گرم برلیتر 2,4-D در روش‌نابی بدست آمد. بهترین محیط برای اندام‌زایی ۴ میلی گرم برلیتر 2ip و ۰/۵ میلی گرم برلیتر IAA حاصل شد. نتایج حاکی از رشد ریشه در محیط خارج از ریشه در بستر پرلیت بوده است.

**نتیجه‌گیری:** ریز ساقه‌های ریشه دار شده رودوندرون با استفاده از کشت درون شیشه جداکشت های سرشاخه نهایتاً پس از سازگاری در گلخانه بطور موفقیت آمیزی تبدیل به گیاهان بالغ گردیدند

### تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۲/۱۱/۲۴

بازنگری ۱۴۰۳/۰۲/۲۲

پذیرش ۱۴۰۳/۰۴/۲۰

نهایی ۱۴۰۳/۰۴/۲۳

### کلمات کلیدی

کشت درون شیشه  
رودوندرون یا کوزیمانوم  
تنظیم‌کننده‌های رشد  
اندام‌زایی

### \* نویسنده مسئول

m.ebrahimzadeh530@gmail.com

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: ابراهیم زاده م، اثرات برخی تنظیم‌کننده‌های رشد در کشت شیشه گیاه *Rhododendron yakusimanum* L. مجله دانش زیستی

ایران. ۱۴۰۲؛ ۱۸ (۴): ۱-۱۰

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا    شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶    شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹۶X    نویسندگان: © حق مؤلف

## مقدمه:

بالا امکان آلوده شدن گیاه به عوامل میکروبی و ویروسی را باعث می‌شود که عملاً امروزه این روش تکثیر اعتبار خود را از دست داده است. به دلایل فوق، امروزه روش‌های مختلف ریز ازدیادی شیشه‌ای به عنوان جایگزین روش‌های سنتی که دارای جهات مطلوب بیشتری است کاربرد فراوانی یافته است (۶-۴). ازسوی دیگر چون تعداد این وارپته در کشور بسیار محدود و کم می‌باشد تنها راه تولید آن بروش کشت بافت می‌باشد که در این پژوهش بدان پرداخته شده است. در پژوهش‌های انجام شده برای ریز ازدیادی گونه‌های مختلف رودودندرون و آزالیا جوانه‌های رأسی و جانبی در کنار برگ‌ها به عنوان قطعه جدا کشت مطلوب معرفی شده است که در این تحقیق نیز از آنها استفاده شده است (۷-۸).

جنس رودودندرون به همراه آزالیا که برخی این جنس را هم بخشی از سرده رودودندرون می‌دانند دارای گل‌های بسیار زیبا می‌باشد که در نواحی کوهستانی اروپا، آسیای میانه، آسیای جنوبی و آمریکای شمالی یافت می‌شوند (۱). گونه‌های این سرده به لحاظ داشتن خواص دارویی در کنار زیبایی گل‌ها در جهان از اهمیت زیادی برخوردارند. در ایران این سرده بطور محدودی در نواحی شمالی اطراف چالوس، نوشهر و کلاردشت بطور محدودی و بصورت دست کاشت وجود دارد. لذا تکثیر این گیاه در این تحقیق ضروری به نظر می‌رسید. روش عمومی تکثیر، ریشه‌دار کردن قلمه‌های خشبی می‌باشد. ولی تلفات در این قلمه‌ها به شدت بالا بوده و به راحتی ریشه‌دار نمی‌گردند (۲-۳). همچنین ازدیاد قلمه در کنار تلفات

## مواد و روش‌ها

و نتیجه‌گیری نهایی پس از یک ماه صورت پذیرفت. میانگین آماری و خطای میانگین محاسبه شده و داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تفسیر نهایی نیز با استفاده از آزمون‌های تکمیلی بررسی شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از MSTATC عوامل مورد بررسی، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در نظر گرفته شد. نهایتاً تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

در مرحله بعد کالوس‌های تشکیل شده در محیط‌های کالزایی با اندازه‌های یکسان در محیط‌های اندام‌زایی واکشت گردید. تا اثر ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد مورد بررسی قرار گیرد. برای دستیابی به این هدف محیط‌های اندام‌زایی بر مبنای محیط پایه Anderson طبق جدول (۲) تهیه گردید.

در تمامی محیط‌های فوق همانند محیط‌های مربوط به کالزایی از ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز استفاده شده و pH محیط‌ها نیز روی ۵/۵ تنظیم گردید. محیط‌های کشت شده در دو شرایط تاریکی و روشنایی با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد تا اثر نور نیز بر اندام‌زایی مورد بررسی قرار گیرد.

سرشاخه‌های جوان رودودندرون یا کوزیمانوم پس از برداشت از گیاه مادر در شرایط حفاظت شده بدون تأثیرگذاری عوامل تنش‌زا و میکروبی به آزمایشگاه منتقل گردید. ابتدا به دقت ساقه و برگ‌ها در جریان آب شسته شده و همزمان از چند قطره مایع ظرفشویی برای پاک‌کنندگی بیشتر استفاده گردید. سپس قطعات جدا کشت به ظروف سترون منتقل شده و از تیمار الک ۷۰٪ به مدت ۲۰ ثانیه استفاده گردید، بلافاصله بعد از تیمار الک، قطعات جدا کشت در معرض هیپوکلریت سدیم ۲٪ قرار گرفتند پس از طی زمان ۱۵ دقیقه نمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر سترون آبکشی شده و بعد از حذف نمودن حاشیه‌های آسیب‌دیده، برگ در شرایط سترون به قطعات کوچکتر تقسیم شده و در محیط‌های Anderson کشت شدند به محیط‌های کشت ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و 2,4-D و ۲ip در غلظت‌ها و ترکیب‌های مختلف افزوده شده و pH آنها روی ۵/۵ تنظیم گردید. برای راسب نمودن محیط‌ها نیز از ۷ گرم بر لیتر آگار استفاده شد و پس از آماده‌سازی نهایی بوسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سترون گردیدند. نمونه‌های کشت شده بر محیط‌های کالزایی که دارای ترکیبات مختلف دو هورمون 2,4-D و ۲ip براساس جدول (۱) بود در دو شرایط تاریکی و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. بازبینی‌ها هر هفته صورت گرفته

جدول (۱) غلظت و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌های مختلف کالزایی

| $\gamma$ ,۴-D (mg/L)<br>۲ip (mg/L) | ۰          | ۰/۲۵        | ۰/۵        | ۱        | ۲        |
|------------------------------------|------------|-------------|------------|----------|----------|
| ۰                                  | ۰<br>A12ip | ۰/۲۵<br>A2  | ۰/۵<br>A3  | ۱<br>A4  | ۲<br>A5  |
| ۱                                  | ۰<br>A6    | ۰/۲۵<br>A7  | ۰/۵<br>A8  | ۱<br>A9  | ۲<br>A10 |
| ۳                                  | ۰<br>A11   | ۰/۲۵<br>A12 | ۰/۵<br>A13 | ۱<br>A14 | ۲<br>A15 |
| ۵                                  | ۰<br>A16   | ۰/۲۵<br>A17 | ۰/۵<br>A18 | ۱<br>A19 | ۲<br>A20 |
| ۱۰                                 | ۰<br>A21   | ۰/۲۵<br>A22 | ۰/۵<br>A23 | ۱<br>A24 | ۲<br>A25 |

جدول (۲) غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط‌های اندام‌زایی

| IAA(mg/L)<br>۲ip (mg/L) | ۰        | ۰/۰۵        | ۰/۲۵        | ۰/۵        | ۱        | ۲        | ۴        |
|-------------------------|----------|-------------|-------------|------------|----------|----------|----------|
| ۰                       | ۰<br>B1  | ۰/۰۵<br>B2  | ۰/۲۵<br>B3  | ۰/۵<br>B4  | ۱<br>B5  | ۲<br>B6  | ۴<br>B7  |
| ۰/۵                     | ۰<br>B8  | ۰/۰۵<br>B9  | ۰/۲۵<br>B10 | ۰/۵<br>B11 | ۱<br>B12 | ۲<br>B13 | ۴<br>B14 |
| ۱                       | ۰<br>B15 | ۰/۰۵<br>B16 | ۰/۲۵<br>B17 | ۰/۵<br>B18 | ۱<br>B19 | ۲<br>B20 | ۴<br>B21 |
| ۲                       | ۰<br>B22 | ۰/۰۵<br>B23 | ۰/۲۵<br>B24 | ۰/۵<br>B25 | ۱<br>B26 | ۲<br>B27 | ۴<br>B28 |
| ۴                       | ۰<br>B29 | ۰/۰۵<br>B30 | ۰/۲۵<br>B31 | ۰/۵<br>B32 | ۱<br>B33 | ۲<br>B34 | ۴<br>B35 |
| ۵                       | ۰<br>B36 | ۰/۰۵<br>B37 | ۰/۲۵<br>B38 | ۰/۵<br>B39 | ۱<br>B40 | ۲<br>B41 | ۴<br>B42 |

## نتایج

تیمارهای و طرح آزمایشی

اثر سطوح مختلف ۲ip در القاء کالزایی

مقایسه میانگین حجم و وزن تر کالوس با آزمون دانکن آشکار نمود که بدون توجه به غلظت اکسین هر چه غلظت ۲ip از ۱ میلی گرم بر لیتر به سمت ۵ میلی گرم بر لیتر افزایش یافت، شاخص های مورد سنجش از جمله دوام قطعه جدا کشت افزوده گردید. بیشترین میزان آن که حکایت از تقسیم سلولی و تشکیل کالوس داشت در محیط با غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر ۲ip صورت پذیرفت. افزایش یا کاهش ۲ip باعث کاهش و یا عدم تولید کالوس گردید.

در تمامی محیط هایی که غلظت های متغیر هورمون 2,4-D، بدون حضور ۲ip و محیط هایی که دارای غلظت های متغیر ۲ip، بدون حضور 2,4-D بود کالوسی پدیدار نگردید. در محیط های دارای غلظت های ۱ میلی گرم بر لیتر ۲ip در کنار غلظت های متغیر 2,4-D، کوچکترین حجم کالوس مشاهده شد. هرچه مقدار هورمون

سیتوکینین به سمت ۳ و ۵ میلی گرم بر لیتر افزایش نشان می داد، بطور قابل توجهی بر حجم کالوس افزوده می گردید، در محیط های دارای غلظت های ۵ میلی گرم بر لیتر ۲ip با غلظت های متغیر 2,4-D، بزرگترین توده کالوسی تشکیل شده در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر 2,4-D مشاهده گردید، حجم این توده کالوسی بطور میانگین بالغ بر ۳/۹۲ سانتی مترمکعب بود.

در غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر ۲ip و غلظت های متغیر 2,4-D، تنها در غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر 2,4-D توده کالوسی مختصری با ابعاد ۴\*۳\*۳ میلی مترمربع مشاهده گردید. در سایر نمونه های کشت شده در این گروه تنها تورم مختصری در کنار قطعه جدا کشت مشاهده شد. لازم به ذکر است که کالوس های تشکیل شده بر محیط های دارای غلظت های ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر 2,4-D بعد از ۵ هفته قهوه ای رنگ شده و رشدشان متوقف گردید.

جدول (۳) میزان حجم کالوس و وزن تر کالوس

| منابع تغییر           | درجه آزادی | میانگین مربعات صفات اندازه گیری شده |              |
|-----------------------|------------|-------------------------------------|--------------|
|                       |            | حجم کالوس                           | وزن تر کالوس |
| تنظیم کننده رشد ۲ip   | ۲          | ۲۸/۱۹**                             | ۳/۹**        |
| تنظیم کننده رشد ۲،۴-D | ۲          | ۳۰/۱۲**                             | ۰/۷۵**       |
| ۲ip* 2,4-D            | ۴          | ۱۳/۱۷                               | ۰/۰۶*        |
| خطای آزمون            | ۳۶         | ۰/۵                                 | ۰/۰۰۶        |
| کل                    | ۴۸         |                                     |              |
| C.V.%                 |            | ۲۹/۴۳                               | ۱۲/۸۵        |

\*\* معنی دار بودن میانگین ها در سطح ۱ درصد

\* معنی دار بودن میانگین ها در سطوح ۵ درصد

سلولی همچنین در مرحله اندامزایی نیز مشهود بود. بطوریکه تشکیل جوانه های رویشی بر روی توده های کالوسی تنها در شرایط نوری مشاهده گردید.

اثر سطوح مختلف ۲ip بر اندامزایی

در جدول (۲) همانگونه که مشاهده می گردد ۴۲ محیط با غلظت های هورمونی مختلف اکسین- سیتوکینین پیشنهاد شده است که بر هر محیط ۳ قطعه کالوس

اثر نور و تاریکی بر روند تقسیم سلولی و اندامزایی در این بررسی اثر نور در دو مرحله مورد توجه قرار گرفت. نور در نمونه هایی که به منظور کالزایی در محیط ها کشت شده بودند اثر تحریک کننده بر روند تقسیم سلولی گذاشته، بطوریکه در غلظت های هورمونی تعبیه شده در تاریکی کالوسی تشکیل نگردید و تشکیل کالوس تنها در برخی از محیط های قرار گرفته در شرایط نوری مشاهده گردید. این اثر تحریکی نور در تقسیم

در غلظت ۱ میلی گرم IAA و به میزان ۱/۶۱ سانتی متر بود.

در محیط‌های با غلظت ۵ میلی گرم بر لیتر ۲ip و غلظت‌های متغیر IAA نیز رشد مناسب زی توده مشاهده گردید ولی میزان رشد در مقایسه با غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر ۲IP در غلظت بالاتر IAA اتفاق افتاد. در این سری از محیط‌ها نیز طول ریز ساقه‌های تشکیل شده بر محیط‌های دارای ۴ میلی گرم بر لیتر IAA بیش از محیط‌های دارای ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر IAA ثبت گردید. در این غلظت هورمون سیتوکینین افزایش میزان هورمون اکسین باعث طویل شدن طول ساقه تا حد ۱/۲ سانتی متر گردید.

#### ریشه‌زایی

بلندترین ریزساقه‌های بدست آمده در محیط‌های in vitro با غلظت‌های مختلف هورمون IBA واکشت گردید که هیچ نشانه‌ای از ریشه‌زایی مشاهده نگردید و ریشه‌زایی موفق در محیط خارج شیشه در بستر پرلیت بعد از یک ماه مشاهده گردید.

واکشت گردید. در هر محیط معیارهای حجم زی توده، تمایزبایی و ارتفاع ساقه مورد بررسی قرار گرفت.

در محیط‌های دارای ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر ۲ip با غلظت‌های متغیر IAA عملاً هیچگونه رشدی در توده‌های کالوسی مشاهده نگردید و قطعات کشت شده پس از ۶ هفته قهوه‌ای شده و رشدشان متوقف گردید. در محیط‌های دارای ۲ میلی گرم بر لیتر ۲ip و غلظت‌های متغیر IAA هرچه مقدار هورمون از ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر بالاتر می‌رفت رشد زی توده کمتر و سپس در ۱ میلی گرم بر لیتر و یا بالاتر متوقف می‌گردید در عوض در غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر بیشتر طویل شدن شاخه‌ها تا حد ۳ میلی متر مشاهده می‌گردید.

در محیط‌های دارای ۴ میلی گرم بر لیتر ۲ip با غلظت‌های متغیر IAA قطعات کشت شده رشد مناسبی را آشکار ساختند. در این سری از نمونه‌ها رنگ قطعات کشت شده کاملاً سبز بوده و در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IAA بزرگترین حجم توده سبز رنگ بدست آمد. هرچه غلظت اکسین به کاررفته از ۰/۵ میلی گرم بر لیتر بالاتر می‌رفت از حجم قطعات کاسته شده در عوض شاخه‌های نابجا افزایش یافت. همچنین در این غلظت هورمون سیتوکینین بیشترین طول ساقه در این پژوهش مشاهده گردید که

جدول (۴) میزان حجم کالوس و ارتفاع ریزساقه‌ها در دامنه‌های هورمونی مختلف

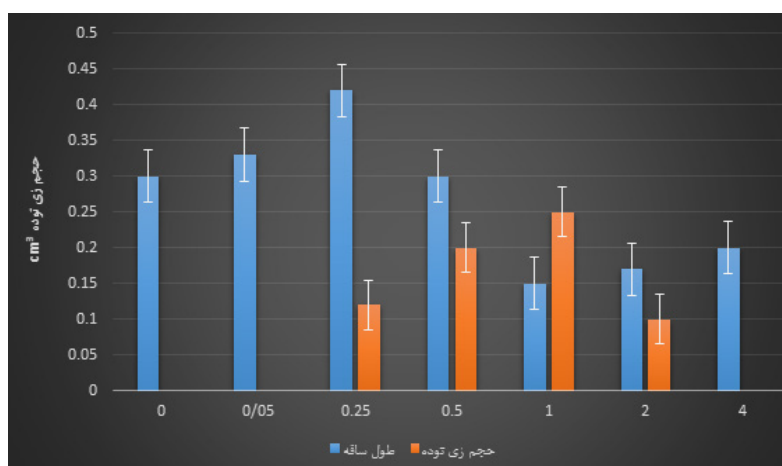
| IAA<br>mg/L | ۲ip ۲mg/L                      |                   | ۲ip ۴mg/L                      |                   | ۲ip ۵mg/L                      |                   |
|-------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------|
|             | حجم زی توده<br>cm <sup>3</sup> | ارتفاع شاخه<br>cm | حجم زی توده<br>cm <sup>3</sup> | ارتفاع شاخه<br>cm | حجم زی توده<br>cm <sup>3</sup> | ارتفاع شاخه<br>cm |
| ۰           | ۰/۳±۰/۰۷۵                      | —                 | ۱/۲۰±۰/۱۱                      | —                 | ۰/۸±۰/۱۸                       | —                 |
| ۰/۰۵        | ۰/۳۲±۰/۰۵                      | —                 | ۱/۳۱±۰/۱۲                      | —                 | ۰/۸±۰/۱۸                       | —                 |
| ۰/۲۵        | ۰/۴۳±۰/۰۶                      | ۰/۱۲±۰/۰۴         | ۱/۷۰±۰/۱۱                      | —                 | ۱/۱۸±۰/۱۷                      | —                 |
| ۰/۵         | ۰/۳۱±۰/۰۴                      | ۰/۲±۰/۰۵          | ۱/۸۰±۰/۱۰                      | ۰/۲۱±۰/۲۷         | ۱/۴۱±۰/۱۸                      | ۰/۲۱±۰/۲۱         |
| ۱           | ۰/۱۵±۰/۰۶                      | ۰/۲۵±۰/۰۴         | ۱/۶۱±۰/۱۱                      | ۱/۶۱±۰/۲۴         | ۱/۶۰±۰/۱۷                      | ۰/۳۱±۰/۲۱         |
| ۲           | ۰/۱۷±۰/۰۶                      | ۰/۱±۰/۰۴          | ۱/۲۰±۰/۱                       | ۱/۰±۰/۲۴          | ۱/۴۰±۰/۱۸                      | ۰/۶±۰/۲۲          |
| ۴           | ۰/۲±۰/۰۴                       | —                 | ۱/۲±۰/۱۱                       | ۱/۰±۰/۲۴          | ۰/۶±۰/۱۷                       | ۱/۲±۰/۲۲          |



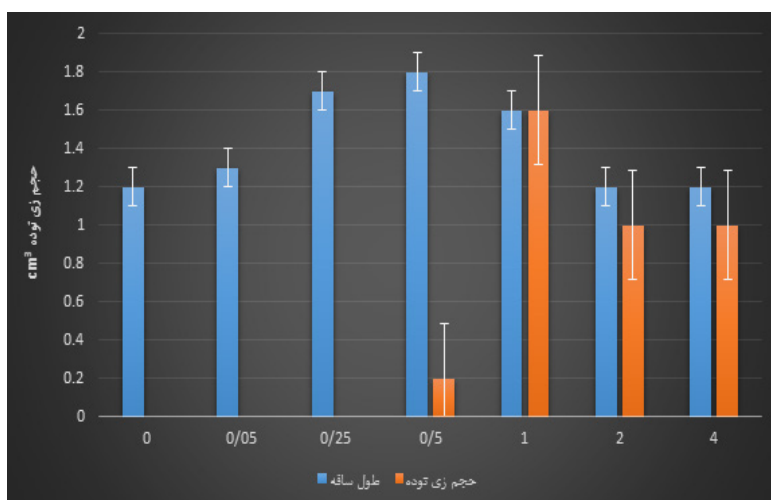
شکل ۱: نمونه کشت شده در غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر ۲ip و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IAA



شکل ۲: نمونه کشت شده در غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر ۲ip و ۱ میلی گرم بر لیتر IAA

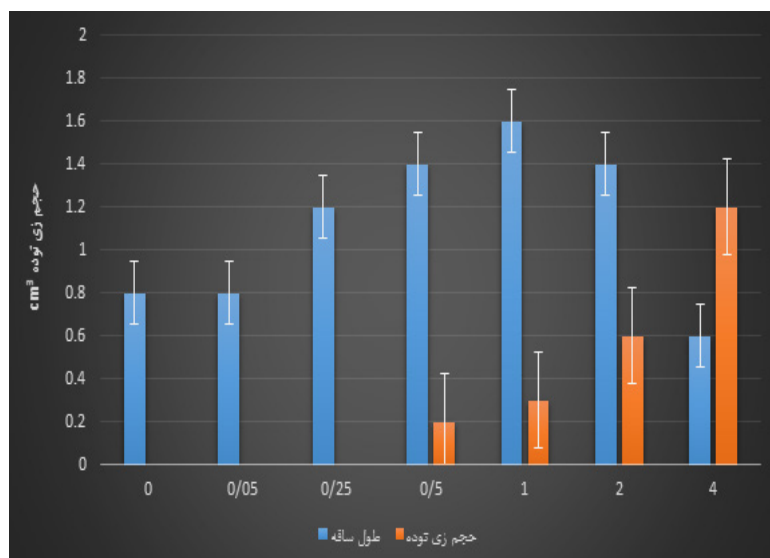


نمودار ۱: مقایسه اثر مقادیر مختلف IAA و میزان ثابت ۲ میلی گرم در لیتر ۲ip بر حجم زی توده و ارتفاع ساقه



نمودار ۲: مقایسه اثر غلظت‌های متغیر IAA و میزان ثابت ۴ میلی گرم در لیتر ۲ip بر حجم زی توده و ارتفاع ساقه





نمودار ۳: مقایسه اثر غلظت‌های متغیر IAA و میزان ثابت ۵ میلی گرم در لیتر ۲ip بر حجم زی توده و ارتفاع ساقه

## بحث

### تفسیر روند کالزایی

جهت بررسی چگونگی تشکیل کالوس همانطور که قبلاً ذکر شد جدا کشتهای مختلف برگری و میانگیره‌ای از گیاهان گل‌دانی به کار رفتند در اولین قدم کشت قطعات روی محیط An با هورمون‌های ۲ip و 2,4-D در غلظت‌های مختلف صورت گرفت که در برخی از محیط‌ها منجر به تشکیل کالوس گردید البته محیط‌هایی که تنها دارای یک نوع هورمون بودند قادر به از سرگیری تقسیمات سلولی نبودند حتی اگر هورمون مذکور ۲ip بود. نتیجه فوق با گزارش Lapichino et al, ۱۹۹۲ که ذکر کرده‌اند کالوس در (Rhododendron P.J.M) تنها با هورمون‌های ۲ip و 2,4-D تشکیل می‌شود همسو است (۱۱). عموماً در تشکیل کالوس یک هورمون به تنهایی قادر به تقسیم سلولی نبوده و حضور هردو هورمون سیتوکینین و اکسین ضروری است. از طرف دیگر چون تشکیل کالوس با تقسیم بالای سلولی صورت می‌گیرد مقادیر بالاتر سیتوکینین به اکسین لازم است.

### ریخت‌زایی و اندام‌زایی کالوس‌ها

در اندام‌زایی یا رویان‌زایی در کالوس در بسیاری از

اسپورهای قارچی در کنار آلودگی‌های باکتریایی از مهمترین عوامل آلودگی در کشتهای سلول و بافت می‌باشد Bhojwan و Razdan برای کنترل این عوامل زمانهای مختلف تأثیرگذاری اتانول و هیپوکلریت سدیم مورد بررسی قرار گرفت (۹). غلظت الکل به لحاظ نفوذپذیری سطوح مختلف بافتها و تأثیرگذاری از عوامل تعیین‌کننده می‌باشد که در این پژوهش از الکل ۷۰٪ استفاده گردید که در زمان تأثیرگذاری ۲۰ ثانیه مناسب تشخیص داده شد. برای مرحله پایانی سترون‌سازی نیز غلظت و زمان هیپوکلریت سدیم مورد پژوهش واقع گردید، به علت نفوذپذیری کم این ماده از چند قطره مایع ظرفشویی نیز در حین سترون‌سازی استفاده گردید، که زمان ۱۵ دقیق مناسب تشخیص داده شد. موفقیت در مراحل سترون‌سازی در کنار غلظت و زمان تأثیرگذاری سترون شده به حساسیت‌های مختلف عوامل آلوده‌کننده قارچی و باکتریایی و میزان بستگی دارد (۹). در محیط‌های کالزایی همواره سطوح مختلف هورمون‌های درون‌زا و برون‌زا از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده در تقسیم سلول می‌باشد (۱۰).



غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر ۲ip و ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر IAA در محیط پایه اندرسون به علت تناسب هورمونی سیتوکینین و اکسین رشد مناسبی در کال سبز مشاهده گردید. هرچه غلظت اکسین بالاتر می‌رفت و نسبت سیتوکینین به اکسین کمتر می‌شد رشد کالوس سبز کمتر شده در عوض طول شاخه‌های تمایز یافته بیشتر می‌گردید البته در بالاتر از ۱ میلی گرم بر لیتر به علت برهم خوردن بیش از حد نسبت اکسین به سیتوکینین رشد زیتوده متوقف می‌گردید. در محیط‌های دارای ۴ میلی گرم بر لیتر ۲ip و غلظت‌های متغیر IAA بیشترین حجم زی‌توده در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر مشاهده گردید. در غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر ۲ip مناسب‌ترین غلظت هورمونی در این سری از آزمایش‌ها مشاهده گردید که هم باعث بیشترین رشد زیتوده و تولید جوانه های نابجا در روی کالوس همراه با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IAA گردید و هم باعث بیشترین رشد طولی ساقه در غلظت ۱ میلی گرم بر لیتر IAA گردید. در اینجا نیز هرچه غلظت IAA افزایش می‌یافت رشد توده سبز کمتر شده و افزایش طول شاخه‌های نابجا تا حد ۱ میلی گرم بر لیتر IAA بیشتر می‌گردید. نتایج فوق با یافته های Eeckhat et al., ۲۰۱۰ همسو می‌باشد (۱۳).

موارد هورمون‌های به‌کاررفته در محیط کشت نقش دارند بطوریکه در برخی از موارد این امر به صورت خودبخودی و یا در حضور مقادیر کم هورمون یا بدون هورمون شروع می‌شود. Bhojwan و Razdan گزارش دادند که به غیر از هورمون‌ها مواد معدنی نیز تأثیر گذارند (۵). مثلاً غلظت بالای نمک که در بسیاری از موارد مانع از رشد می‌شود می‌تواند باعث تحریک در تشکیل و نوپیدی ساقه از کالوس گردد (۱۱). در این پژوهش توده‌های کالوسی به استناد نتایج Briggs و همکاران راجع به ترکیبات محیط اندام‌زایی، به محیط اندرسون دارای هورمون‌های ۲ip (۲ میلی گرم بر لیتر) و IAA (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) انتقال داده شدند (۱۲) که مشاهده گردید توده‌های کالوسی سبز شده و در آنها کانون‌های سبز رنگ متراکمی که بعداً هرکدام به یک مریستم رویشی هوایی تمایز یافتند تشکیل گردید که نتیجه‌ای است از سنتز کلروفیل و شاخه‌زایی که در نتیجه هورمون‌های اکسین و سیتوکینین القاء می‌شود. کال سبز رنگ هنگامی به محیط‌های دارای IAA و ۲ip در غلظت‌های مختلف زیر کشت گردید نتایج مهمی حاصل گشت در محیط‌های با غلظت‌های ۰ و ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر ۲ip کال سبز انتقال‌یافته به علت نبود یا کمبود سیتوکینین و فقدان اکسین تمایز معنی‌داری آشکار نشد. در

### نتیجه گیری:

در این پژوهش امکان تولید و تکثیر گیاه ردودندرون با استفاده از قطعات سرشاخه گیاهان مزرعه ای با روش کشت درون شیشه ای مورد بررسی قرار گرفت و نهایتاً منجر به تولید ریز قلمه های زیادی با استفاده از این روش شد که براحتی سازگار شده و توانستند به گیاهان سالمی در محیط گلخانه تبدیل شوند.

### تشکر و قدردانی

نویسنده از همه کسانی که در اجرای این پروژه یاری رسانده اند سپاسگزار است.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند هیچ تعارض منافی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

## References

- 1- Blessington TM, Garvey EJ, Howell LM. Effects of application methods of controlled-release fertilizers on growth and quality of *Rhododendron obtusum* 'Hinodagiri' grown in various media. 1981, 16(5):676-677.
  - 2- Pierik, RLM, In vitro culture of higher plants. Handbook. Martinus Nijhoff, Dordrecht. 1987
  - 3- Samyn G, De Schepper S, Van Bockstaele E. Adventitious shoot regeneration and appearance of sports in several azalea cultivars. Plant cell, tissue and organ culture. 2002, 70:223-227.
  - 4- Chee R. The history of rhododendron micropropagation provides some tips for success. 1985, 161(10):42-45
  - 5- Eeckhaut T, Janssens K, De Keyser E, De Riek J. Micropropagation of rhododendron. Protocols for in vitro propagation of ornamental plants. 2010:141-52.
  - 6- Blazich FA, Giles CG, Haemmerle CM. Micropropagation of *Rhododendron chapmanii*. Journal of Environmental Horticulture. 1986, 4(1):26-29.
  - 7- Iapichino G, Chen TH, Fuchigami LH. Plant regeneration from somatic tissue of *Rhododendron laetum* x *aurigeranum*. Plant cell, tissue and organ culture. 1991, 27:37-43.
  - 8- Anderson WC. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. Journal of the American Society for Horticultural Science. 1984, 109(3):343-347.
  - 9- Bhojwani SS, Razdan MK. Plant tissue culture: theory and practice. Elsevier; 1986
  - 10- Douglas GC. Propagation of eight cultivars of *Rhododendron* in vitro using agar-solidified and liquid media and direct rooting of shoots in vivo. Scientia Horticulturae. 1984, 24(3-4):337-47.
  - 11- Iapichino G, Chen TH. Genotypic effects on plant regeneration from leaf segments of rhododendron. Advances in Horticultural Science. 1995, 9(4):170-172.
  - 12- Briggs BA, McCulloch SM, Edick LA. Micropropagation of azaleas using thidiazuron. In International Symposium on Vegetative Propagation of Woody Species 227. 1987, 17(3):330-333
- 10.17660/ActaHortic.1988.227.60**
- 13- Eeckhaut T, Van Huylenbroeck J, De Schepper S, Van Labeke MC. Breeding for polyploidy in Belgian azalea (*Rhododendron simsii* hybrids). In XXII International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, Breeding for Beauty 714. 2006, 29(6) : 113-118.
- 10.17660/ActaHortic.2006.714.13**



## Original Article

## Iranian Journal of Biological Sciences

<https://zisti.iauvaramin.ac.ir>


## Comparison of antimicrobial activity of biosynthesized zinc oxide nanoparticles with *Allium jesdianum* extract and chemically synthesized

Paria Alizadeh Ouri<sup>1</sup>, Masoumeh MirNourolahi<sup>2\*</sup>, Ramin Mohammadi Alocheh<sup>2</sup>

1. Msc. Graduated, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Tehran- Center branch, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Tehran- Center branch, Tehran, Iran

Place of Research: Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Tehran- Center branch, Tehran, Iran

## Article Info

## Abstract

## Article History:

Recived 08.26.2024  
Revised 10.31.2024  
Accepted 11.18.2024  
Online 12.30.2024

## KeyWords:

Green Synthesis  
Zinc Oxide Nanoparticles,  
*Allium jesdianum* Extract,  
*Streptococcus Iniae*  
*Aeromonas Hydrophila*

## \*Corresponding author:

E-mail address  
p.alizadeh75@gmail.com  
Masumeh.Mirnurollahi@  
iau.ac.ir  
ramin.p1363@gmail.

**Introduction:** Green and environmentally friendly synthesis methods to produce nanoparticles due to the use of reagents or natural agents such as essential oils or plant extracts and the selection of non-toxic chemicals significantly reduce the risk of harm to humans and the ecosystem as a whole. Therefore, In this research, the aqueous extract of *Allium jesdianum* was used as an abrasive and stabilizing agent for the synthesis of titanium dioxide nanoparticles.

**Aim:** The green synthesis of zinc oxide nanoparticles using the extract of *Allium jesdianum* and its chemical synthesis with the aim of comparing the antibacterial activity of these nanoparticles against Gram-positive *Streptococcus iniae* and Gram-negative *Aeromonas hydrophila*

**Materials and Methods:** The *Allium jesdianum* was collected and confirmed by a botanist. After drying in favorable conditions, the extraction process was carried out. Then, by adding 1 to 5 and 1 to 10 concentrations of leaf extract against 1 mM zinc oxide solution, stable zinc oxide nanoparticles were formed. After the chemical synthesis of nanoparticles, analysis and investigation of biosynthesized nanoparticles by chemical and green synthesizes, to determine the size, morphology and optical properties, structural characteristics with UV-vis devices, X-ray diffraction (XRD), microscope Transmission electron microscopy (TEM), field emission scanning electron microscopy (FESEM), FTIR and Edax were performed. Then, the antibacterial activity of the synthesized nanoparticles and also the plant extract were investigated using disk diffusion, welling and MIC.

**Results:** The production of zinc oxide nanoparticles in different solutions containing the extract of *Allium jesdianum* was investigated by recording the color change during the experiment using a spectrophotometer (Vis-Uv) in the range of 700-300 nm. The size and morphology of nanoparticles was determined by TEM, that the shape of the particles is spherical and their size is 115-45 nm. It was also found that biosynthesized zinc oxide nanoparticles had antibacterial activity against Gram-positive *Streptococcus iniae* and Gram-negative *Aeromonas hydrophila*.

**Conclusion:** The results obtained from the extract alone showed that this plant can have favorable antimicrobial effects, especially on *Streptococcus Iniae*. In comparison of green-synthesized nanoparticles with chemically-synthesized ones, it was found that although chemical nanoparticles had a better effect, the difference in effect was very small, and since the synthesis of green nanoparticles has better environmental effects and certainly has fewer side effects, it can be said that plant-based nanoparticles can be a good substitute for chemical nanoparticles. It is also a candidate to replace antibiotic therapy in the fish farming industry.

**Cite this article:** Alizadeh Ouri, P., Mirnourolahi, M., Mohammadi Alocheh, R. Comparison of antimicrobial activity of biosynthesized zinc oxide nanoparticles with *Allium jesdianum* extract and chemically synthesized Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(4):11-29

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



مقاله تحقیقی

دانش زیستی ایران

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

## مقایسه فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی بیوسنتز شده با عصاره گیاه بن سرخ و سنتز شده شیمیایی

پریا عزیزاده عوری<sup>۱</sup>، سیده معصومه میرنوراللهی<sup>۲</sup>، رامین محمدی آلوچه<sup>۲</sup>

۱. فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، ایران

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

**مقدمه:** روش های سنتز سبز و سازگار با محیط زیست برای تولید نانوذرات به دلیل استفاده از واکنشگرها یا عوامل طبیعی نظیر اسانس یا عصاره گیاهان و انتخاب مواد شیمیایی غیرسمی، ریسک خطرپذیری برای انسان، هوا و در مجموع اکوسیستم را به طور قابل توجهی کاهش می دهند.

**هدف:** لذا در این پژوهش، عصاره آبی گیاه بن سرخ به عنوان عامل کاهنده و پایدار کننده جهت سنتز نانوذرات اکسید روی مورد استفاده قرار گرفت. سنتز سبز نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره گیاه بن سرخ و نیز سنتز شیمیایی آن با هدف مقایسه فعالیت ضد باکتریایی این نانوذرات بر علیه باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیه و گرم منفی آئروموناس هیدروفیلا می باشد.

**مواد و روش ها:** ابتدا گیاه بن سرخ جمع آوری شد و توسط متخصص گیاه شناسی تایید گردید. پس از خشک شدن در شرایط مطلوب، فرآیند عصاره گیری صورت پذیرفت. سپس با اضافه کردن غلظت 1 به 5 و 1 به 10 عصاره برگ در برابر محلول اکسید روی ۱ میلی مولار، نانوذرات پایدار اکسید روی تشکیل گردید. پس از سنتز شیمیایی نانوذرات، آنالیز و بررسی نانوذرات بیوسنتز شده با روش شیمیایی و گیاهی، جهت تعیین سایز، مورفولوژی و ریخت شناسی، خاصیت اپتیکی، ویژگی های ساختاری به ترتیب با دستگاه های UV-vis، پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (FESEM)، FTIR، Edax و انجام شد. سپس فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات سنتز شده و نیز عصاره گیاهی با استفاده از روش انتشار در دیسک، چاهک گذاری و MIC مورد بررسی قرار گرفتند.

**نتایج:** تولید نانوذرات اکسید روی در محلول های مختلف حاوی عصاره گیاه بن سرخ با ثبت تغییر رنگ در طول آزمایش با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Vis-Uv) در محدوده 300-700 نانومتر بررسی شد. اندازه و مورفولوژی نانوذرات توسط TEM مشخص گردید که شکل ذرات کروی و اندازه آنها 45-115 نانومتر است. همچنین مشخص گردید که نانوذرات اکسید روی بیوسنتز شده دارای فعالیت ضد باکتریایی بر علیه باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیه و گرم منفی آئروموناس هیدروفیلا بودند.

**نتیجه گیری:** نتایج حاصل از عصاره به تنهایی نشان داد که این گیاه تأثیرات مطلوب ضد میکروبی خصوصاً بروی باکتری استرپتوکوکوس اینیه میتواند داشته باشد. در مقایسه نانوذرات سنتز شده گیاهی با سنتز شده ی شیمیایی مشخص شد که نانوذرات شیمیایی اگر چه تأثیر بهتری دادند اما تفاوت اثر بسیار ناچیز بوده و از آنجا که سنتز سبز نانوذرات تأثیرات زیست محیطی بهتری داشته و مسلماً عوارض کمتری دارد، میتوان گفت که نانوذرات گیاهی میتوانند جایگزین مطلوبی برای نانوذرات شیمیایی باشند. همچنین کاندیدی برای جایگزینی آنتی بیوتیک درمانی در صنعت پرورش ماهی باشد.

### تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۳/۰۶/۰۵

بازنگری ۱۴۰۳/۰۸/۱۰

پذیرش ۱۴۰۳/۰۸/۲۸

نهایی ۱۴۰۳/۱۰/۱۰

### کلمات کلیدی

سنتز سبز،  
نانوذرات اکسید روی،  
عصاره برگ گیاه بن سرخ،  
استرپتوکوکوس اینیه،  
آئروموناس هیدروفیلا

### \* نویسنده مسئول

p.alizadeh75@gmail.

com

Masumeh.Mirnurollahi@

iau.ac.ir

ramin.p1363@gmail.

شیوه آدرس دهی این مقاله: عزیزاده عوری، پ.، میرنوراللهی، م.، محمدی آلوچه، ر.، مقایسه فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی بیوسنتز شده با عصاره

گیاه بن سرخ و سنتز شده شیمیایی. مجله دانش زیستی ایران. ۱۸: ۱۴۰۲: ۱۱-۲۹

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا | چاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ | چاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹۶ | نویسندگان: © حق مؤلف

## مقدمه:

باکتری های عامل عفونت به صورت معمول با آنتی بیوتیک ها حذف یا درمان می شوند (۱). آنتی بیوتیک ها مواد ضد میکروبی هستند که باکتری ها را از راه های مختلف مانند تاثیر بر دیواره، تداخل در عملکرد آنزیم ها، تاثیر بر پروتئین ها و یا تاثیر بر DNA و RNA از رشد و یا تکثیر باکتری ها ممانعت میکنند (۲). مطالعات جدید نشان میدهد که امروزه باکتری ها به تاپ های مختلف آنتی بیوتیک ها مقاوم شده اند، در نتیجه کارایی این عوامل امروزه به شکل روز افزونی در حال محدود شدن است (۳). به ویژه که باکتری ها امروزه به شکل مهندسی شده ای مسیر های گوناگونی را برای مقابله با آنتی بیوتیک ها از تغییر هدف آنتی بیوتیک ها با بیان ژن ها موتاسیون پیدا کرده تا تولید آنزیم هایی جهت حذف یا تغییر شکل آنزیم و یا گسترش کلی از لایه های مقاوم در اطراف باکتری مانند بیوفیلم که توانایی دسترسی آنتی بیوتیک به باکتری را محدود کند، طراحی کرده اند. یکی از علت های این شیوع روز افزون، افزایش مصرف بی رویه و بدون نظارت آنتی بیوتیک ها است (۴،۵).

این افزایش روز افزون مقاومت آنتی بیوتیکی تمایل به استفاده از مواد جایگزین که خاصیت ضد میکروبی داشته باشند و کمترین مقاومت را بروز دهند را به شکل چشمگیری افزایش داده است. یکی از این مواد که به شکل سنتی از روزی که بشر به گسترش بهداشت و سلامت پنداشته از آن استفاده کرده است، استفاده از گیاهان یا ترکیبات آنها که خاصیت ضد میکروبی داشتند بود. گیاهان در سراسر دنیا به شکل سنتی در بسیاری از موارد خصوصا بیماری های عفونی مورد توجه بوده اند (۶،۷). گیاهان دارویی بخاطر مواد موثره موجود در ترکیبات آنها گزینه های موثر و مفیدی برای استفاده به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک ها در مطالعات مختلف مورد بررسی واقع شده اند (۸-۶). اگر چه اکثر مطالعات نشان می دهد که گیاهان دارویی خواص آنتی بیوتیکی خوبی دارند ولی هنوز در مقایسه با تاثیر وسیع و عمیق آنتی بیوتیک ها از پتانسیل کمتری برخوردارند (۹). از همین رو پدید آمدن علم نو پدید نانو تکنولوژی دریچه های امیدی را به روی محققان باز کرد که بتوان از خواص ضد میکروبی آن جهت حذف میکروب های بیماری زا یا در صنعت جهت افزایش ماندگاری مواد غذایی استفاده کرد و شاید بتوان جایگزین مطلوب تری جهت جایگزینی آنتی بیوتیک ها باشد. نانوذرات

به خصوص نانوذرات فلزی و اکسید آنها مانند روی، اکسید روی، تیتانیوم، اکسید تیتانیوم، منیزیم، اکسید منیزیم و... به علت پایداری، و مقاومت و ماندگاری طولانی و عوارض جانبی معدود به عنوان عوامل ضد میکروبی بالقوه مورد استفاده قرار می گیرند (۱۱،۱۰). از گذشته از فلزات و اکسید های فلزی جهت از بین بردن میکروارگانیسم ها استفاده می کردند. فلزات اثرات ضد میکروبی خود را با تاثیر بر روی روند رشد سلول ها و تاثیر مستقیم بر دیواره آن ها اعمال می کنند. یکی از مکانیسم های ضد میکروبی اکسید های فلزی آزاد سازی یون های فلزی است که با جذب توسط ارگانیسم و تاثیر مستقیم بر آنزیم ها و یا اسید نوکلئوتیک باعث تخریب و یا مهار عملکرد طبیعی سلول باکتری می شوند. مکانیسم دیگری که اکسید های فلزی موجب حذف میکروارگانیسم ها میشوند تولید رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) است که با اثر بر دیواره تعادل الکترواستاتیکی باکتری را بر هم زده و یا با اثر بر اسید نوکلئوتیک باکتری موجب مهار باکتری می شود (۱۱). نانوذرات موادی با ابعاد ۱-۱۰۰ نانومتر هستند که امروزه نه تنها در صنعت بلکه در پزشکی نیز کاربرد های وسیعی دارند. بعد از پی بردن به توانایی سنتز سبز نانومواد با استفاده از عصاره گیاهان، سنتز شیمیایی نانومواد به علت عدم زیست سازگاری و یا تاثیرات جانبی جذابیت کمتری پیدا کرد (۱۳،۱۲). در این بین اکسید روی یکی از نانوذرات فلزی است که در صنعت کاربرد فراوانی دارد همچنین مطالعات اخیر نشان می دهد که این نانوذره می تواند در علوم پزشکی خصوصا در جلوگیری از گسترش عفونت ها نقش موثری داشته باشد. علاوه بر این مطالعات صورت گرفته بر روی نانوذرات سنتز شده به شکل سبز نتایج ارزشمندی را بر روی باکتری های بیماری زا گرم منفی و گرم مثبت نشان داد که توجه محققان را به خود بیشتر از قبل جلب کرد. در سنتز سبز گیاهان به عنوان عوامل کاهنده، تثبیت کننده و پوشاننده عمل می کنند (۱۵،۱۴). هم چنین گیاهان به علت فراوانی و عدم نیاز به شرایط و مواد غذایی خاص برای رشد، گزینه ای مناسب برای تولید نانوذرات به روش زیستی محسوب می شوند. کاردا و همکارانش اولین بار در سال ۲۰۰۲، نانوذرات طلا را از عصاره گیاه یونجه در محیط غنی از سنتز کردند. تاکنون تولید زیستی نانوذرات نقره به وسیله گیاهان مانند *Piper. Acalypha*، *Azadirachta indica* و *Longum*

بیانگر گسترش بیماری در مزارع قزل آلای کشور بوده و تاکنون موجب خسارات زیادی بر این صنعت شده است (۱۹). باکتری دیگر که در صنعت آبی پروری و پرورش ماهی اهمیت ویژه ای دارد باکتری آئروموناس هیدروفیلا است. طبق گزارش های موجود، این باکتری در انواع ماهیان مانند کپور، مارماهی، گربه ماهی، میگو، لابستر، تیلاپیا و قزل آلای رنگین کمان و ماهیان خاویاری باعث ظهور علائم بیماری زایی و تلفات می شود. از علائم آلوده شدن آبی به این باکتری ایجاد سپتی سمی هموراژیک، زخم خونریزی و بیرون زدگی چشم ها است که نهایتاً منجر به مرگ آبی می شود (۲۰). همچنین علاوه بر زیان های اقتصادی گسترش بیماری های زئونوز نیز یکی از نگرانی های پژوهشگران این عرصه است که به شکل روز افزون رو به افزایش است. همچنین می دانیم که استفاده از آنتی بیوتیک در صنعت دام پروری و پرورش ماهی به علت افزایش شیوع و گسترش مقاومت دارویی این نگرانی ها را دو چندان کرده است که محققان را برانگیخته در پی یافتن مواد جایگزین دارویی به جای آنتی بیوتیک ها باشند که هم توان کنترل عفونت را داشته باشد هم صنعت را از زیان های وارده حفظ کند و هم ایجاد مقاومت دارویی ننماید (۲۱). با توجه به کاربرد گسترده نانوذرات اکسید روی در علوم و صنایع مختلف و اهمیت سنتز زیستی نانو ذرات و همچنین رویش گیاه بن سرخ در این مطالعه سنتز زیستی نانوذرات اکسید روی با استفاده از عصاره این گیاه و فعالیت ضدباکتریایی آن بر روی باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیه (*Streptococcus iniae*) و گرم منفی آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) مورد بررسی قرار گرفت.

Catharanthus Roseus, Ocimum Sanctum گیاهان انجام گرفته است (۱۶). گیاه بن سرخ یا مریم نخودی با نام علمی Allium jesdianum متعلق به خانواده سوسنیان (Liliaceae)، سالیان قبل به عنوان یک گیاه دارویی شناخته شده و کاربردهای بسیاری از آن کشف شده، به طوری که مصرف دارویی آن را به زمان بقراط و جالینوس تخمین می زنند و به عنوان معرق، مقوی، ضد درد، ضد تب و بی اشتهايي مورد استفاده قرار میگرفت اما امروزه با پیشرفت علم دیگر خواص آن از جمله ضد اسپاسم، ضد التهاب، ضد فشار خون، کاهش قند، ضد سرطانی، ضد میکروبی و ضد اکسایشی آن آشکار گردید (۱۷).

بررسی های فیتوشیمیایی صورت گرفته بر روی گیاه بن سرخه منجر به استخراج و شناسایی ترکیبات مختلفی همچون آلفا پینن، بتا پینن، ساینن، لیمونن، بتا کاریوفیلن، بی سایکلوجرماکرن، جرماکرن دی و ترکیبات متعدد دیگری شده است که خواص ضد باکتری آن را توجه می کند و همچنین می تواند گزینه مناسبی برای تولید نانوذرات در نظر گرفته شود (۱۸). ماهی ها به علت قرار گرفتن در رده های پایین تکاملی نسبت به سایر مهره داران دارای سیستم ایمنی ابتدایی تری نسبت به حیوانات خونگرم است. در ماهی ها سیستم ایمنی اختصاصی تکامل کمی یافته و سیستم ایمنی غیر اختصاصی بسیاری از وظایف آن را به عهده دارد یکی از مهمترین بیماری های عفونی شایع در اکثر مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان در سال های اخیر در کشور های دنیا درگیری با استرپتوکوکوزیس به علت باکتری استرپتوکوکوس اینیه بوده است. مطالعات زیادی در خصوص بیماری زایی، شناسایی و جداسازی بیماری از مزارع تکثیر و پرورش قزل آلا کشور صورت گرفته است که

## مواد و روش ها

### تهیه عصاره

گیاه بن سرخ از ارتفاعات کوه های کردستان ایران جمع آوری و بعد از تعیین جنس و گونه آن، توسط کارشناس گیاه شناسی تایید شد. عصاره به روش خیساندن به دست آمد. به این صورت که برای تهیه عصاره ی متانولی ۱۰۰ میلی گرم از پودر را با ۴۰۰ میلی لیتر از متانول ۸۰ درصد

مخلوط گردید، بعد از ۴ روز در دمای اتاق و هم زدن در بعضی از مواقع، با کاغذ واتمن شماره یک صاف شده و برای تبخیر متانول در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرارداده شد. سپس عصاره ی خشک با DMSO ۱۰ درصد به مقدار یک گرم عصاره با ۴ میلی لیتر از حلال حل شد (۲۱، ۲۲).



به مدت ۲۴ ساعت به صورت هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. نهایتاً برای استفاده به غلظت نیم مک فارلند ( $10^6$  CFU/mL) رسید که این امر به وسیله استفاده از دستگاه کدورت سنجی در ۶۳۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (china, MB580) تنظیم شد.

بررسی حداقل غلظت بازدارندگی عصاره گیاه با روش رقت در لوله

کمترین غلظت یک عامل ضد میکروبی که می تواند رشد میکروبی را پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مهار کند، به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) شناخته می شود. به منظور ارزیابی کارایی عصاره و بدست آوردن MIC، ۱۰ گرم از عصاره بن سرخه با ۹٫۵ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون برات و ۰٫۵ میلی لیتر دیمتیل سولفواکسید (DMSO) مخلوط شده و غلظت ۱ گرم بر میلی لیتر ساخته شد. از این غلظت برای تکنیک MIC استفاده شد، به این صورت که به ۱۱ لوله استریل مقدار ۱ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون برات و ۱۰۰ از کشت تازه باکتریایی با غلظت  $10^6$  CFU/ml \* ۱/۵ اضافه شد. سپس ۱ میلی لیتر از استوک اولیه ساخته شده عصاره با رقت ۱۰۰۰ mg/ml را به لوله اول افزوده و رقت های سریالی ۱۰۲۴، ۵۱۲، ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴ تهیه گردید. دو لوله حاوی کنترل مثبت و منفی نیز تهیه گردید. نهایتاً لوله ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. این روش برای هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد.

بررسی حداقل غلظت کشندگی عصاره گیاه

به طور خلاصه، ۱ میلی لیتر از لوله MIC و دو رقت قبل از آن در پلیت های نوترینت آگار تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. عدم تشکیل کلونی در پلیت ها نشان دهنده MBC بود (۲۴).

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذره سنتز شده گیاهی و شیمیایی به روش رقت در لوله

به منظور ارزیابی کارایی نانوذره و بدست آوردن MIC، در لوله های آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر محیط کشت

سنتز سبز نانوذره اکسید روی

عصاره گیاه مورد نظر با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و روی مخلوط کن قرارداده شد. سپس نیترات روی به مقدار ۷٫۳۱ گرم به محلول اضافه شد و سپس با استفاده از هیدروکسید سدیم pH محلول به ۱۰ رسانیده شد. محلول توسط مایکروویو به مدت ۱۰ دقیقه پرتو دهی شد. سوسپانسیون تهیه شده به مدت ۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. نانوذرات تهیه شده، با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد در آون خشک و در مرحله آخر جهت آنالیزهای فیزیکی و شیمیایی و خواص ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت (۲۳). جهت مشاهده تغییرات رنگ بر روی میزان جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Vis-Uv) در محدوده ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر بررسی شد.

سنتز شیمیایی نانوذره اکسید روی

پیش ماده رسوب های اکسید روی به دست آمده از رسوب مستقیم توسط واکنش نیترات روی و کربنات آمونیوم در محلول آبی سنتز گردید.

تعیین اندازه و مورفولوژی نانو ذرات

نانوذرات اکسید روی سنتز شده از عصاره گیاه بن سرخه جهت تعیین اندازه، خواص ساختاری، خواص اپتیکی، مورفولوژی و ریخت شناسی با دستگاه های UV-vis، پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (FESEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، FTIR و Edax (مورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند.

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی

فعالیت ضد باکتریایی نانوذرات اکسید روی سنتز شده بر علیه دو گونه استاندارد مهم بیماری زای انسانی شامل *hydrophila Aeromonas* (RTCC\۱۸۹۰) و *PTCC\۱۸۸۷* *Streptococcus iniae* که از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی تهیه شده بود مورد ارزیابی قرار گرفت.

آماده سازی باکتری ها

هر سویه خالص باکتری در محیط کشت (TSB) کشت و



درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. قطر ناحیه مهار رشد باکتری بر حسب میلی متر اندازه گیری و ثبت شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد. از دیسک آنتی بیوتیک استاندارد سپیروفلوکساسین به عنوان کنترل استفاده شد و پس از زمان گرماگذاری، هاله عدم رشد بررسی و قطر هاله با کولیس اندازه گیری گردید (۲۵).

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات به روش انتشار در دیسک تهیه سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی استریل از کشت ۲۴ ساعته انجام شد که حاوی  $10^8$  CFU/ml  $\times 1.5$  باکتری در هر میلی لیتر معادل ۰.۵ مک فارلند بود. سپس از نانوذره سنتز شده در سه رقت ۲۰، ۴۰، ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد و به هر دیسک به مقدار ۲۰ میکرولیتر اضافه گردید و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد خشک شد. درون پلیت های استریل، به مقدار کافی محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته شد و پس از سفت شدن، مقدار میلی لیتر ۱ از سوسپانسیون میکروبی کشت یک شبه به آن اضافه شد. سپس دیسک های تهیه شده در فاصله های مناسب روی پلیت قرار داده شد و پلیت ها برای مدت زمان ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. از دیسک آنتی بیوتیک استاندارد سپیروفلوکساسین به عنوان کنترل استفاده شد و پس از زمان گرماگذاری، هاله عدم رشد بررسی و قطر هاله با کولیس اندازه گیری گردید (۲۶).

مولر هینتون براث، سری رقت های ۱۰۲۴، ۵۱۲، ۲۵۶، ۱۲۸، ۶۴، ۳۲، ۱۶، ۸، ۴ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوذرات تهیه شده به روش شیمیایی و گیاهی بطور جداگانه آماده شد. سپس به هر لوله ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده تلقیح گردید. لوله آزمایشی حاوی محیط کشت و باکتری تلقیح شده و بدون نانوذره به عنوان شاهد مثبت و یک لوله حاوی محیط کشت و نانوذره ولی بدون باکتری به عنوان کنترل منفی نیز تهیه شد. نهایتاً لوله ها در ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، هر لوله از نظر کدورت حاصل از رشد میکروارگانیسم بررسی و کمترین رقتی که در آن به علت اثر مهار کنندگی نانوذره، کدورتی ایجاد نشده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد. ۲۵ این تست برای هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار شد.

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات به روش انتشار در چاهک غلظت های مختلف ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از اکسید روی سنتز شده به روش سبز، آماده گردید. از سوسپانسیون باکتریایی استاندارد کدورت معادل نیم مک فارلند در سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید. هر دو باکتری مورد آزمایش به روش کشت یکنواخت بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. سپس چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر در محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه شد و ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت نانوذره به صورت جداگانه در هر چاهک ریخته شد و برای هر باکتری جداگانه بررسی گردید. پلیت ها به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و سپس در دمای ۳۷

## نتایج

اندازه گیری جذب نانوذرات سنتز شده شیمیایی و گیاهی با استفاده UV

گپ نانوذرات طبق فرمول داده ها توسط نرم افزار Origin pro انجام و عدد ۰.۹ الکترون ولت برای نانوذره شیمیایی را نشان می دهد از مقدار باند گپ می توان به این نتیجه رسید که بیشتر ذرات دارای اندازه ای از مرتبه ی نانو هستند. در رابطه با نانوذری سنتز شده به وسیله ی عصاره گیاهی حداکثر طول موج جذبی ۳۵۴ نانومتر بود (شکل ۳). همچنین مطابق شکل ۴ مقدار

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود با استفاده از طیف سنجی UV-VIS دو قله جذبی برای نانوذره اکسید روی به دست آمده است. حداکثر طول موج جذبی در ۳۷۵ نانومتر بدست آمده است همچنین محاسبه ی باند

به منظور بررسی اندازه و مورفولوژی نانوذرات سنتز شده تصاویر TEM تهیه شد. ذرات به وضوح در شکل ۸ قابل مشاهده اند. نتایج حاصل نشان داد که نانوذرات تولیدی اندازه ای زیر ۱۰۰ نانومتر دارند.

#### EDAX

همچنین نتایج حاصل از Edax در شکل ۹ نشان داده شده است. همانطور که در تصویر مشاهده می شود پیک های حاصل نشان دهنده حضور سیلیسیوم، اکسیژن و روی در نانوذره ی سنتز شده با عصاره گیاهی است که عنصر سیلیسیوم در نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی دیده نمی شود. حضور عناصر درگیر می تواند تفاوت در اثر ثانویه ی نانوذره داشته باشد. نتایج در واقع بیانگر ساخته شدن نانو ذره به هر دو روش شیمیایی و سنتز شده با عصاره گیاهی است.

میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (FESEM) همانگونه که در تصویر ۱۰ و ۱۱ مشاهده می شود نانوذرات سنتز شده دارای اندازه های متفاوت بودند اما مقایسه اندازه های نانوذرات سنتز شده ی شیمیایی و گیاهی نشان دهنده ی آن است که نانوذرات شیمیایی در اندازه های مختلف در مقایسه با نانوذرات گیاهی دارای ابعاد کوچکتری نسبت به نانوذرات سنتز شده ی گیاهی هستند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاه بن سرخ بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره بن سرخ نشان داد، عصاره اثر مهارکنندگی قابل توجه ای بر روی هر دو باکتری دارد جدول ۱ نتایج مربوط به MIC عصاره گیاه بن سرخ بر ضد باکتری های مورد بررسی به روش رقت در لوله را نشان می دهد. بیشترین حساسیت مربوط به استرپتوکوکوس اینیائ (MIC ۲۶,۶۶) و کمترین حساسیت به عصاره گیاه بن سرخ مربوط به آئروموناس هیدروفیلا (MIC ۱۳,۳۳) می باشد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی سنتز شده شیمیایی و گیاهی

در جدول ۲ نتایج MIC و MBC برای دو باکتری استرپتوکوک اینیائ و آئروموناس هیدروفیلا به شکل مقایسه ای برای دو نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی و سنتز شده ی گیاهی نشان داده شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که آئروموناس هیدروفیلا نسبت به استرپتوکوکوس اینیائ حساسیت کمتری به نانوذره سنتز شده ی شیمیایی و گیاهی دارد. همچنین مقایسه دو نانوذره باهم، نتایج بیان کننده ی تاثیر بهتر نانوذره ی شیمیایی

باند گپ برای نانوذره ی سنتز شده به وسیله ی عصاره گیاهی مقدار ۳,۱۴ الکترون ولت را نشان میدهد. از مقدار باند گپ میتوان به این نتیجه رسید که بیشتر ذرات دارای اندازه ای از مرتبه ی نانو هستند. همچنین باند گپ بدست آمده وسیله ی نرم افزار گویای این امر است که نانوذره ی اکسید روی سنتز شده ی شیمیایی ابعاد کوچک تری نسبت به سنتز شده به وسیله ی عصاره ی گیاهی دارند.

نهایتا بعد از وارد کردن داده ها در شیت های نرم افزار با استفاده از فرمولاسیون تعریف شده پلات خروجی جذبی را به عنوان نمودار X و نمودار Y را به عنوان طیف باند گپ در نظر گرفته و نهایتا از تقسیم intercept بر slope باند گپ ما بدست می آید. این باند گپ هرچقدر کمتر باشد نانوذرات ابعاد بزرگ تر و هر چقدر بیشتر باشد نانوذرات ابعاد کوچکتری دارند.

#### XRD

مطالعات XRD در زاویه ۲ تا از ۲۰ درجه تا ۸۰ درجه نشان داده شده است که در زاویه ۳۱/۸۳ درجه شاخص میلر ۱۰۰، زاویه ۳۴/۵۹ درجه شاخص میلر ۰۰۲ درجه و در زاویه ۳۶/۵۰ درجه شاخص میلر ۱۰۱ درجه و در زاویه ۴۷/۵۶ درجه شاخص میلر ۲۵۰ در زاویه ی ۶۲/۷۵ شاخص میلر ۱۱۲ بود (شکل ۵).

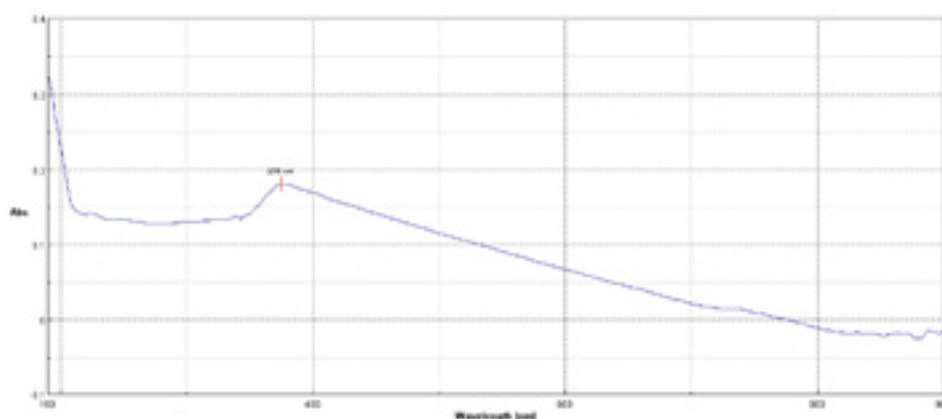
FTIR مربوط به نانوذره ی سنتز شده گیاهی و شیمیایی اندازه نانوذره ۳۵۳۶ نانومتر و عصاره ۳۴۶۷ نانومتر بود. که این باند مربوط به گروه ترکیبات فلزی است. طول موج ۱۶۳۹ نانومتر در نانو ذره و ۱۶۴۶ نانومتر در نانوذره ی سنتز شده با عصاره مربوط به باند CH - است. طول موج ۱۷۳۵ نانومتر برای نانوذره مربوط به کربن دوباند کربونیل cso است. طول موج ۱۴۰۳ نانومتر برای نانو ذره و ۱۵۱۱ نانومتر برای نانوذره ی سنتز شده با عصاره مربوط به ترکیبات NH (نیتروژن - هیدروژن) است. طول موج ۱۱۷۲ برای نانو ذره و ۱۱۸۷ برای نانوذره ی سنتز شده با عصاره مربوط به C-O است. طول موج ۶۵۹ نانومتر مربوط به اکسید روی و ۶۶۷ مربوط به اکسید روی سنتز شده با عصاره است همچنین ۱۱۷۲ مربوط به نانو ذره و ۱۱۸۷ نانومتر برای نانوذره ی سنتز شده با عصاره، مربوط به کربن - نیتروژن در گروه های آمین آلیفاتیک است (شکل ۶ و ۷).

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

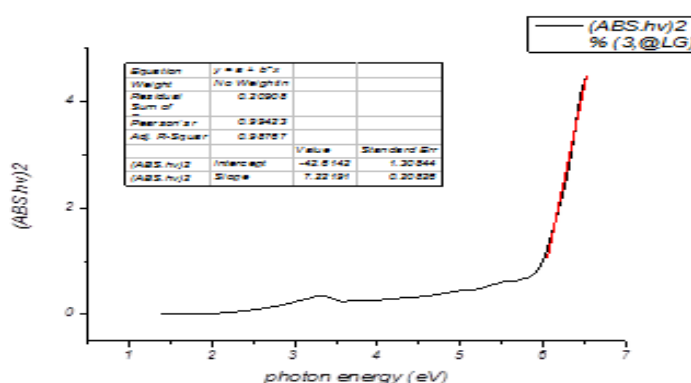
نتایج حاصل از قطر هاله عدم رشد در هر دو تست نشان می دهد اثرات مهارکنندگی رشد نانوذره ی اکسید روی بر باکتری آنروموناس هیدروفیلا نسبت به باکتری استرپتوکوکوس اینیائسه مورد آزمایش کمتر بوده است. نتایج تست انتشار از چاهک در جدول ۳ و نتایج انتشار از دیسک در جدول ۴ آورده شده است .

نسبت به نانوذره ی گیاهی بود و نشان می دهد که نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی در کل، تاثیر مطلوب تری بر روی باکتری ها داشته و .همچنین هر دو نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی و گیاهی تاثیر بهتری بر روی استرپتوکوکوس اینیبه داشته اند .

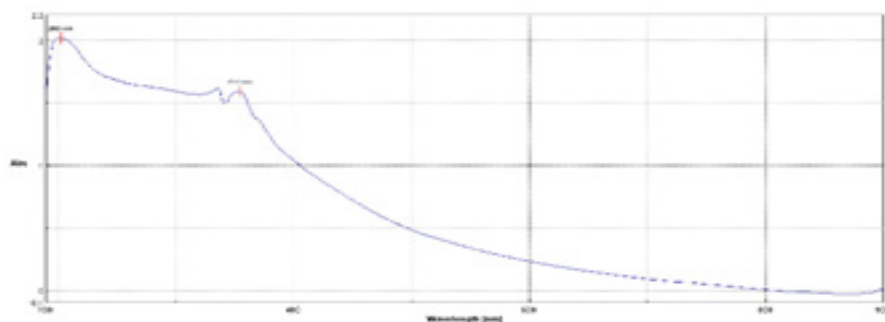
از چاهک گذاری و انتشار از دیسک برای نانوذره اکسید روی



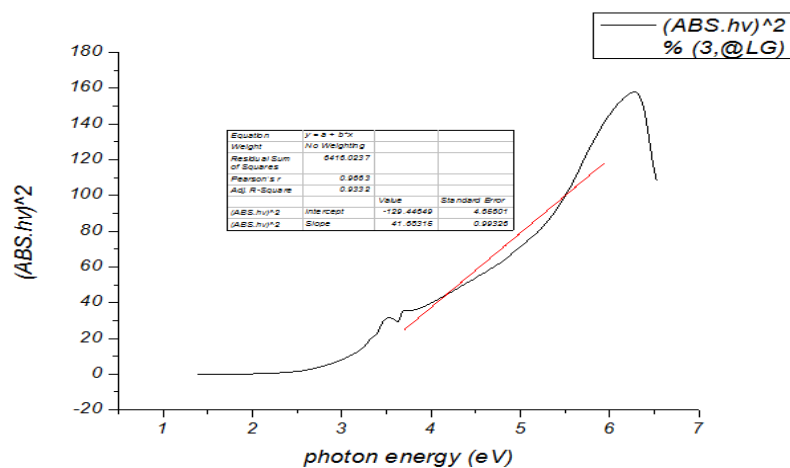
شکل ۱: اندازه گیری جذب نانوذرات اکسید روی سنتز شده شیمیایی با استفاده از UV



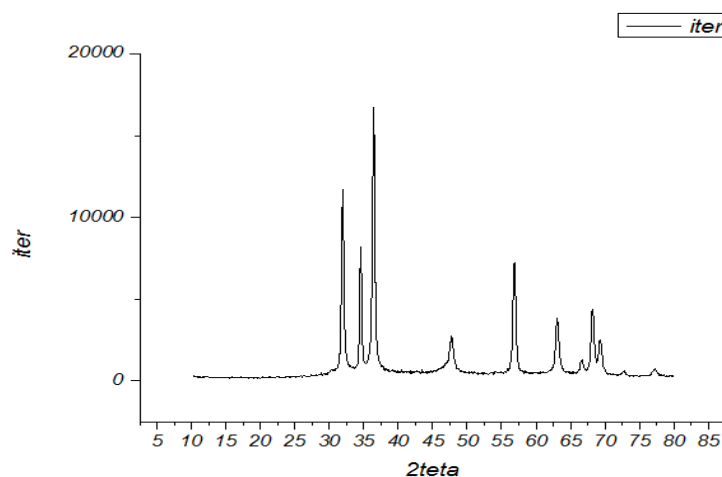
شکل ۲: محاسبه باند گپ با نرم افزار origin pro برای نانوذره ی شیمیایی



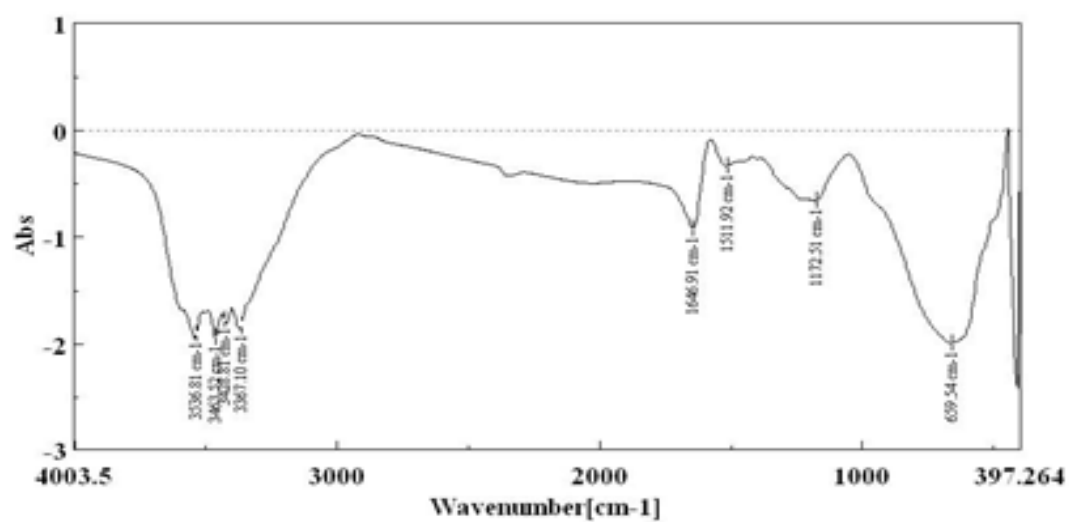
شکل ۳: اندازه گیری جذب نانوذرات اکسید روی سنتز شده گیاهی با استفاده UV



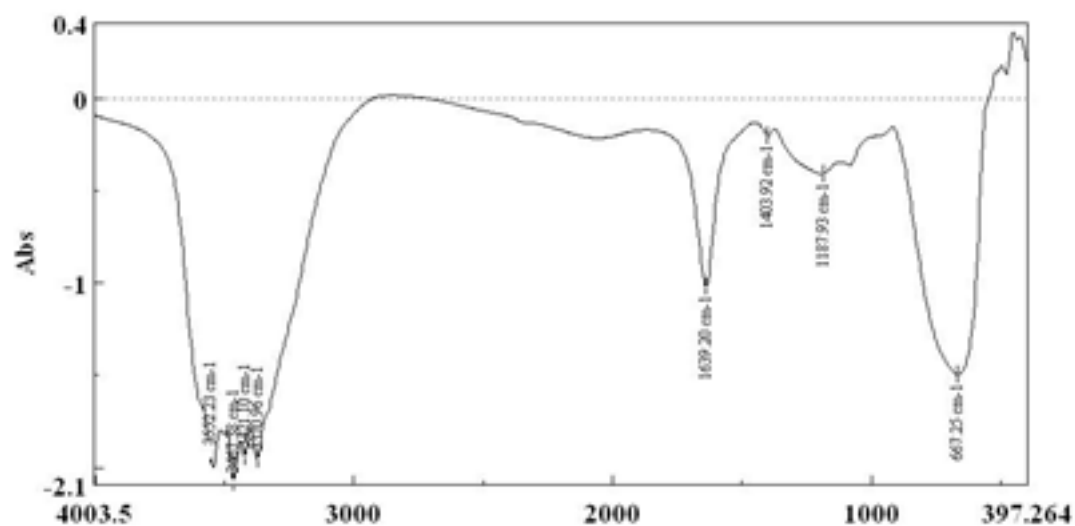
شکل ۴: محاسبه باند گپ با نرم افزار origin pro برای نانوذره ی گیاهی



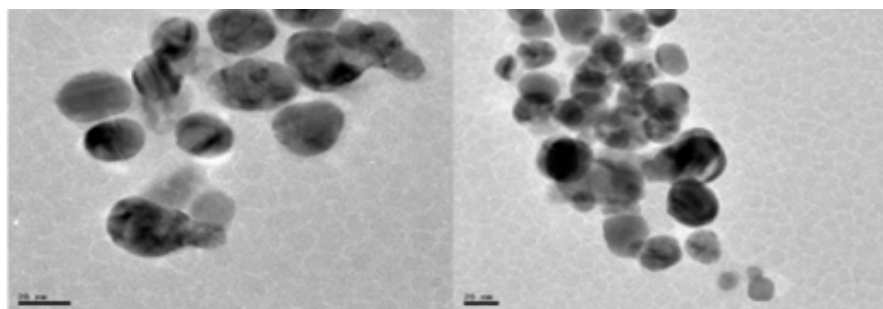
شکل ۵: نتایج حاصل از XRD



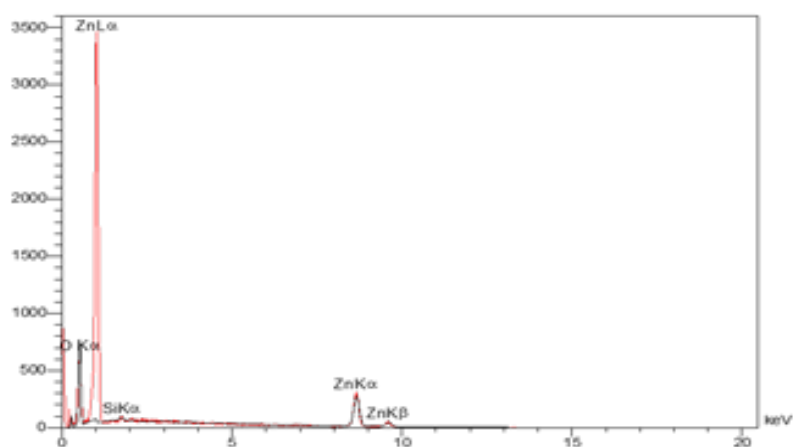
شکل ۶: نتایج FTIR برای نانوذره شیمیایی



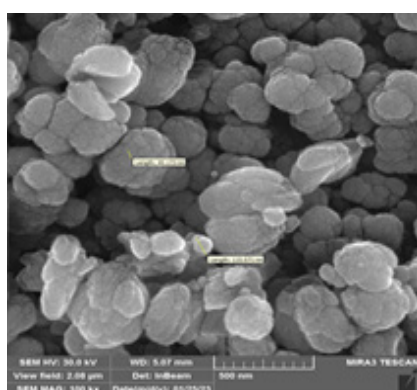
شکل ۷: نتایج FTIR برای نانوذره گیاهی



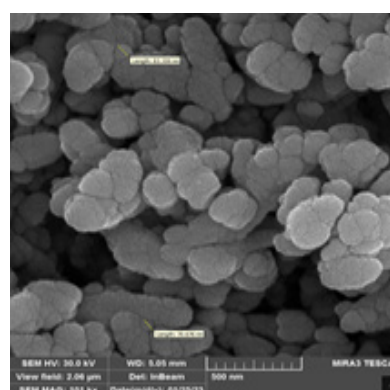
شکل ۸: نتایج تصاویر گرفته شده از نانوذرات اکسید روی توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری



شکل ۹: نمودار EDAX نانوذره شیمیایی و گیاهی



شکل ۱۱: نتایج حاصل از FESEM برای نانوذره سنتز شده گیاهی



شکل ۱۰: نتایج حاصل از FESEM برای نانوذره سنتز شده شیمیایی

جدول ۱: بررسی اثر مهاری عصاره ی گیاه بن سرخه به روش MIC

| عصاره آبی گیاه بن سرخه<br>(mg/ml) | استرپتوکوک اینیانه | آنروموناس هیدروفیلا |
|-----------------------------------|--------------------|---------------------|
| ۱۶                                | ۱۶                 | ۸                   |
| ۳۲                                | ۳۲                 | ۱۶                  |
| ۳۲                                | ۳۲                 | ۱۶                  |
| میانگین                           | ۶۶/۲۶              | ۳۳/۱۳               |

جدول ۲: بررسی اثر مهاری نانوذرات سنتز شده گیاهی و شیمیایی به روش MIC و MBC

|      | Nanoparticle           |        |                 |       |                         |       |                 |       |
|------|------------------------|--------|-----------------|-------|-------------------------|-------|-----------------|-------|
|      | ZnO <sub>2</sub> &synt |        |                 |       | ZnO <sub>2</sub> &Chemi |       |                 |       |
|      | Bacteria               |        |                 |       | Bacteria                |       |                 |       |
|      | <i>A. hydrophila</i>   |        | <i>S. iniae</i> |       | <i>A. hydrophila</i>    |       | <i>S. iniae</i> |       |
|      | MIC                    | MBC    | MBC2            | MIC2  | MIC                     | MBC   | MIC2            | MBC2  |
|      | 64                     | 64     | 32              | 32    | 32                      | 64    | 32              | 32    |
|      | 64                     | 128    | 64              | 32    | 128                     | 128   | 16              | 64    |
|      | 128                    | 128    | 64              | 64    | 32                      | 64    | 16              | 32    |
| Mean | 85.33                  | 106.17 | 53.33           | 42.66 | 64.00                   | 85.33 | 21.333          | 42.66 |

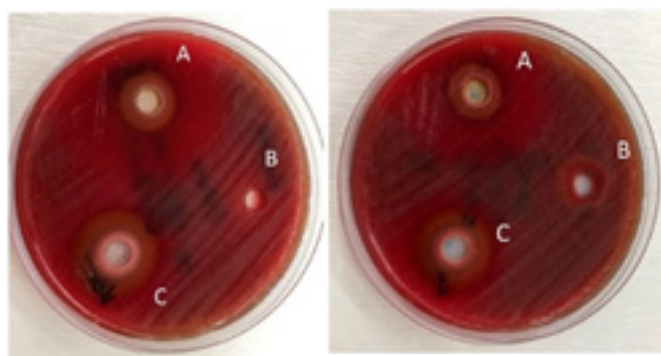
جدول ۳: قطر هاله عدم رشد باکتری ها برحسب میلی متر در غلظت های مختلف نانوذره ی اکسید روی در تست انتشار چاهک

| غلظت نانوذره $\mu\text{g/ml}$ | ۱۲۵    | ۲۵۰              | ۵۰۰                | ۱۰۰۰               |
|-------------------------------|--------|------------------|--------------------|--------------------|
| سویه ی باکتری                 |        |                  |                    |                    |
| آنروموناس هیدروفیلا           | ۷,۲ mm | ۸,۲۵ mm          | ۱۰,۹ $\pm$ ۰,۵۰ mm | ۱۳,۴ $\pm$ ۰,۵۷ mm |
| استرپتوکوک اینیانه            | ۸,۹ mm | ۹,۲ $\pm$ ۰,۴۳mm | ۱۱,۴ $\pm$ ۰,۵۰ mm | ۱۴ $\pm$ ۰,۵۹ mm   |



جدول ۴: قطر هاله عدم رشد باکتری ها بر حسب میلی متر در غلظت های مختلف نانوذره ی اکسید روی در تست انتشار دیسک

| غلظت نانوذره $\mu\text{g/ml}$ | ۸۰   | ۴۰   | ۲۰   | سیپروفلوکساسین<br>$5 \mu\text{g/ml}$ |
|-------------------------------|------|------|------|--------------------------------------|
| سویه ی باکتری                 |      |      |      |                                      |
| آئروموناس هیدروفیلا           | ۱۵mm | ۱۲mm | ۹mm  | Grow up                              |
| استرپتوکوک اینیائنه           | ۱۶mm | ۱۴mm | ۱۱mm | ۳۰mm                                 |



شکل ۱۲: قطر ناحیه بازدارندگی بر حسب میلی متر در اطراف هر چاهک در غلظت های مختلف نانوذرات اکسید روی در روش انتشار چاهک

## بحث

توسط باکتری، قارچ و گیاهان انجام شد نشان داد که روشهای سبز سنتز نانو ذرات، انرژی و هزینه کمتری نیاز دارند (۲۷). محمد و همکاران نیز طی تحقیقات خود توانستند نانو ذرات آهن توسط قارچ آلتاریا را سنتز کنند (۲۸). در تحقیق دیگری، رانت و همکاران با استفاده از عصاره برگ گیاه ریحان، بیوسنتز نانوذرات اکسید روی را انجام دادند و بررسی اندازه نانو ذرات را با SEM نشان داد که اندازه نانوذرات در حدود ۱۱ تا ۲۵ نانومتر و شکل نانوذرات ۶ وجهی بود (۲۹). در حالی که در مطالعه ما، نانوذرات اکسید روی سنتز شده دارای محدوده اندازه ۴۵ تا ۱۱۵ نانومتر بوده و شکل نانوذرات کروی بود. در تحقیق مشابه دیگری که توسط یدارکار و

با اندازه های مختلف نیز انجام شده است. برای انجام برهمکنش عصاره گیاه و محلول نمک نیترات روی و تغییر رنگ از قهوه ای به زرد، به دمای بالا نیاز بود که با نتایج حاصل از دانشمندان سلواکومار و کارنان در تهیه نانوذره اکسید روی از گیاه *Nephelium lappacum* مطابقت داشت (۳۶). در این مطالعه مشخص شد که عصاره گیاه بن سرخ توانایی تولید نانوذرات اکسید روی از نیترات روی را دارد. همچنین مشخص گردید که نانوذرات اکسید روی بیوسنتز شده دارای فعالیت ضد باکتریایی می باشند و در مقایسه با عصاره گیاه بن سرخ، دارای اثرات ضد میکروبی قوی تری هستند. تحقیقی که توسط پانتیدوس و همکاران در رابطه با سنتز بیولوژیک نانو ذرات فلزی

جهت سنتز نانوذرات نقره توسط عصاره گیاه بن سرخ انجام شد، مشابهت دارد (۳۵،۳۴). نتایج حاصل از UV-Vis نشان می داد که نانوذرات سنتز شده ی شیمیایی نسبت به نانوذرات سنتز شده ی گیاهی داری باند گپ انرژی بیشتری بودند که این امر گویایی این است که ابعاد نانوذرات شیمیایی نسبت به سنتز شده ی گیاهی کوچک تر بودند. نتایج حاصل از میکروسکپ الکترونی نیز تایید کننده این تفاوت اندازه بود. اگر چه هر دو نانوذرات در بررسی MIC و MBC نتایج مشابهی را نشان می دادند اما داده های اماری تفاوت معنا داری را از نظر عملکرد نشان داد که تاثیر مطلوب تر نانوذرات شیمیایی میتواند به همین امر یعنی کوچک تر بودن و نسبت سطح به حجم متفاوت نانوذرات شیمیایی باشد. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج بدست آمده از مطالعه احمد و همکارانش (۳۶) و دوبراکا و همکارانش (۳۷) با نتایج حاصل از مطالعه ما مشابهت زیادی داشت. ابعاد باند گپ و نتایج UV-Vis بدست آمده از نتایج آنان نیز حاکی از طول موج جذبی مشابهی با مطالعه ما بود و محدوده ی ۳۶۶ که محدوده طول موجب جذبی آنان بود با مطالعه ما که طول موجب جذبی در ۳۷۵ بود طیف مشابهی را نشان می داد هم چنین محاسبه باند گپ در مطالعه آنان چیزی حدود ۴،۸ بود که با باند گپ نانوذرات ما که ۵،۹۰ بود متفاوت بود که این تفاوت نشان دهنده یکنواختی و کوچک تر بودن نانوذرات ما و تفاوت بهتر عملکرد نانوذرات حاصل از مطالعه ما را توجیه می کند. اگر چه این تفاوت میتوان به علت تفاوت در دستگاه و الکترودهای دستگاه سونیکت و هم چنین نوع ماده موثره اولیه باشد. لذا به شکل کلی می توان عنوان کرد که نانوذرات سنتز شده ی شیمیایی و نانوذرات سنتز شده گیاهی تفاوت چندانی باهم ندارند و می توان بیان کرد که این گیاه به عنوان یک کارخانه زنده می تواند برای تولید نانوذرات اکسید روی مورد استفاده قرار بگیرد. بنابراین می توان گفت که گیاه بن سرخ غیر از نقش دارویی و غذایی که دارد می تواند برای تولید نانوذرات اکسید روی برای مصارف پزشکی و داروسازی استفاده شود. در مطالعه حاضر به شکل مقایسه ای برای دو نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی و

همکاران انجام شد، نانوذرات اکسید روی با استفاده از استات روی و عصاره برگ گیاه *Ixora Coccinea* سنتز گردید که اندازه نانو ذرات حدود ۸۰ تا ۱۳۰ نانومتر و شکل نانوذرات کروی بود (۳۰)، که از لحاظ سایز و اندازه با مطالعه ما متفاوت است اما از نظر شکل نانو ذرات با مطالعه ما همپوشانی دارد. بهامی و همکاران، نانوذرات اکسید روی را با استفاده از استات روی و عصاره برگ گیاه *roseu Catharanthus* سنتز نمودند که سایز نانوذرات در محدوده ۲۳ تا ۵۹ نانومتر و از لحاظ شکل، کروی بودند، همچنین در این مطالعه، خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی سنتز شده بر ضد باکتری های سودوموناس، استرپتوکوکوس، اشرشیاکلی و باسیلوس تورنجینسیس مورد بررسی قرار گرفت که به ترتیب بیشترین اثر ضد میکروبی بر روی سودوموناس و کمترین اثر ضد میکروبی بر روی اشرشیا کلی مشاهده گردید (۳۱). در صورتی که در مطالعه ما نیز تاثیر نانوذرات سنتز شده بر روی استرپتوکوکوس اینایته بیشتر از *آئروموناس هیدروفیلا* مشاهده گردید. نتایج به دست آمده از مطالعه ما نشان داد که عصاره گیاه بن سرخ بر علیه هر دو باکتری نام برده تاثیرات مطلوب ضد میکروبی داشته است، اما تاثیر بهتر این عصاره بر روی باکتری های گرم مثبت مشاهده گردید که با نتایج حاصل از مطالعه ندا فاضلی (۳۲) و مجتبی علی شاهی (۳۳) مشابهت نسبی داشت. نتایج مطالعه آنان که بر روی دو طیف باکتری های گرم مثبت و منفی صورت گرفته بود نشان داد که عصاره گیاه بن سرخ تاثیر بهتری بر روی باکتری های گرم منفی دارد اگرچه نتایج آنان مانند نتایج مطالعه ما هر دو اثر ممانعتی بر روی هر دو نوع باکتری را نشان می داد. طبق نتایج به دست آمده از تحقیق ما می توان گفت که عصاره گیاه بن سرخ قابلیت سنتز نانوذرات را دارد. نتایج حاصل، کارکرد خوب این گیاه را به وضوح نشان داد. در مطالعه حاضر، به شکل مقایسه ای نانوذرات سنتز شده شیمیایی با نانوذرات سنتز شده به روش سبز و همچنین اثر مهاری آن ها بر روی دو باکتری *استرپتوکوکوس اینیه* و *آئروموناس هیدروفیلا* مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت که نتایج ما با پژوهشی که توسط سیوارمن و همکاران در سال ۲۰۰۹ و ساتیاواتی و همکاران در سال ۲۰۱۰

نتایج مشابهی را نشان داد که نتایج حاصل از MIC ما را تایید می کند. در مطالعه دیگری که توسط جانکی و همکارانش (۳۹) انجام شد، نتایج مشابهی را برای هر دو طیف باکتری گرم مثبت و گرم منفی بدست آوردند که با مطالعه ما کاملاً مطابقت داشت و نانوذرات سنتز شده ی شیمیایی تاثیر مطلوبی بر روی هر دو طیف باکتری های گرم مثبت و منفی داشتند، لذا نتایج آنان تایید کننده ی مطالعه حاضر است. مطالعه دیگری که چودهاری و همکارانش (۴۰) بر روی اثر نانوذرات سنتز اکسید روی انجام دادند دو طیف باکتری گرم مثبت و منفی بررسی شد و نتایج آنان نیز تایید کننده ی تاثیر مطلوب نانوذره ی اکسید روی بر روی هر دو طیف باکتری های گرم مثبت و منفی بود که تایید کننده نتایج حاصل از تحقیق حاضر می باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات اکسید روی تولید شده به روش سنتز سبز، باکتری های مورد بررسی را کنترل کرده و همچنین به نظر می رسد نانوذرات اکسید روی در مقایسه با نانوذرات سنتز شده ی شیمیایی تاثیرات تقریباً مشابهی از خود بروز داده اند و تفاوت اثر چندانی نداشتند. و در نهایت استفاده از نانوذرات در کنار آنتی بیوتیک های رایج، ما را قادر خواهد کرد تا از غلظت بسیار کمتر آنتی بیوتیک ها استفاده کنیم و اثرات سوء آنها را کاهش دهیم. همچنین به نظر می رسد در مواردی که نسبت به یک نوع آنتی بیوتیک باکتری مقاومت نشان می دهد بتوان با استفاده از ترکیب آنتی-بیوتیک-نانوذره حساسیت باکتری را به عامل ضد باکتری افزایش داد.

روش تولید زیستی نانوذرات یکی از راه های جدید، کم هزینه و کم خطر برای تولید نانوذرات می باشد که از دهه ۹۰ قرن بیستم به شدت مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است (۴۱). امروزه، تهیه نانوذرات زیستی با توجه به کارایی آن ها در پزشکی و علوم زیستی رو به افزایش است؛ از سوی دیگر، افزایش آگاهی نسبت به شیمی سبز و فرایندهای زیستی، استفاده از روش های سازگار با محیط زیست را برای تهیه غیرسمی نانو مواد زیستی ضروری کرده است. نانوذرات از این جهت که، بین حالت حجیم ماده و حالت اتمی یا مولکولی مانند یک پل می باشند، حائز اهمیت می باشند (۴۳، ۴۲).

سنتز شده ی گیاهی نشان داده شده است. برای نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی بیشترین میزان میانگین MIC مربوط به *آئروموناس هیدروفیلا* (۶۳ میکروگرم بر میلی لیتر) و کمترین میزان MIC مربوط به باکتری *استرپتوکوک اینیه* (۲۱ میکروگرم بر میلی لیتر) بود. این میزان در رابطه با نانوذره ی سنتز شده ی گیاهی برای *آئروموناس هیدروفیلا* (۸۳ میکروگرم بر میلی لیتر) و در رابطه با (۵۲ میکروگرم بر میلی لیتر) بود. نتایج بدست آمده نشان داد که *آئروموناس هیدروفیلا* نسبت به *استرپتوکوکوس اینیه* حساسیت کمتری به نانوذره سنتز شده ی شیمیایی و گیاهی دارد. همچنین در جایگاه مقایسه دو نانوذره باهم نتایج بیان کننده تاثیر بهتر نانوذره ی شیمیایی نسبت به نانوذره ی گیاهی بود. این تفاوت عدد نشان میدهد که نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی در کل تاثیر مطلوب تری بر روی باکتری ها داشته و همچنین هر دو نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی و گیاهی تاثیر بهتری بر روی *استرپتوکوکوس اینیه* داشته اند. همچنین میانگین میزان MBC برای *آئروموناس هیدروفیلا* در رابطه با نانوذره سنتز شده شیمیایی (۸۳ میکروگرم بر میلی لیتر) و برای نانوذره ی سنتز شده ی گیاهی نیز (۱۰۴ میکروگرم بر میلی لیتر) بود. میزان MBC برای نانوذره ی سنتز شده ی گیاهی برای *استرپتوکوک اینیه* (۵۲ میکروگرم بر میلی لیتر) و برای نانوذره ی سنتز شده ی شیمیایی (۴۲ میکروگرم بر میلی لیتر) بود که نتایج همچنان نشان دهنده ی تاثیر بهتر هر دو نانوذره ی سنتتیک بر روی *استرپتوکوک اینیه* می باشد. در مطالعه ی مشابهی که ایفنجی و همکاران (۳۸)، اثر اکسید روی سنتز شده به روش سبز بر روی دو طیف باکتری های گرم مثبت و منفی بررسی کردند نیز مشاهده شد که اثر بخشی نانوذرات اکسید روی بر روی باکتری های گرم مثبت بهتر از گرم منفی بود همچنین بیان کرده بودند که رقت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر میتواند اثر بخشی خوبی بروی *آئروموناس هیدروفیلا* داشته باشند. تفاوت این داده ها می تواند به این دلیل باشد که منبع نمونه های ما همچنین طریقه سنتز نانومواد و اندازه نانومواد سنتتیک ما متفاوت بوده است. اما به شکل کلی نتایج رقت MIC آنان برای باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*

که عمل احیا در این برهمکنش، توسط فلاونوئید عصاره گیاه انجام شده است. تایید تشکیل نانوذرات اکسید روی با دستگاه های UV-vis، XRD و ... به تایید رسید. طبق گزارش های، «استان» و دیگر همکاران توانستند از سیر، ریحان و رزماری، نانوذره اکسید روی تولید کنند. این کار توسط دیگر دانشمندان از جمله آمیکا از گیاه (vitex negundo) (۴۶)، دوی از گیاه ختمی (۴۷، ۴۸) و راج از گیاه Zingiber Officinale (۴۹، ۵۰) انجام شده است.

نانوذرات فلزی از نظر ویژگی های الکتریکی، اپتیکی، شیمیایی و مغناطیسی که از خود نشان داده اند، مورد مطالعات فراوان قرار گرفته اند (۴۴). گونه های مختلف گیاه سیر دارای فنولیک بوده و به همین دلیل به منظور تولید نانوذرات، می تواند کاندید مناسبی باشد (۴۵). از بین گونه های مختلف گیاه سیر، گونه بن سرخ که بومی ایران می باشد، حائز اهمیت است. سنتز نانوذرات، بر اساس احیای یون های نمک آنها و خنثی شدن بار الکتریکی در آنها است. عامل احیا کننده در تولید نانوذره اکسید روی در این تحقیق، عصاره گیاه بن سرخ بوده

### نتیجه گیری

عصاره گیاه بن سرخ تاثیرات مطلوب ضد میکروبی خصوصاً بروی باکتری /ستریپتوکوکوس/ اینیه میتواند داشته باشد. در مقایسه نانوذرات سنتز شده گیاهی با سنتز شده ی شیمیایی مشخص شد که نانوذرات شیمیایی اگر چه تاثیر بهتری دادند اما تفاوت اثر بسیار ناچیز بوده و از آنجا که سنتز سبزانومواد تاثیرات زیست محیطی بهتری داشته و مسلماً عوارض کمتری دارد، میتوان گفت که نانوذرات گیاهی میتوانند جایگزین مطلوبی برای نانوذرات شیمیایی باشند. همچنین کاندیدی برای جایگزینی آنتی بیوتیک درمانی در صنعت پرورش ماهی باشد .

### تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری واحد تهران مرکزی به جهت تصویب پروپوزال و مکاتبات اداری و از آزمایشگاه میکروپ شناسی دانشگاه تهران مرکزی به جهت در اختیار قراردادن امکانات آزمایشگاه برای انجام این تحقیق تشکر می شود.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند هیچ تعارض منافی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

## References

1. Matin F, Mirnurollahi SM, Behzadi R. Comparison and evaluation of the effect of disinfectants Microten, Savlon(strymid-c) and Banzalkonium chlorid on Escherichia coli. Iranian journal of biological. 2023;17(4):35-47.
2. Rai M, Kon K, Gade A, Ingle A, Nagaonkar D, Paralikar P, et al. Antibiotic resistance: can nanoparticles tackle the problem. 2016.
3. Yuvakkumar R, Suresh J, Nathanael AJ, Sundrarajan M, Hong SJMS, C E. Novel green synthetic strategy to prepare ZnO nanocrystals using rambutan (Nephelium lappaceum L.) peel extract and its antibacterial applications. 2014; 41:17-27.  
DOI: 10.1016/j.msec.2014.04.025.
4. Ruddaraju LK, Pammi SVN, sankar Guntuku G, Padavala VS, Kolapalli VRMJAJoPS. A review on antibacterials to combat resistance: From ancient era of plants and metals to present and future perspectives of green nano technological combinations. 2020;15(1):42-59.  
DOI: 10.1016/j.ajps.2019.03.002.
5. Shaikh S, Nazam N, Rizvi SMD, Ahmad K, Baig MH, Lee EJ, et al. Mechanistic insights into the antimicrobial actions of metallic nanoparticles and their implications for multidrug resistance. 2019;20(10):2468.  
DOI: 10.3390/ijms20102468
6. Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan KJAPjotm. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa strains. 2010;3(4):266-9.  
DOI:10.1016/S1995-7645(10)60064-8
7. Mobaiyen H, Jafari Sales A, Sayyahi JJJJoABS. Evaluating antimicrobial effects of centaurea plant's essential oil on pathogenic bacteria: staphylococcus aureus, staphylococcus epidermidis, and escherichia coli isolated from clinical specimens. 2015;5(4):479-87.
8. JAFARI-SALES A, Pashazadeh MJJoLS, Biotechnology. Study of chemical composition and antimicrobial properties of Rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oil on Staphylococcus aureus and Escherichia coli in vitro. 2020;3(1):62-9.  
DOI: 10.38001/ijlsb.693371.
9. TABATABAEI YF, ALIZADEH BB, Zanganeh H. The comparison among antibacterial activity of Mespilus germanica extracts and number of common therapeutic antibiotics "in vitro". 2015.
10. Raghunath A, Perumal EJJoaa. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. 2017;49(2):137-52.  
DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011.
11. Huh AJ, Kwon YJJJocr. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotic's resistant era. 2011;156(2):128-45.
12. Raghupathi KR, Koodali RT, Manna ACJL. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. 2011;27(7):4020-8.  
DOI: 10.1021/la104825u.
13. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJJNRM. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. 2013;11(6):371-84.  
DOI: 10.1038/nrmicro3028.
14. Niño-Martínez N, Salas Orozco MF, Martínez-Castañón G-A, Torres Méndez F, Ruiz FJJjoms. Molecular mechanisms of bacterial resistance to metal and metal oxide nanoparticles. 2019;20(11):2808.  
DOI: 10.3390/ijms20112808.
15. Brandelli A, Ritter AC, Veras FFJMnip. Antimicrobial activities of metal nanoparticles. 2017;337-63.  
DOI:10.1007/978-3-319-63790-7\_15.
16. Saif S, Tahir A, Chen YJN. Green synthesis of iron nanoparticles and their environmental applications and implications. 2016;6(11):209.  
DOI: https://doi.org/10.3390/nano6110209.
17. Zhu X, Pathakoti K, Hwang H-M. Green synthesis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles and their usage for antimicrobial applications and environmental remediation. Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles: Elsevier; 2019. p. 223-63.  
DOI:10.1016/B978-0-08-102579-6.00010-1.
18. Kavosi S, Yaghoubi HJC, Research M. Synthesis of silver nanoparticles using green method of plant extract european marjoram (Origanum Majorana) and their antibacterial effects. 2017;30(2):161-73.
19. Stan M, Popa A, Toloman D, Silipas TD, Vodnar DC. Antibacterial and antioxidant activities of ZnO nanoparticles synthesized using extracts of Allium sativum, Rosmarinus officinalis and Ocimum basilicum.

Acta Metall Sin (Engl. Lett.); 2016. 29(3): 228-36.

DOI: 10.1007/s40195-016-0380-7.

20. Elumalai K, Velmurugan SJASS. Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of *Azedarach indica* (L.). 2015; 345:329-36.

DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.03.176.

21. Gram L, Melchiorson J, Bruhn JBJMb. Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a global sampling of ocean surface waters and surface swabs of marine organisms. 2010; 12:439-51.

DOI: 10.1007/s10126-009-9233-y.

22. Rasmussen-Ivey CR, Figueras MJ, McGarey D, Liles MRJFim. Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: in the wake of reclassification. 2016:1337.

DOI: doi: 10.3389/fmicb.2016.01337.

23. Ahmed S, Chaudhry SA, Ikram S. A review on biogenic synthesis of ZnO nanoparticles using plant extracts and microbes: a prospect towards green chemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017; 166:272-84.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.011>.

24. Król A, Pomastowski P, Rafińska K, Railean-Plugaru V, Buszewski B. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in colloid and interface science*. 2017; 249:37-52.

DOI: 10.1016/j.cis.2017.07.033.

25. Deep G, Agarwal R. Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2010;29(3):447-63.

DOI: 10.1007/s10555-010-9237-0.

26. Riesenberger A, Kaspar H, Febler AT, Werckenthin C, Schwarz S. Susceptibility testing of *Rhodococcus equi* an interlaboratory test. *Vet Microbial* 2016; 194:30 -5

27. Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memic AJIJon. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. 2012:6003-9.

DOI: 10.2147/IJN.S35347.

28. Karnan T, Selvakumar SAS. Biosynthesis of ZnO nanoparticles using rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) peel extract and their photocatalytic activity on methyl orange dye. *J Mol Struct*; 2016. 1125:358-6.

DOI: 10.1016/j.molstruc.2016.07.029.

29. Pantidos N, Horsfall LE. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. *J Nanomed Nanotechnol*. 2014;5(5):1 -10.

DOI: <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000233>.

30. Mohamed YM, Azzam AM, Amin BH, Safwat NA. Mycosynthesis of iron nanoparticles by *Alternaria alternata* and its antibacterial activity. *African J of Biotechnol*. 2015;14(4):1234 -41.

DOI: 10.5897/AJB2014.14286.

31. Raut PS, Thorat V, Thakre R. Green Synthesis of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles Using *Ocimum tenuiflorum* Leaves. *Int J Sci Res*. 2015;17(5):1225 -8.

32. Yedurkar S, Maurya Ch, Mahanwar P. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *ixora coccinea* leaf extract—a green approach. *Open J Synth Theory Appl*. 2016;5(1):1 -14.

DOI: 10.4236/ojsta.2016.51001.

33. Bhumi G, Savithramma N. Biological Synthesis of Zinc oxide Nanoparticles from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Leaf extract and validation for antibacterial activity. *Int J Drug Dev Res*. 2014; 6(1):208 -14.

34. Neda Fazeli ASN, Seyed Amir Hossein Jalali, and Hojjatolah Zamani. Antimicrobial activity of extract derived from sea anemone (*Stichodactyla haddoni*) against *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fisheries*. 2021;74(1):85-96.

DOI: 10.22059/jfisheries.2021.312541.1207.

35. ALISHAH M GM, NAJAFZADEH H, PASHMFOROOSH M. ANTIBACTERIAL EFFECTS OF SOME MEDICAL PLANT EXTRACTS ON *AEROMONAS HYDROPHILA*, *YERSINIA RUCKERI* AND *STREPTOCOCCUS INIAE*. *SCIENTIFIC-RESEARCH IRANIAN VETERINARY JOURNAL*. 2011;6(2):21-30.

36. Sivaraman SK, Elango I, Kumar S, Santhanam VJCS. A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds. 2009;97(7).

37. Sathyavathi R, Krishna MBM, Rao DNJJoN, Nanotechnology. Biosynthesis of silver nanoparticles using *moringa oleifera* leaf extract and its application to optical limiting. 2010; 10:1-5.

DOI: 10.1166/jnn.2011.3581.

38. Ahmad R, Khatoon N, Sardar MJASL. Antibacterial effect of green synthesized TiO<sub>2</sub> nanoparticles. 2014;20(7-8):1616-20.



39. Dobrucka R, Długaszewska JJSjobs. Biosynthesis and antibacterial activity of ZnO nanoparticles using *Trifolium pratense* flower extract. 2016;23(4):517-23.

DOI: 10.1016/j.sjbs.2015.05.016.

40. Ifeanyichukwu UL, Fayemi OE, Ateba CNJM. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles from pomegranate (*Punica granatum*) extracts and characterization of their antibacterial activity. 2020;25(19):4521.

DOI: 10.3390/molecules25194521.

41. Janaki AC, Sailatha E, Gunasekaran SJSAPAM, Spectroscopy B. Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. 2015; 144:17-22.

DOI: 10.1016/j.saa.2015.02.041.

42. Chaudhary A, Kumar N, Kumar R, Salar RKJSAS. Antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles synthesized from *Aloe vera* peel extract. 2019; 1:1-9.

DOI: 10.1007/s42452-018-0144-2.

43. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. antimicrobial effects of silver nanoparticles. 2007;3(1):95-101.

DOI: 10.1016/j.nano.2006.12.001.

44. Khoshal Z, Vaziri A and Rahbarian R. Green production of silver nanoparticles from *Eryngium planum* and its antibacterial effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Iranian journal of biological sciences. 2023 ;17(4):77-92.

45. Kaushikthakkar N, Snehitmhatre S, Raseshparikh Y. Biological synthesis of Metallic Nanoparticles. Nanomedicine 2010; 28:257 -62.

46. Azizinshermeh O, Valizadeh J, Noroozifar M, Ghasemi A, Valizadeh M. [Optimization, characterization and anti

- microbial activity of gold nanoparticles biosynthesized using aqueous extract of *Sambucus ebulus* . LJ. Phytochem J Med Plants 2016; 1:1 -18.

47. Manokari M, Ravindran CP, Shekhawat MS. Production of zinc oxide nanoparticles using aqueous extracts of a medicinal plant *Micrococca mercurialis* (L.) Benth. WSN; 2016. 30:117.

48. Ambika S, Sundrarajan M. Green biosynthesis of ZnO nanoparticles using *Vitex negundo* L. extract: spectroscopic investigation of interaction between ZnO nanoparticles and human serum albumin. J Photochem Photobiol; 2015. 149:143-8.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.05.004>.

49. Bala N, Saha S, Chakraborty M, Maiti M, Das S, Basu Rand and Nandy P. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Hibiscus subdariffa* leaf extract: effect of temperature on synthesis, antibacterial activity and anti-diabetic activity. RSC Adv; 2015. 5(7):4993-5003.

DOI: <https://doi.org/10.1039/C4RA12784F>.

50. Raj LFA, Jayalakshmy E. Biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using root extract of *zingiber officinale*. Orient J Chem; 2015. 31(1):51-6.

DOI: <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/310105>.





Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

h t t p s : / / z i s t i . i a u v a r a m i n . a c . i r



# Study of the Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates and the Presence of Vancomycin-Resistant Isolates in Clinical Samples

Sanaz Rahimi<sup>1</sup>, Katayon Borhani<sup>2,\*</sup>

2. Msc Student, Department of Biology, Islamic Azad University of Tehran central branch ,Tehran

2. Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University of Tehran central branch ,Tehran

**Place of Research:** Department of Biology, Islamic Azad University of Tehran central branch ,Tehran

Article Info

Abstract

## Article History:

Recived 02.14.2023  
Revised 05.21.2023  
Accepted 07.10.2023  
Online 03.12.2024

## KeyWords:

Methicillin-resistant  
*Staphylococcus aureus*,  
Vancomycin resistant,  
Nosocomial infection

## \*Corresponding author:

E-mail address  
sanazrahimi211@yahoo.com  
kborhani54@gmail.com

**Introduction:** *Staphylococcus aureus* is one of the most common and significant nosocomial pathogens. Due to the increasing resistance of these bacteria to antibiotics, they have become one of the most important health problems worldwide.

**Aim:** The aim of this study is to investigate the prevalence of this bacterium in various hospital wards and the frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates, as well as the potential isolation of vancomycin-resistant isolates in clinical samples.

**Materials and Methods:** 138 clinical samples were collected from various wards of six hospitals in Tehran and were identified as *Staphylococcus aureus* through biochemical tests. Antibiotic susceptibility testing was performed using the disk diffusion method with thirteen antibiotics. The prevalence of the *mecA* and *vanA* genes in resistant isolates was determined using PCR.

**Results:** Most clinical samples were collected from the ICU, particularly related to urinary tract infections in women and bronchial washings in men. The majority of isolates were from the 30 to -50year-old age group. The highest resistance was reported against penicillin (%99) all of isolates were sensitive to Synercid. Although 87 isolates (%62.9) contained the *mecA* gene and were identified as MRSA, none of them contained the *vanA* gene.

**Conclusion:** The development of antibiotic resistance in hospital-acquired infections is one of the most significant challenges in treatment. Precise and continuous monitoring of resistance genes is of great importance.

**Cite this article:** Rahimi, S., Borhani, K., Study of the Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates and the Presence of Vancomycin-Resistant Isolates in Clinical Samples. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(4):31-41

**Publisher:** Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

**Print ISSN:** 1735-4226

**Online ISSN:** 1727-459X

**This is an open access article under the:** <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



## بررسی فراوانی ایزوله های مقاوم به متی سیلین / استافیلوکوکوس اورئوس و وجود جدایه های مقاوم به ونکومايسين در نمونه های بالینی

ساناز رحیمی<sup>۱</sup>، کنایون برهانی<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران

اطلاعات مقاله

چکیده

**مقدمه:** استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایع ترین و مهمترین عوامل بیماریزای بیمارستانی است و به علت افزایش مقاومت آنها در برابر آنتی بیوتیک ها، به عنوان یکی از مهمترین مشکلات بهداشتی در سراسر جهان تبدیل شده اند.

**هدف:** بررسی فراوانی این باکتری در بخش های مختلف بیمارستانی و فراوانی جدایه های مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس (MRSA) و احتمال جداسازی ایزوله های مقاوم به ونکومايسين در نمونه های بالینی می باشد.

**مواد و روش ها:** ۱۳۸ نمونه بالینی از بخشهای مختلف شش بیمارستان در تهران جدا شده و با انجام تست های بیوشیمیایی به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شدند. تست حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش انتشار دیسک با استفاده از سیزده آنتی بیوتیک انجام شد. فراوانی ژن های *mecA* و *vanA* در ایزوله های مقاوم با روش PCR تعیین گردید.

**نتایج:** بیشتر نمونه های بالینی از بخش ICU جدا شدند و بویژه مربوط به عفونت های ادراری در زنان و سپس شستشوی برونش در مردان بودند. بیشتر جدایه ها مربوط به گروه سنی ۳۰ تا ۵۰ سال بودند. بالاترین مقاومت به آنتی بیوتیک پنی سیلین (۹۹/۱٪) گزارش شد و تمام جدایه ها به سیترسید (۰٪) حساس بودند. اگرچه ۸۷ جدایه (۶۲/۹٪) حاوی ژن *mecA* بوده و به عنوان باکتری های MRSA شناخته شدند، اما هیچ یک از آنها حاوی ژن *vanA* نبودند.

**نتیجه گیری:** ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در عفونت های بیمارستانی یکی از مهمترین چالش ها در درمان است، پایش دقیق و مداوم ژن های مقاومت بسیار حائز اهمیت است.

### تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۲/۱۱/۲۴

بازنگری ۱۴۰۲/۰۲/۲۲

پذیرش ۱۴۰۲/۰۴/۲۰

نمایه ۱۴۰۳/۱۲/۲۳

### کلمات کلیدی

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، مقاومت به ونکومايسين، عفونت بیمارستانی

### \* نویسنده مسؤول

sanazrahimi211@  
yahoo.com  
kborhani54@gmail.com

شیوه آدرس دهی این مقاله: رحیمی، س.، برهانی، ک.، بررسی فراوانی ایزوله های مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس و وجود جدایه های مقاوم به ونکومايسين در نمونه های بالینی. مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۲: ۱۸: (۴) ۴۱-۳۱

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا    شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶    شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹X    نویسندگان: © حق مؤلف

## مقدمه:

کاست کروموزومی *mec* قرار گرفته است (۱۰). در حال حاضر باکتری های MRSA به یکی از اصلی ترین چالش های درمانی تبدیل شده است (۱۱). شناسایی و درمان افراد کلونیزه شده با این باکتری می تواند میزان بروز MRSA را کاهش دهد (۱۲).

اخیرا تنها آنتی بیوتیکی که بر علیه این باکتری ها فعال باقیمانده است، ونکومايسين می باشد. با افزایش مقاومت نسبت به متی سیلین، از ونکومايسين جهت درمان عفونت های ناشی از سویه های MRSA استفاده شده است (۱۳). با این حال، اولین سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومايسين (VRSA) در سال ۲۰۰۲ از بیماری در کشور آمریکا جدا شد. بررسی ها نشان داده اند این سویه ها هم دارای ژن مقاومت نسبت به ونکومايسين (*van*) و نیز ژن مقاومت نسبت به متی سیلین (*mecA*) است (۱۴). ظهور جدایه هایی از *استافیلوکوکوس اورئوس* با مقاومت متوسط (VISA) و یا جدایه های مقاوم به ونکومايسين (VRSA) منجر به نگرانی جهانی درباره درمان عفونت های *استافیلوکوکی* گشته است (۱۵).

در این مطالعه فراوانی نمونه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از بیماران بخش های مختلف شش بیمارستان تهران مورد بررسی قرار گرفت. سپس میزان مقاومت به متی سیلین در جدایه ها تعیین گردید و احتمال وجود مقاومت به ونکومايسين در جدایه های MRSA مورد ارزیابی قرار گرفت.

*استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهم ترین گونه های بیماری زا از نظر پزشکی محسوب می شود (۱) (۲). از ابتدای دهه ۸۰ تاکنون، این باکتری به یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده عفونت بیمارستانی تبدیل شده است (۳). این باکتری در ایجاد عفونتهای نسبتاً خفیف تا عفونتهای سیستمیک تهدیدکننده حیات از جمله، عفونتهای بافت نرم، عفونتهای پوستی، اندوکاردیت، عفونتهای ریوی، عفونتهای استخوانی و مسمومیت های غذایی نقش دارد (۴). ناقلین اصلی، بیماران بستری شده در بیمارستان، پرسنل پزشکی، افراد مبتلا به اگزمای پوستی، معتادان تزریقی و افرادی که نیاز به تزریق دائم دارند (مانند مبتلایان به دیابت، آلرژی، همودیالیزی) می باشند (۵).

استعداد بالای سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* در کسب ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی و در نتیجه افزایش مقاومت های آنتی بیوتیکی در کنار قدرت بالای بیماری زایی، نگرانی های زیادی را بوجود آورده است (۶). یکی از مشکلات عمده در درمان عفونت های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف از جمله بتالاکتام ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و غیره است که این امر موجب گسترش عفونت های ناشی از این باکتری و بروز مشکلاتی از قبیل افزایش میزان مرگ و میر، هزینه های درمانی و مدت زمان بستری بیماران در بیمارستان ها درمانی گردیده که این مسئله درمان این عفونت ها را با محدودیت های بسیاری مواجه کرده است (۷). این سویه ها، *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (Methicillin-resistant MRSA) *Staphylococcus aureus* نام دارند (۸). تقریباً به تمام ایزوله های MRSA یک پروتئین متصل به پنی سیلین (Penicillin Binding Protein) اضافه شده است که PBP2a نامیده می شود (۹). ژن *mecA* مسئول بیان PBP2a می باشد. این پروتئین باعث می گردد که *استافیلوکوکوس اورئوس* تمایل بسیار اندکی نسبت به آنتی بیوتیک های بتالاکتام داشته باشد (۷). این ژن بر روی

## مواد و روش ها

## جمع آوری نمونه های بالینی و شناسایی

در این مطالعه توصیفی، مقطعی، به مدت ۸ ماه نمونه گیری از نمونه های ادرار، خون، خلط، زخم و مایع مغزی نخاعی بیماران بستری و سرپایی بیمارستان های تهران شامل بیمارستان های میلاد، پیامبران، بقیه الله، مهر، امیرالمومنین و شریعتی انجام گرفت و جدایه ها جهت بررسی به آزمایشگاه انتقال یافت. جهت شناسایی و تعیین هویت باکتری از روش های استاندارد میکروب شناسی و بیوشیمیایی مانند رنگ آمیزی گرم، تست های کاتالاز، اکسیداز، کوآگولاز، DNAase، رشد در محیط مانیتول سالت آگار استفاده گردید.

## بررسی حساسیت به آنتی بیوتیک ها

با استفاده از روش استاندارد دیسک دیفیوژن، حساسیت آنتی بیوتیکی هر یک از جدایه ها به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (30µg)، پنی سیلین (30µg)، سیپروفلوکساسین (30µg)، اگزاسیلین (30µg)، ونکومايسين (1µg)، اريترومايسين (10µg)، تتراسايکلين (30µg) از شرکت هایمدیا، هند و سفوتاکسیم (15µg)، تری متوپریم (30µg)، کانامایسین (20µg)، سفوکستین (30µg)، نوویوسین (15µg)، سینرسید (15µg) از شرکت مست انگلستان سنجیده شد و نتایج بر اساس دستور العمل مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی وجود ژنهای *mecA* و *vanA*

برای بررسی ژنوتیپی، استخراج DNA از جدایه ها با روش جوشاندن (Boiling) انجام شد. به این منظور، ابتدا باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر از محلول PBS<sup>۱</sup> (محلول فسفات بافر سالین) داخل میکروتیوپ حل شد. سپس میکروتیوپ ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ قرار داده شدند و بعد در دور

۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. در نهایت مایع رویی حاوی DNA استخراج شده به میکروتیوپ دیگری منتقل شد. به منظور بررسی غلظت خلوص و کیفیت رشته های DNA استخراج شده از روش نورسنجی و الکتروفورز استفاده شد. روش نورسنجی یک روش کمی است و می توان غلظت DNA را با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر در دستگاه نورسنج U.V (اپندورف، آلمان) بدست آورد.

تست PCR برای بررسی وجود ژنهای *mecA* و *vanA* صورت گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای مشاهده این ژن ها بر اساس جدول ۱ می باشد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای مشاهده ژنهای *mecA* و *vanA*

| نام ژن      | پرایمر (3'.....5')                                 | دمای انیلینگ (°C) | طول محصول (bp) |
|-------------|----------------------------------------------------|-------------------|----------------|
| <i>mecA</i> | F: ACTGCTATCCACCTCAAAC<br>R: CTGGTGAAGTTGTATCTGG   | 54                | 163            |
| <i>vanA</i> | F: ATGAATAGAATAAAAGTTGC<br>R: TCACCCCTTTAACGCTAATA | 57                | 1030           |

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر Forward، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر Reverse، ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲ میکرولیتر DNA الگو انجام شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (کربت، استرالیا) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در (دمای انیلینگ مربوط به هر پرایمر) به مدت ۵۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. سپس محصولات

<sup>1</sup> Phosphat Buffer Salin

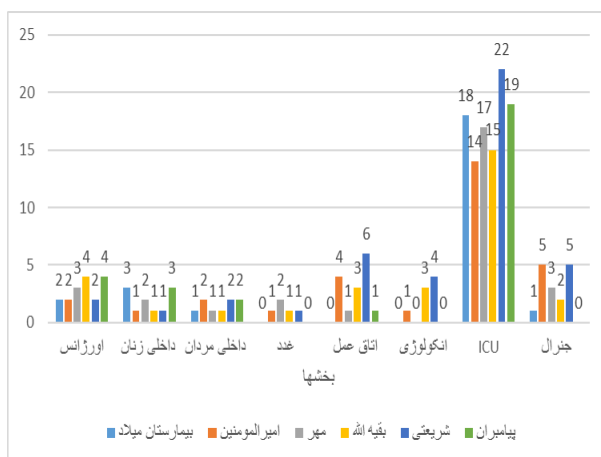
برونش در مردان (۵۶/۵٪) بیشتر از زنان (۴۳/۵٪) گزارش شد. به لحاظ سنی، بیشترین فراوانی سنی در نمونه های جدا شده از بیمارستان های مختلف، مربوط به گروه سنی ۳۰ تا ۵۰ سال (۴۷/۷٪) بوده در حالیکه افراد زیر ۳۰ سال ۳/۳٪، ۵۰ تا ۷۰ سال ۲۵/۳٪ و ۷۰ تا ۹۵ سال ۳/۸٪ گزارش گردید.

ادقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز (ATTO، ژاپن) شده و در دستگاه ترانس لومیناتور (UVP Transilluminator، آمریکا) جهت بررسی وجود یا عدم وجود ژنهای مزبور مشاهده گردیدند.

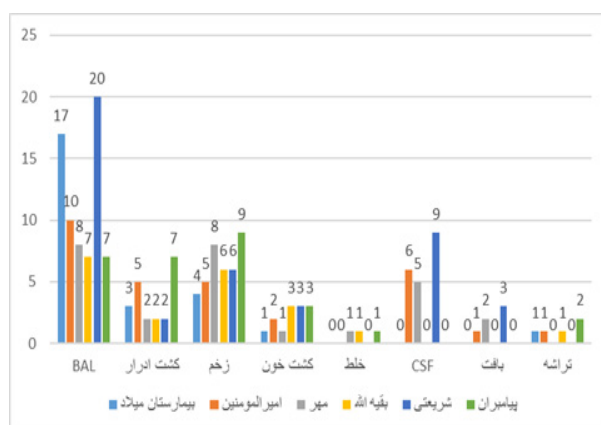
## نتایج

در این مطالعه به مدت ۸ ماه تعداد ۱۳۸ جدایه از نمونه های بالینی ادرار، خون، خلط، زخم و مایع مغزی نخاعی بیماران بستری و سرپایی بیمارستان های تهران جداسازی شدند و با انجام تست های بیوشیمیایی به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناخته شدند (شکل ۱). ۸۵ جدایه ها (۶۱/۵٪) متعلق به مردان و ۵۳ جدایه (۳۸/۴٪) از زنان جداسازی شدند.

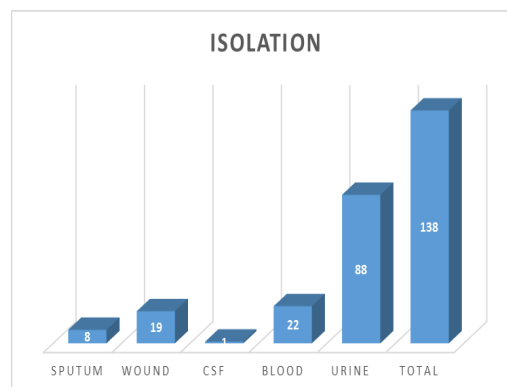
شکل ۱. پراکندگی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های بالینی



شکل ۲. فراوانی کل جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس از شش بیمارستان بر حسب بخش بستری

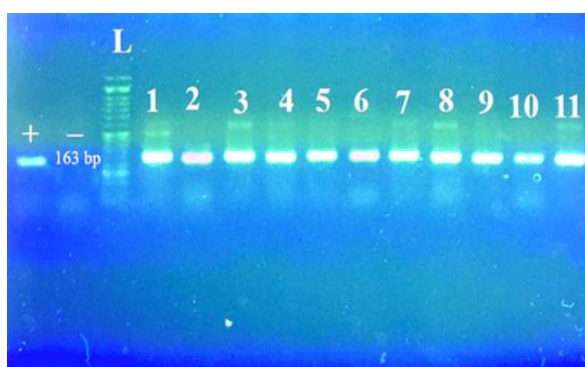


شکل ۳. فراوانی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب نوع سویه های بالینی در شش بیمارستان



علاوه بر این، بر اساس نتایج بدست آمده، بیشتر جدایه ها از بخش مراقبت های ویژه (ICU) جدا گردیدند (شکل ۲) و همچنین بیشتر نمونه ها مربوط به شستشوی برونش (BAL) گزارش شدند (شکل ۳). بررسی نتایج نشان داد که در بین نمونه های بدست آمده، میزان عفونت ادراری در زنان (۵۸٪) بیشتر از مردان (۴۲٪) و نمونه شست شوی

MRSA معرفی گردیدند (شکل ۴). علاوه بر این، هیچ کدام از جدایه های مقاوم به ونکوماکسین حاوی ژن *vanA* نبودند.



شکل ۴. الکتروفورز جهت شناسایی ژن *mecA* در استافیلوکوکوس اورئوس. +: کنترل مثبت، -: کنترل منفی، Ladder: ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت باز و شماره ۱ تا ۱۱: جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس حاوی ژن *mecA* (163 جفت باز)

## بحث

در این پژوهش نمونه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از بخشهای مختلف بستری شش بیمارستان تهران با هدف بررسی فراوانی عفونت استافیلوکوکی و چگونگی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده یکی از عفونت های شایع در بیمارستان ها، عفونت دستگاه ادراری بود. عفونت دستگاه ادراری (UTI) یکی از شایع ترین بیماری های عفونی در انسان در محیط های بیمارستانی و اجتماعی است. میزان بروز جهانی آن ۲۵۰ میلیون مورد در سال تخمین زده می شود. استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل دخیل در عفونت است که می تواند به دستگاه ادراری حمله کند. اگرچه استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۵ تا ۶ درصد از عفونت های ادراری را تشکیل می دهد اما اگر عفونت درمان نشود، می تواند منجر به شرایط شدید تهدید کننده زندگی گردد (۱۶). در اغلب بیمارستان های مورد مطالعه در این پژوهش مانند بیمارستان های میلاد، بقیه الله و شریعتی، بیشتر

بر اساس بررسی های صورت گرفته بر روی ۱۳۸ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس، بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک پنی سیلین ۱۳۷ (٪ ۹۹/۱) گزارش شد و هیچ مقاومتی به آنتی بیوتیک سینرسید مشاهده نگردید. همچنین آنالیز این نتایج نشان داد که آنتی بیوتیک های ونکوماکسین و نوویوسین دارای اثرگذاری بسیار بالایی علیه جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس هستند اما مقاومت بالایی نسبت به آنتی بیوتیک های مانند آمپی سیلین، سفوکستین، سفوناکسیم و تری متوپریم مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲. فراوانی کل سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس

| آنتی بیوتیک    | درصد حساسیت |           |
|----------------|-------------|-----------|
|                | حساس        | نیبه حساس |
| ونکوماکسین     | ۹۷/۸        | ۰/۷       |
| پنی سیلین      | ۰/۷         | ۹۹/۱      |
| اگزاسیلین      | ۳۶/۹        | ۵۷/۲      |
| آمپی سیلین     | ۷/۹         | ۹۰/۵      |
| سیپروفلوکساسین | ۳۶/۹        | ۶۰/۱      |
| تتراسایکلین    | ۲۶/۱        | ۵۸/۶      |
| اریترومایسین   | ۳۴/۷        | ۶۳/۷      |
| تری متوپریم    | ۱۴/۴        | ۸۳/۳      |
| کانامایسین     | ۲۶/۸        | ۶۲/۳      |
| سفوناکسیم      | ۱۵/۹        | ۷۵/۳      |
| سفوکستین       | ۵/۷         | ۹۴/۲      |
| نوویوسین       | ۹۸/۵        | ۱/۴       |
| سینرמיד        | ۱۰۰         | ۰         |

بر اساس نتایج تست PCR، از میان ۱۳۸ جدایه فراوانی ژن های مقاومت *mecA* و *vanA* استافیلوکوکوس اورئوس ۸۷ مورد (٪ ۶۲/۹) دارای ژن *mecA* بودند و بعنوان جدایه های

امروزه مقاومت آنتی بیوتیکی در *استافیلوکوکوس اورئوس* بخصوص در جدایه های MRSA رو به افزایش است. ایجاد مقاومت در MRSA یک مشکل بزرگ در عفونت های اکتسابی از بیمارستان در سراسر دنیا محسوب می شود (۲۲). در مطالعه حاضر از بین ۱۳۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک پنی سیلین ۱۳۷ (۹۹/۱٪) نشان دادند و همچنین هیچ مقاومتی به آنتی بیوتیک سینرسید گزارش نشد. نتایج PCR نشان داد که از میان ۱۳۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* ۸۷ جدایه (۶۲/۹٪) دارای ژن *mecA* بودند. مطالعات زیادی در زمینه مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه های بالینی در سراسر نقاط جهان و ایران صورت گرفته است که با توجه به منطقه جغرافیایی نتایج بدست آمده می تواند مشابه یا دارای تفاوت هایی باشد. همچنین بسیاری از مطالعات به بررسی وجود ژن های مقاومت در این باکتری پرداخته اند که میزان این ژن ها در مطالعات مختلف متفاوت است. در مطالعه ای محققان در دو مرکز بهداشتی در شهر ریودوژانیرو، حساسیت ضد میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس* را در کارکنان مراقبت های بهداشتی و دستگاه های پزشکی، مورد بررسی قرار دادند. از بین ۳۵ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۳۱/۴۲٪ مقاوم به متی سیلین (MRSA) بودند (۲۳). در نمونه های بالینی جدا شده در کشور سودان از بین ۱۲۳ جدایه MRSA، فقط ۱۲ سویه، حاوی ژن *mecA* نبودند (۹/۸٪) (۲۴). مطالعه ای دیگر در بیمارستان عمومی مرکزی سوماترا با هدف شناسایی ژن *mecA* در ۴۰ جدایه MRSA، تمامی آنها حاوی ژن *mecA* بودند (۲۵).

در ارتباط با مطالعاتی که در ایران در این مورد صورت گرفته، میتوان به پژوهش صورت گرفته در بیمارستان امام رضای بیرجند اشاره کرد که از بین ۱۰۲ جدایه بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۵۸/۸ درصد جدایه ها حاوی ژن *mecA* بوده و دقیقاً همین درصد مقاومت در نمونه های جدا شده از بیمارستان امام علی (ع) آمل گزارش شد

مانند بیمارستان های میلاد، بقیه الله و شریعتی، بیشتر نمونه های جدا شده نمونه های ادراری بودند و در دیگر بیمارستان ها نیز میزان این نمونه ها نسبتاً بالا بود. به طور کلی زنان بیش تر از مردان در معرض خطر ابتلا به عفونت های ادراری قرار دارند. زنان و مردان در آناتومی و فیزیولوژی دستگاه ادراری تحتانی تفاوت قابل توجهی دارند و این تفاوت ها سبب بیشتر شدن عفونت در زنان میشود. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد میزان عفونت ادراری در زنان بیشتر مردان است و اختلاف معنی داری بین آنها وجود دارد ( $P < 0.05$ ). این نتایج همسو با نتایج مطالعه میدل کوپ و همکاران در سال ۲۰۲۱ می باشد (۱۷). از طرف دیگر، نمونه های شستشوی برونش در مردان بیشتر از زنان گزارش شد که احتمالاً به علت استعمال بیشتر دخانیات در مردان می باشد. در ارتباط با این احتمال می توان به مطالعه آراکوی و همکاران (۲۰۰۴) اشاره کرد که به نقش مصرف سیگار در بروز عفونت تاکید داشتند (۱۸).

بیش از ۲۰ درصد از عفونت های بیمارستانی در بخش های ICU اتفاق می افتد و باعث مرگ و میر بین ۸۰-۱۰ درصد می شود (۱۹). یافته های این مطالعه نیز نشان داد که میزان عفونت در ICU نسبت به سایر بخش ها بیشتر است. هاشیموتو و همکاران (۲۰۲۲) ضمن نشان دادن تفاوت آماری معنی دار بین شیوع عفونت بیمارستانی در بخش های مختلف بیمارستان، اذعان داشتند که با وجودیکه ایجاد بخش های مراقبت ویژه، منجر به افزایش میزان بهبودی و کاهش میزان مرگ و میر شده است، اما از طرف دیگر طولانی شدن مدت بستری این بیماران و استفاده از انواع دستگاه های نگهدارنده و مانیتورینگ تهاجمی و انواع کاتترهای عروقی، و همچنین مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها باعث افزایش عفونت بیمارستانی در این بخش ها شده که خود به علت واکنش متابولیک و ایمنولوژیک، نارسایی سایر ارگانها را به دنبال دارد (۲۰). مطالعات دیگر از جمله مطالعه واکرو و همکاران (۲۰۲۱)، بر بالا بودن میزان عفونت در بخشهای ICU تأیید کردند (۲۱).



بخشها از نظر آلودگی به این باکتری می باشد که توجه لازم برای جلوگیری از انتقال و شیوع عفونت در این بخش را می طلبد. از طرفی ظهور سویه های MRSA به شکل نگران کننده ای رو به افزایش است در حالیکه خوشبختانه در کشور ما سویه های VRSA یا گزارش نشده یا درصد پایینی دارد، لازم است تجویز آنتی بیوتیک ها و همچنین پایش مقاومت آنتی بیوتیکی در مراکز درمانی با دقت بیشتری صورت گیرد تا از ظهور بیشتر سویه های مقاوم جلوگیری گردد.

## References

1. Panda S, Kar S, Sharma S, Singh D V. Multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates from infected eyes and healthy conjunctivae in India. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016; 6: 154–9. DOI: 10.1016/j.jgar.2016.05.006
2. Farazandeh, Nourbakhsh, Jahromi H. The effect of silver nanoparticles on surface hydrophobicity and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Biosciences*. 2021;16(1):17–31.
3. Parvizrad R, Khalili Dermani S, Ahmadi A. Frequency of Vectors of Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* Among Emergency Staff of Vali-e-Asr Hospital in Arak City, 2018. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2020;23(3):292–9. DOI: 10.32598/jams. 23. 3.5943.1
4. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J

(۲۶)(۲۷). در مطالعات دیگر هم نتایج مشابهی بدست آمده که تمامی آنها، نشاندهنده افزایشی بودن میزان سویه های MRSA در نمونه های بیمارستانی می باشد.

با توجه به روند رو به رشد MRSA استفاده از آنتی بیوتیک جایگزین در درمان این بیماران منطقی به نظر می رسد. ونکومایسین اولین انتخاب برای درمان می باشد. با این حال در کشورهای مختلفی مانند فرانسه، آمریکا، کره، جنوب آفریقا، اسکاتلند و برزیل مواردی از وجود *ستافیلوکوکوس* با کاهش حساسیت نسبت به ونکومایسین مشاهده شده است (۲۸). در سال ۲۰۰۴ در آسیا نیز شیوع مقاومت این باکتری به ونکومایسین در کشورهای مختلف نظیر ژاپن (با بیشترین میزان)، هند، کره جنوبی، فلیپین، ویتنام، سنگاپور و تایلند (با کمترین میزان) با میزانی از ۲/۱ تا ۸/۲ درصد گزارش شده است (۲۹). خوشبختانه در این مطالعه، در هیچکدام از جدایه های MRSA، ژن *vana* مشاهده نگردید. نظیر چنین نتایجی در مطالعات انجام گرفته در بیمارستان مرکزی سوماترا، عربستان و کره جنوبی مشاهده شد (۲۵)(۳۰)(۳۱). البته مواردی از کاهش حساسیت به ونکومایسین را هم در این مطالعه و هم در مطالعاتی دیگر مانند آنچه محققین آمریکایی گزارش کردند، شاهد بودیم (۳۲). در مواردی هم سویه های مقاوم به ونکومایسین (VRSA) مشاهده شده است. در این خصوص میزان جدایه های VRSA در مطالعات پژوهشگران در شهر ریودوژانیرو ۲/۸٪، در شهر زنجان ۴/۳٪ و در شهر کرمانشاه ۴/۸٪ گزارش شدند (۲۳)(۳۳)(۳۴).

## نتیجه گیری:

بر اساس نتایج بدست آمده از نمونه های بالینی *ستافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده از شش بیمارستان شهر تهران، این باکتری بعنوان یکی از معمولترین عوامل ایجاد کننده بیمارستانی می باشد و از بین بخش های مختلف بیمارستانی، متاسفانه بخش ICU یکی از آلوده ترین

- , Petit S, Gershman K, Ray S, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *The Journal of the American Medical Association* 2007;298(15):1763–71. DOI: 10.1001/jama.298.15.1763.
5. Reddy PN, Srirama K, Dirisala VR. An update on clinical burden, diagnostic tools, and therapeutic options of *Staphylococcus aureus*. *Infectious Diseases: Research and Treatment*. 2017;10:1179916117703999. DOI: 10.1177/1179916117703999
  6. Mahdavi, Khodaei, Jahromi H. Investigation of the effect of Shirazi thyme essential oil against biofilm formation of clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Biosciences*. 2018;13(1):1–8.
  7. Rezazadeh M, Yousefi Mashouf R, Sarmadyan H, Ghaznavi-Rad E. Antibiotic profile of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr Hospital of Arak. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2013;16(2):29–37.
  8. Katayama Y, Zhang H-Z, Hong D, Chambers HF. Jumping the barrier to  $\beta$ -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 2003; 185(18): 5465–72. DOI: 10.1128/JB.185.18.5465-5472.2003
  9. Suhaili Z, Johari SA, Mohtar M, Abdullah ART, Ahmad A, Ali AM. Detection of Malaysian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates using simplex and duplex real-time PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009;25:253–8. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9887-z>
  10. Stojanov M, Blanc DS. Characterization of the staphylococcal cassette chromosome mec insertion site in 108 isolates lacking the mecA gene and identified as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by the Xpert MRSA assay. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;33:1967–71. DOI: 10.1007/s10096-014-2169-9.
  11. Dibah S, Arzanlou M, Jannati E, Shapouri R. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens in Ardabil, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 2014;6(3):163.
  12. Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Eurosurveillance*. 2010;15(41). DOI: 10.2807/ese.15.41.19688-en
  13. Deresinski S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clinical Infectious Diseases* 2005;40(4):562–73. DOI: 10.1086/427701
  14. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *The New England Journal of Medicine*. 2003;348(14):1342–7. DOI: 10.1056/NEJMoa025025

15. Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(7):2836–40. DOI: 10.1172/JCI68834
16. Gul N, Mujahid TY, Ahmad S. Isolation, identification and antibiotic resistance profile of indigenous bacterial isolates from urinary tract infection patients. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2004;7(12):2051–4. DOI: 10.3923/pjbs.2004.2051.2054
17. Middelkoop SJM, Van Pelt LJ, Kampinga GA, Ter Maaten JC, Stegeman CA. Influence of gender on the performance of urine dipstick and automated urinalysis in the diagnosis of urinary tract infections at the emergency department. *European Journal of Internal Medicine*. 2021;87:44–50. DOI: 10.1016/j.ejim.2021.03.010
18. Arcavi L, Benowitz NL. Cigarette smoking and infection. *Archives of Internal Medicine*. 2004;164(20):2206–16. DOI: 10.1001/archinte.164.20.2206
19. Ozdemir K, Dizbay M. Nosocomial infection and risk factors in elderly patients in intensive care units. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*. 2015;5(01):38–43. DOI: 10.5799/ahinjs.02.2015.01.0174
20. Hashimoto K, Gotoh K, Masunaga K, Iwahashi J, Sakamoto T, Miura M, et al. Reducing the urine collection rate could prevent hospital-acquired horizontal transmission of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2022; 28(6):786–90. DOI: 10.1016/j.jiac. 2022. 02.022
21. Soriano MC, Vaquero C, Ortiz-Fernández A, Caballero A, Blandino-Ortiz A, de Pablo R. Low incidence of co-infection, but high incidence of ICU-acquired infections in critically ill patients with COVID-19. *Journal of Infection*. 2021; 82(2): e20. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.09.010
22. Gould SWJ, Cuschieri P, Rollason J, Hilton AC, Easmon S, Fielder MD. The need for continued monitoring of antibiotic resistance patterns in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from London and Malta. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2010;9:1–7. DOI: 10.1186/1476-0711-9-20
23. Breves A, Miranda CAC, Flores C, Filippis I de, Clementino MM. Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical devices. *Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine*. 2015;51(3):143–52. DOI:10.5935/1676-2444.20150025
24. Elhassan MM, Ozbak HA, Hemeg HA, Elmekki MA, Ahmed LM. Absence of the *mecA* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from different clinical specimens in Shendi City, Sudan. *BioMed Research International*. 2015;2015(1):895860. DOI: 10.1155/ 2015/ 895860
25. Nasution GS, Suryanto D, Kusumawati RL. Detection of *mecA* gene from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates of North Sumatera. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental

- Science. IOP Publishing; 2018. p. 12026. DOI 10.1088/1755-1315/130/1/012026
26. Askari, Parvin, Ghazvini, Kiarash, Namayi, Arian, et al. Investigation of the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and determination of their antibiotic resistance patterns in patients hospitalized at Imam Reza Hospital, Birjand. *Scientific Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 2017;24(3):218–26.
  27. Hadi Pour, Maryam; Izadi Amoli, Rabieh. Determination of the prevalence of vancomycin resistance genes (vanA and vanB) among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from the staff of Imam Ali Hospital, Amol. 2015. Available from: [https:// sid.ir/ paper/824141/fa](https://sid.ir/paper/824141/fa).
  28. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infectious Diseases*. 2001;1(3):147–55. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00091-3
  29. Jeon B-C, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23  $\beta$ -lactamase in Korea. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(5):2241–5. DOI: 10.1128/JCM.43.5.2241-2245.2005
  30. Al-Ruaily MA, Khalil OM. Detection of (mecA) gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at Prince a/Rhman Sidery hospital, al-Jouf, Saudi Arabia. *Journal of Medical Genetics and Genomics*. 2011;3(3):41–5.
  31. Park JW, Lee H, Kim JW, Kim B. Characterization of infections with vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility in South Korea. *Scientific Reports*. 2019; 9(1): 6236. DOI:10.1038/s41598-019-42307-6
  32. Wang G, Hindler JF, Ward KW, Bruckner DA. Increased vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a university hospital during a 5-year period. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44(11):3883–6. DOI: 10.1128/ JCM . 01388-06
  33. Khazaei S, Pourtahmaseby P, Kanani M, Madani SH, Malekianzadeh E. Resistance of *Staphylococcus aureus* to vancomycin: A six-year study (2006-2011). *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services* 2014; 35(5): 45-50.
  34. Jahanshahi A, Zeighami H, Haghi F. Molecular characterization of methicillin and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospitalized patients. *Microbial Drug Resistance*. 2018;24(10):1529–36. DOI: 10.1089/ mdr. 2018.0069.



Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

h t t p s : / / z i s t i . i a u v a r a m i n . a c . i r



Antimicrobial activity of bacteriocin of lactic acid bacteria against beta-lactamase producing bacteria and evaluation of synergistic effect by some antibiotics

Reyhaneh shirkavand<sup>1</sup>, Fatemeh Noorbakhsh<sup>2\*</sup>, Sahar Honarmand Jahromi<sup>2</sup>

1. MSc Student, Department of Microbiology, Biological Science College, Varamin-pishva branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran

2. Associate professor, Department of Microbiology, Biological Science College, Varamin-pishva branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran

Place of Research: Department of Microbiology, Varamin-pishva branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran

Article Info

Abstract

Article History:

Recived 06.18.2024

Revised 07.09.2024

Accepted 07.29.2024

Online 12.30.2024

Keywords:

Antimicrobial activity  
bacteriocin  
lactic acid bacteria  
beta-lactamase  
antibiotic

\*Corresponding author:

E-mail address,  
niloofar\_noorbakhsh  
@yahoo.com

**Introduction:** The purpose of this study was to investigate the antimicrobial activity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria against beta-lactamase-producing bacteria and to evaluate its synergism effect with some antibiotics.

**Materials and Methods:** In this study, bacteriocin was isolated from *Lactobacillus acidophilus* strains, and then the effect of produced bacteriocin against 3 pathogenic bacterial strains, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* was investigated by serial dilution method. The effectiveness of bacteriocin extract alone and in combination with commercial antibiotics against clinical pathogens was determined using the disk diffusion method in three replicates.

**Results:** The results showed that all *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains were beta-lactamase positive. This study showed a statistically significant difference in bacteriocin-antibiotic synergism activity for ceftazidime, levofloxacin, and piperacillin in *Pseudomonas aeruginosa* strains and in *Acinetobacter baumannii* strains for tetracycline, gentamicin, and ceftazidime. A synergistic effect was also observed in *Escherichia coli* with the antibiotics kanamycin and ciprofloxacin

**Conclusion:** *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin along with some antibiotics showed synergism effect in beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli*

**Cite this article:** Shirkavand, P., Noorbakhsh, F., Honarmand Jahromi, S. Antimicrobial activity of bacteriocin of lactic acid bacteria against beta-lactamase producing bacteria and evaluation of synergistic effect by some antibiotics. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(4):43-56

**Publisher:** Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch **Print ISSN:** 1735-4226 **Online ISSN:** 1727-459X **This is an open access article under the:** <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



## فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های لاکتیک اسید علیه باکتری‌های تولید کننده بتالاکتاماز و ارزیابی اثر سینرژیسم آن با بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها

ریحانه شیرکوند<sup>۱</sup>، فاطمه نوربخش<sup>۲\*</sup>، سحر هنرمند جهرمی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

<sup>۲</sup>. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، ایران

### تاریخچه مقاله

|         |            |
|---------|------------|
| ارسال   | ۱۴۰۲/۲/۲۹  |
| بازنگری | ۱۴۰۳/۴/۱۹  |
| پذیرش   | ۱۴۰۳/۵/۸   |
| نماینه  | ۱۴۰۳/۱۰/۱۰ |

### کلامت کلیدی

فعالیت ضد میکروبی  
باکتریوسین  
باکتری‌های لاکتیک  
بتالاکتاماز  
آنتی‌بیوتیک

### \* نویسنده مسؤول

niloofar\_noorbakhsh@yahoo.com

**مقدمه:** هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های لاکتیک علیه باکتری‌های تولید کننده بتالاکتاماز و ارزیابی اثر سینرژیسم آن با آنتی‌بیوتیک‌ها بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، باکتریوسین جداسازی شد و سپس اثر باکتریوسین تولیدی علیه باکتری‌های بیماری‌زای اش‌ریشیا کلی، اسینتوباکتر بومانی و سودوموناس آئروژینوزا به روش رقت‌های متوالی بررسی شد. اثربخشی باکتریوسین به تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری بر روی این ۳ گروه باکتری بیماری‌زا با استفاده از روش انتشار دیسک در سه تکرار تعیین شد.

**نتایج:** نتایج نشان داد تمامی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا و سویه‌های اسینتوباکتر بومانی نیمی از سویه‌های اش‌ریشیا کلی جدا شده از ادرار در این مطالعه، بتالاکتاماز مثبت بودند. سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا فعالیت سینرژیسمی باکتریوسین- آنتی‌بیوتیک برای سفنازیدیم، لووفلوکساسین، پپیراسیلین و سویه‌های اسینتوباکتر بومانی برای تتراسایکلین، جنتامایسین، سفنازیدیم نشان دادند. همچنین در اش‌ریشیا کلی اثر سینرژیسم در مورد آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و سیپروفلوکساسین مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** باکتریوسین لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به همراه برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها اثر سینرژیسم در سویه‌های تولید کننده بتالاکتاماز سودوموناس آئروژینوزا، اسینتوباکتر بومانی و اش‌ریشیا کلی نشان دادند.

شیوه آدرس دهی این مقاله: شیرکوند، ر، نوربخش، ف، هنرمند جهرمی، س. فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های لاکتیک اسید علیه باکتری‌های تولید کننده بتالاکتاماز و ارزیابی اثر سینرژیسم آن با بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها. مجله دانش زیستی ایران. ۱۸:۱۴۰۲ (۴): ۴۳-۵۶

نویسندگان: حق مؤلف ©

شاپا الکترونیک: ۴۵۹-۲۷۱۷

شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۳۶

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

## مقدمه

در این میان دو جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس جزو فلور طبیعی دستگاه گوارش و غذاهای تخمیری بوده و گزینه‌های خوبی به عنوان پروبیوتیک محسوب می‌شوند (۵). از جمله اثرات مفید پروبیوتیک‌ها می‌توان به تحریک سیستم ایمنی، تعدیل هموستازی ایمنی سیستمیک، خاصیت ضد توموری، اصلاح عدم تحمل لاکتوز، بهبود هضم و حرکت غذا در روده، پیشگیری از آلرژی غذایی، باز گرداندن تعادل میکروبی روده (میکروفلور روده) بعد از مصرف آنتی بیوتیک‌ها و مهار پاتوژن‌های روده اشاره کرد (۶). باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند به عنوان میکروارگانیسم‌های صنعتی برای استفاده در سنتز بهتر مواد شیمیایی، دارویی و سایر محصولات مفید انسانی با موفقیت به کار گرفته شوند، چرا که آنها مزیت‌های زیادی در تخمیر صنعتی دارند (۷).

باکتریوسین‌ها به پپتیدها، پروتئین‌ها یا کمپلکس پروتئینی ضد میکروبی اطلاق می‌گردد که علیه باکتری‌های نزدیک از نظر خویشاوندی، با هدف باکتری‌کشی و یا توقف رشد تولید می‌شوند. این پپتیدها جذب گیرنده‌های ویژه‌ی سطحی سلول‌های حساس به باکتریوسین شده و اهداف خود را با نفوذپذیر کردن غشا و تخریب اسیدهای نوکلئیک آنها از بین می‌برند (۸). تولید باکتریوسین‌ها معیار مهمی در انتخاب سویه‌های باکتری‌های پروبیوتیک در نظر گرفته شده و یکی از صفات پروبیوتیک‌ها محسوب می‌شود. تحقیقات نشان داده تولید باکتریوسین توسط باکتری‌های پروبیوتیک بر توانایی رقابت پروبیوتیک‌ها با باکتری‌های روده و در نهایت بر سلامتی میزبان خود تأثیر مثبتی داشته است (۹). مکانیسم‌های اثر متفاوت و متعددی برای باکتریوسین‌ها گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به ایجاد تغییر در فعالیت آنزیمی، مهار جوانه‌زنی اسپور و غیرفعال کردن حامل‌های آنیونی از طریق ایجاد منافذ اختصاصی و غیراختصاصی در غشا، اشاره کرد (۱۰). آنتی بیوتیک‌ها

آنتی بیوتیک‌ها نقش مهمی در درمان بیماری‌های عفونی دارند، اما استفاده بیش از حد آنها منجر به شیوع و گسترده‌ی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جهان شده است. این مساله امروزه به عنوان یکی از مهمترین چالش‌های بهداشتی و درمانی مطرح شده است. امروزه ایجاد مقاومت‌های دارویی در باکتری‌های بیماریزا نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها، نقشی مهم و اساسی در عدم کنترل و درمان عفونت‌های باکتریایی دارند و به عنوان یک نگرانی عمده در جوامع بشری مطرح می‌باشند (۱). آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام آنتی بیوتیک‌هایی هستند که دارای یک حلقه بتالاکتام در ساختار شیمیایی خود هستند. بیشتر آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام با مهار بیوستنز دیواره سلولی در ارگانیسم باکتریایی کار می‌کنند و پرمصرف‌ترین گروه آنتی بیوتیک‌ها هستند (۳، ۲). بتالاکتام‌ها آنزیم‌های باکتریایی هستند که آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام نظیر پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها را با هیدرولیز کردن حلقه بتالاکتام غیر فعال می‌کنند. یکی از مشکل‌سازترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در رابطه با تولید بتالاکتام‌ها می‌باشد. تاکنون بیش از ۴۰۰ نوع مختلف بتالاکتام‌ها در نمونه‌های بالینی تعریف شده‌اند و به علت مصرف زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها بطور مداوم جهش می‌یابند که منجر به گسترش و توسعه بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف می‌شوند (۴).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با قرار گرفتن در محیط روده تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آنها اصلاح کرده و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌شوند. اکثر پروبیوتیک‌ها در استفاده روزمره شامل گونه‌های اسید لاکتیک (LAB) از جمله لاکتوباسیل، انتروکوک، بیفیدوباکترها، *E.coli* های غیر بیماری‌زا و مخمرهای ساکارومایسز بولاردی می‌باشند. از میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان مهم‌ترین گروه شناخته شده هستند که



ساخته می‌شوند. باکتریوسین‌ها بر روی سلول‌های یوکاریوتی بی‌اثر می‌باشند ولی آنتی بیوتیک‌ها اثرات گسترده و متفاوتی حتی بر روی یوکاریوت‌ها دارند (۱۱). بنابراین هدف از بررسی حاضر بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس علیه باکتری‌های تولید کننده بتالاکتاماز و ارزیابی اثر سینرژیسم آن با بعضی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد.

مواد شیمیایی (اعم از پپتیدی یا غیر پپتیدی) هستند، که در بدن موجودات زنده مختلف از جمله حیوانات، میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و قارچ‌ها تولید می‌شوند، اثر ترجیحی به سویه‌های نزدیک مرتبط از خود نشان نمی‌دهند و طیف فعالیت گسترده‌تری دارند. علاوه بر این باکتریوسین‌ها به صورت ریبوزومی و طی فاز اولیه رشدی سنتز می‌شوند. اما آنتی بیوتیک‌ها معمولاً متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که توسط کمپلکس‌های آنزیمی چندگانه و بزرگ طی انواع فرایندهای سلولی

## مواد و روش‌ها

### جمع آوری نمونه

در این مطالعه ۳ نوع باکتری بیماری زا /شریشیالکی، /سینتوباکتر بومانی و /سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های ادارار ۸۵ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان میلاد تهران مورد بررسی قرار گرفت.

### جداسازی باکتری‌های پاتوژن

جهت تایید وجود باکتری‌های بیماری زا در نمونه‌های عفونت ادراری از محیط کشت بلاد آگار (Merck, Germany) و آئوزین متیلن بلو (Merck, Germany) استفاده شد. از کلونی‌ها رنگ آمیزی گرم انجام شد. باسیل‌های گرم منفی انتخاب و سپس تست‌های افتراقی باکتری‌های گرم منفی انجام شد. در محیط کشت‌های افتراقی (Merck, Germany) شامل (اندول، مک کانکی، آئوزین متیل بلو، سیمون سیترا، اوره آز، MR-VP، TSI، SIM، تخمیر قند، اسکولین براث و تست‌های کاتالاز و اکسیداز استفاده شد.

### تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی در باکتری‌ها

جهت انجام آنتی بیوگرام یا تست حساسیت میکروبی از روش دیسک دیفیوژن یا انتشار دیسک استفاده شد. نوع محیط کشت در اندازه هاله، عدم رشد و میزان نفوذ آنتی بیوتیک تاثیر بسزایی دارد. محیط مولر هینتون آگار به عنوان محیط انتخابی برای این آزمایش به کار رفت. تست تعیین حساسیت به روش دیسک دیفیوژن با آنتی

بیوتیک‌های تتراسایکلین ( $30\mu\text{g}$ )، سیپروفلوکساسین ( $5\mu\text{g}$ )، نیتروفورانتوئین ( $30\mu\text{g}$ )، آمیکاسین ( $30\mu\text{g}$ )، مروپنم ( $10\mu\text{g}$ )، لووفلوکساسین ( $5\mu\text{g}$ )، سفتازیدیم ( $30\mu\text{g}$ ) و کوتریموکسازول ( $25/1-75/23\mu\text{g}$ ) (شرکت پادتن طب) بر روی نمونه‌های جدا شده طبق استاندارد CLSI 2002 انجام گردید. از سویه /شریشیالکی استاندارد (ATCC 25922) به عنوان کنترل استفاده شد.

### کشت باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و جداسازی باکتریوسین

سویه‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از انیستیتوپاستور ایران خریداری شد. ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون لاکتوباسیلوس در ۵۰ میلی لیتر de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth کشت داده شد و در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۴ ساعت انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میلی لیتر MRS broth و ۱ درصد از کشت لاکتوباسیلوس در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از انکوباسیون، کشت لاکتوباسیل سانتریفیوژ شد. مایع رویی بدون سلول در اوپراتور خلاء چرخشی تغلیظ شد. سولفات آمونیوم در دمای ۴ درجه سانتی گراد با هم زدن تا ۷۰ درصد اشباع اضافه شد و سپس سانتریفیوژ انجام شد، رسوب جمع آوری و در

آب مقطر در لوله سانتریفیوژ معلق شد (۱۲).

#### تعیین فعالیت باکتریوسینی با استفاده از تست MIC

مطالعه MIC، به روش میکروداپولیشن براث انجام شد. به تمام چاهک‌های مورد نیاز میکروپلیت ۹۶ خانه ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث اضافه شد. سپس غلظت‌های مختلفی از باکتریوسین (۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵، ۷/۸۱۲۵، ۳/۹۰، ۱/۹۵، ۰/۹۷، ۰/۴۸۸ و ۰/۲۴۴ میلی گرم بر میلی لیتر) در چاهک‌ها به روش سریال دایولیشن تهیه شد. در انتها به چاهک‌ها ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری ایزوله شده با غلظت نیم مک فارلند اضافه شد. جهت صحت انجام آزمون از چاهک‌های کنترل مثبت (محیط کشت و باکتری) و کنترل منفی (محیط کشت، باکتریوسین) نیز استفاده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از گذشت این مدت چاهک‌ها از نظر رشد و عدم رشد باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. کمترین غلظت از ماده که مانع رشد میکروارگانیسم بود به عنوان غلظت MIC گزارش شد.

#### جداسازی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم بتالاکتاماز

##### بررسی سویه‌های MBL (روش استفاده شده برای

##### سودوموناس و اسینتوباکتر بومانی)

برای این منظور از سویه مورد نظر سوسپانسیونی با کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد سپس بر روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. در ادامه جهت بررسی تولید آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز از یک دیسک مروپنم و یک دیسک مروپنم آغشته (۲۰ میکرولیتر) به ۰.۵M محلول EDTA استفاده شد. دیسک‌ها با فاصله تقریباً ۲۰ میلی متر از یکدیگر بر روی سطح آگار قرار داده شد. سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه و بعد از این مدت قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شد. در صورتی که قطر هاله دیسک مروپنم همراه با EDTA، ۵ میلی متر بیشتر از دیسک مروپنم به تنهایی باشد نشان از تولید

این آنزیم می باشد.

#### بررسی سویه‌های ESBLs (روش استفاده شده برای

##### اشریشیاکلی)

از سویه مورد نظر سوسپانسیونی با کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد و بر روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس جهت شناسایی سویه‌های ESBLs از دیسک‌های استاندارد شرکت پادتن طب (ساخت ایران) استفاده گردید. طبق دستور شرکت سازنده از دیسک‌های سفتازیدیم و سفتازیدیم کلونیک اسید همچنین سفوتاکسیم و سفوتاکسیم کلونیک اسید به فاصله ۲۰ میلی متر از یکدیگر بر روی سطح آگار استفاده شد. سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه و بعد از این مدت قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری گردید.

در صورتی که قطر هاله دیسک‌های همراه با کلونیک ۵ میلی متر بیشتر از دیسک‌های به تنهایی باشد نشان از تولید این آنزیم می باشد.

#### بررسی اثر سینرژیسیم باکتریوسین و آنتی بیوتیک‌ها بر

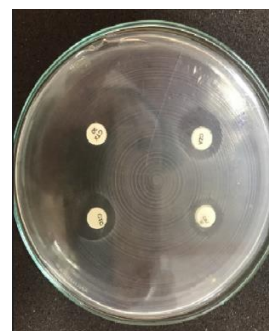
##### باکتری‌های بتالاکتاماز مثبت

اثر بخشی باکتریوسین لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ترکیب با آنتی بیوتیک‌های تجاری در برابر پاتوژن‌های بالینی تولید کننده بتالاکتاماز با استفاده از روش انتشار دیسک در سه تکرار تعیین شد. برای بررسی اثر ترکیبی باکتریوسین و آنتی بیوتیک‌ها، ۲۰ میلی لیتر (۲ میلی گرم) از باکتریوسین به دیسک استاندارد آنتی بیوتیکی اضافه شد و سپس دیسک‌ها روی پلیت‌های مولر هینتون آگار تلقیح شده با ارگانیسم‌های مورد آزمایش قرار داده شد. برای کنترل مثبت از دیسک‌های آنتی بیوتیک استاندارد استفاده شد. پلیت‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و مناطق مهار ثبت شد. افزایش سطح برابری برای آنتی بیوتیک‌ها با فرمول  $(b^2 - a^2) / a^2$  محاسبه شد، که در آن a و b به ترتیب منطقه مهار آنتی بیوتیک به تنهایی و آنتی بیوتیک در ترکیب با باکتریوسین هستند (۱۳).

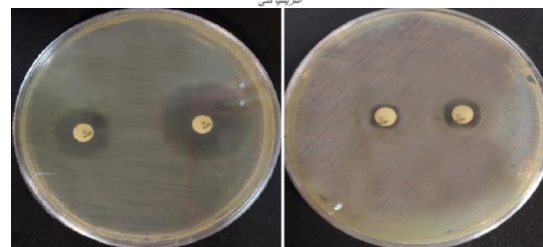
## نتایج

## شناسایی باکتری های پاتوژن از نمونه ادرار

از نمونه های ادرار بیماران سویه های اشریشیا کلی، اسینتوباکتر بومانی و سودوموناس آئروژینوزا جدا شد و تعداد ۱۰ سویه از هر نمونه برای مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. تمامی سویه های اسینتوباکتر بومانی، سودوموناس آئروژینوزا در بین جدایه های بیماری زا، فعالیت بتالاکتاماز مثبت را نشان دادند. در همین حال، تنها پنج مورد از سویه های اشریشیا کلی شواهدی از فعالیت مثبت بتالاکتاماز را نشان دادند. نتایج آزمایشات بتالاکتاماز سویه های بیماری زا در شکل ۱ نشان داده شده است.



اشریشیا کلی



اسینتوباکتر بومانی

سودوموناس آئروژینوزا

شکل ۱: نتایج سویه های بتالاکتاماز مثبت در باکتری های پاتوژن (اشریشیا کلی، اسینتوباکتر بومانی، سودوموناس آئروژینوزا)

## نتایج تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۰ سویه سودوموناس

آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک های رایج بررسی شد. مقاومت ۱۰۰ درصدی آنتی بیوتیکی نسبت به سیپروفلوکساسین، لووفلوکساسین و مروپنم در همه سویه های سودوموناس مورد بررسی مشاهده شد. سپس به ترتیب، مقاومت آنتی بیوتیکی به آمیکاسین ۹۰٪ (۹ سویه)، جنتامیسین ۹۰٪ (۹ سویه)، پپراسیلین ۹۰٪ (۹ سویه) و سفتازیدیم ۸۰٪ (۸ سویه) مشاهده شد. درحالی که نتایج این مطالعه نشان داد ۹۰ درصد (۹ سویه) نسبت به کولیسیتین حساس بودند.

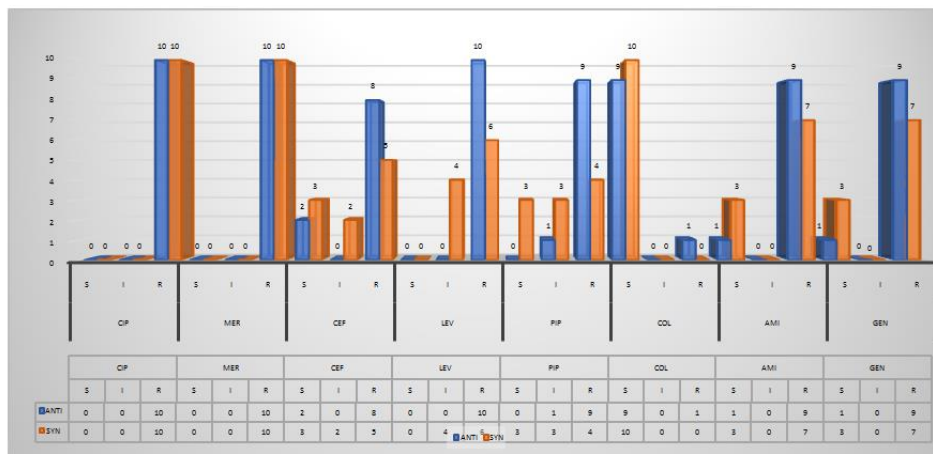
## نتایج حاصل از MIC باکتریوسین

در باکتری سودوموناس آئروژینوزا ۸۰ درصد سویه ها دارای MIC:25mg و ۲۰ درصد سویه ها دارای MIC:50 mg هستند.

## اثر سینرژیسمی آنتی بیوتیک و باکتریوسین

مقاومت ۱۰۰ درصدی در حالت سینرژیسمی نسبت به سیپروفلوکساسین و مروپنم در همه سویه های سودوموناس مورد بررسی مشاهده شد. سپس به ترتیب، مقاومت در حالت سینرژیسمی به لووفلوکساسین ۶۰٪ (۶ سویه)، آمیکاسین ۷۰٪ (۷ سویه)، جنتامیسین ۷۰٪ (۷ سویه)، پپراسیلین ۴۰٪ (۴ سویه) و سفتازیدیم ۵۰٪ (۵ سویه) مشاهده شد (نمودار ۱).

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد مقاومت در حالت آنتی بیوتیکی و سینرژیسمی نسبت به سفتازیدیم ( $p=0.049$ )، لووفلوکساسین ( $p=0.038$ )، پپراسیلین ( $p=0.036$ ) دارای تفاوت آماری معنی داری در سطح آماری  $P<0.05$  درصد می باشد.



نمودار ۱: نمودار مقایسه توزیع فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی و سینرژیسمی در سویه های سودوموناس آئروژینوزا

کوتریموکسازول (TRI/MEX)، سپروفلوکساسین (CIP) و مروپنم (MER) در همه سویه های اسپنتوباکتر بومانی مورد بررسی مشاهده شد. سپس به ترتیب، مقاومت در حالت سینرژیسمی به پیراسیلین ۷۰٪ (۷ سویه)، سفنازیدیم ۶۰٪ (۶ سویه)، جنتامیسین ۵۰٪ (۵ سویه) و تتراسایکلین ۲۰٪ (۲ سویه) و آمپی سیلین / سولباکتام ۱۰٪ (۱ سویه) مشاهده شد. درحالی که نتایج این مطالعه نشان داد هیچگونه مقاومت در حالت سینرژیسمی نسبت به کولیسیتین در سویه های اسپنتوباکتر بومانی مورد بررسی مشاهده نشد (نمودار ۲).

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد مقاومت در حالت آنتی بیوتیکی و سینرژیسمی نسبت به تتراسایکلین ( $p=0.044$ )، جنتامیسین ( $p=0.041$ )، سفنازیدیم ( $p=0.048$ ) دارای تفاوت آماری معنی داری در سطح آماری  $P<0.05$  می باشد.

### نتایج تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی اسپنتوباکتری بومانی

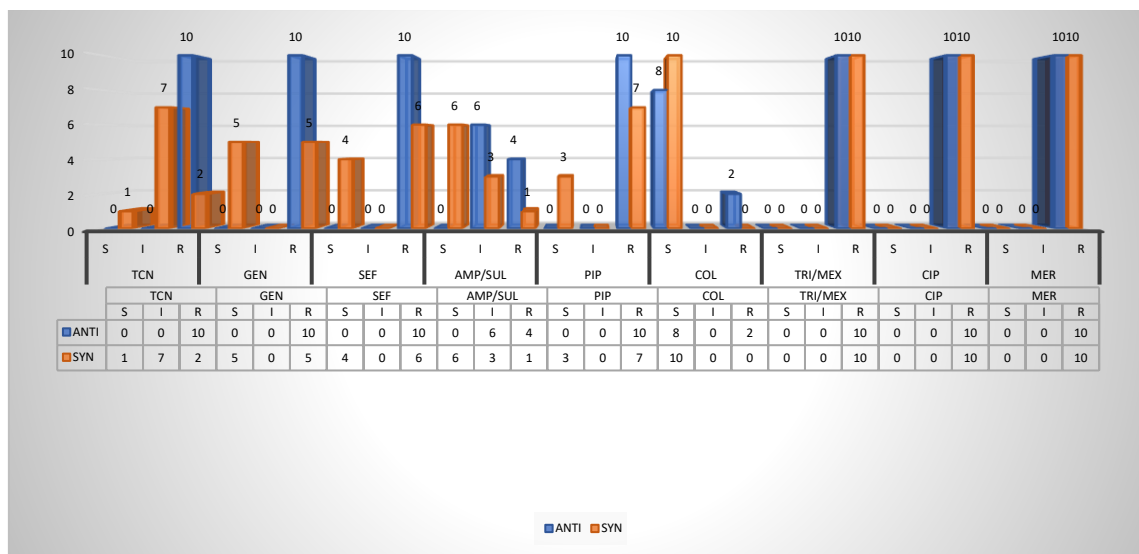
الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۰ سویه های اسپنتوباکتر بومانی نسبت به آنتی بیوتیک های رایج بررسی شد مقاومت ۱۰۰ درصدی نسبت به کوتریموکسازول، سپروفلوکساسین، مروپنم، پیراسیلین ۱۰۰٪ (۱۰ سویه)، سفنازیدیم ۱۰۰٪ (۱۰ سویه)، جنتامیسین ۱۰۰٪ (۱۰ سویه) و تتراسایکلین ۱۰۰٪ (۱۰ سویه) مشاهده شد. نسبت به آمپی سیلین / سولباکتام ۴۰٪ (۴ سویه) مقاوم بودند و به آنتی بیوتیک کولیسیتین ۲۰٪ (۲ سویه) مقاوم بودند (نمودار ۲).

### نتایج حاصل از MIC باکتریوسین

در باکتری اسپنتوباکتر بومانی ۱۰۰ درصد سویه ها دارای MIC:25 mg بودند.

### اثر سینرژیسمی آنتی بیوتیک و باکتریوسین در اسپنتوباکتر بومانی

مقاومت ۱۰۰ درصدی در حالت سینرژیسمی نسبت به



نمودار ۲: نمودار مقایسه توزیع فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی و سینرژیسمی در سویه های اسپنتوباکتر بومانی

سینرژیسمی بررسی شد. مقاومت ۹۰ درصدی در حالت سینرژیسمی نسبت به کانامایسین و سیپروفلوکساسین در همه سویه های اشیشیا کلی مورد بررسی مشاهده شد. سپس به ترتیب، مقاومت در حالت سینرژیسمی به جنتامایسین و توبرامایسین ۶۰٪ (۶ سویه) و در آمیکاسین، تتراسایکلین و مروپنم ۵۰٪ (۵ سویه) مشاهده شد. درحالیکه نتایج این مطالعه نشان داد هیچگونه مقاومت در حالت سینرژیسمی نسبت به نیتروفورانتوئین (۱۰ سویه) در سویه های اشیشیا کلی مورد بررسی مشاهده نشد (نمودار ۳).

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد هیچگونه تفاوت معنی داری در مقاومت آنتی بیوتیکی و سینرژیسمی بین آنتی بیوتیک های مشاهده شده مشاهده نشد.

#### نتایج حاصل از MIC باکتریوسین

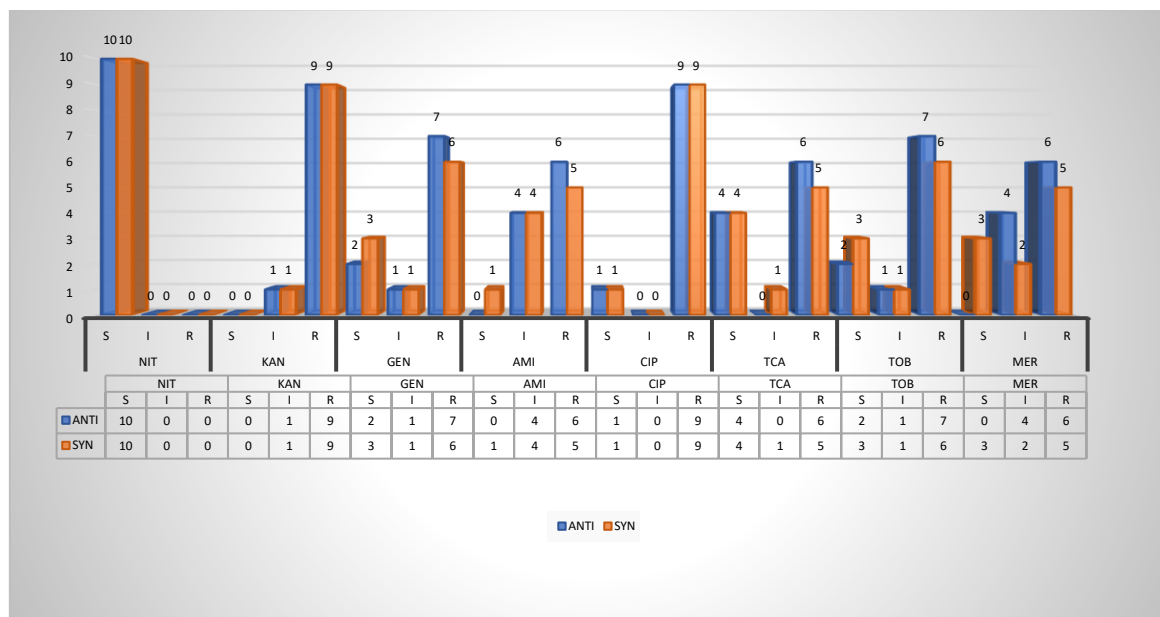
در باکتری اشیشیا کلی ۱۰۰٪ سویه ها دارای MIC:50 mg هستند.

#### نتایج تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی در اشیشیا کلی

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۰ سویه های اشیشیا کلی نسبت به آنتی بیوتیک های رایج بررسی شد. مقاومت ۹۰ درصدی آنتی بیوتیکی نسبت به کانامایسین و سیپروفلوکساسین در همه سویه های اشیشیا کلی مورد بررسی مشاهده شد. سپس به ترتیب، مقاومت آنتی بیوتیکی به جنتامایسین و توبرامایسین ۷۰٪ (۷ سویه) و در آمیکاسین، تتراسایکلین و مروپنوم ۶۰٪ (۶ سویه) مشاهده شد. درحالیکه نتایج این مطالعه نشان داد هیچگونه مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به نیتروفورانتوئین (۱۰ سویه) در سویه های اشیشیا کلی مورد بررسی مشاهده نشد.

#### اثر سینرژیسمی آنتی بیوتیک و باکتریوسین در اشیشیا کلی

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۰ سویه های اشیشیا کلی نسبت به آنتی بیوتیک های رایج با باکتریوسین بصورت



نمودار ۳: نمودار مقایسه توزیع فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی و سینرژسمی در در سویه های/شریشیا کلی

## بحث

بتالاکتامازی بودند.

نتایج سینرژسمی باکتریوسین- آنتی بیوتیک در سویه های سودوموناس نسبت به مقاومت آنتی بیوتیکی به تنهایی در لووفلوکساسین ۴۰٪، آمیکاسین و جنتامیسین ۲۰٪، پپراسیلین ۵۰٪ و سفنازیدیم ۳۰٪ کاهش نشان داد، این نتایج برای سفنازیدیم ( $p=0.049$ ), لووفلوکساسین ( $p=0.038$ ), پپراسیلین ( $p=0.036$ ) و همچنین در سویه های /اسینتوباکتریومانی نتایج سینرژسمی باکتریوسین- آنتی بیوتیک در نسبت به مقاومت آنتی بیوتیکی به تنهایی در پپراسیلین ۳۰٪، جنتامیسین ۵۰٪، تتراسایکلین ۸۰٪، آمپی سیلین- سالباکتام ۳۰٪ و سفنازیدیم ۴۰٪ کاهش نشان داد برای تتراسایکلین ( $p=0.044$ ), جنتامیسین ( $p=0.041$ ), سفنازیدیم ( $p=0.048$ ) به دست آمد.

گروه لوپز در مطالعه خود، سویه های انتروکوک جدا شده از عفونت های ادراری را ایزوله کردند، که نشان می دهد اکثریت *E. faecalis* بودند حساسیت آنها در برابر باکتریوسین حاصل از گونه لاکتوباسیلوس با نام AS-48 و چندین آنتی بیوتیک مورد آزمایش قرار گرفت.

امروزه شاهد روز افزون مقاومت های باکتریایی و عفونت های ناشی از آنها در جهان هستیم. این مسئله یکی از بحران های موجود در درمان عفونت های ناشی از این باکتری هاست. انتقال و انتشار سریع ارگانیسم هایی که قادر به تولید آنزیم های مذکورند، باعث بالا رفتن میزان عفونت های بیمارستانی در سراسر دنیا شده است. مقاومت میکروبی در برابر عوامل ضد میکروبی مختلف به طور فزاینده ای گزارش می شود و به طور خطرناکی گزینه های درمانی موجود را محدود می کند. در این زمینه، کارهای تحقیقاتی متعددی به بررسی منابع طبیعی با هدف بازیابی آنتی بیوتیک های جدید یا رویکرد درمانی جایگزین می پردازد. در نتیجه، باکتریوسین ها به دلیل فعالیت ضد میکروبی بالقوه توجه محققان را به خود جلب کردند (۱۴).

نتایج نشان داد تمامی سویه های باکتری سودوموناس آثروژینوزا، اسینتوباکتریومانی و شریشیا کلی، بتالاکتاماز مثبت بودند و بعد از استفاده کردن از باکتریوسین به عنوان مهار کننده ی فعالیت بتالاکتامازی سویه ها تأثیری مشاهده نشد و همچنان سویه ها دارای فعالیت

کند که اجازه نشت متابولیت های داخل سلولی و اتلاف پتانسیل غشا و با اختلال در بیوسنتز دیواره سلولی از طریق اتصال به لیپید II را می دهد (۱۷). با این حال، باکتری های گرم منفی توسط یک غشای خارجی (OM) متشکل از دولایه فسفولیپیدی پوشیده شده اند، که توسط شبکه ای از لیپیدها و پلی ساکاریدها به نام لیپوپلی ساکاریدها احاطه شده است. بنابراین، به دلیل سدی که OM ایجاد می کند، نایسین به تنهایی معمولاً در برابر باکتری های گرم منفی مؤثر نیست، نایسین قادر است فعالیت ضد میکروبی خود را بر علیه سالمونلا در حضور بتالاکتام های معمولی (آمپی سیلین، سفتریاکسون و سفوتاکسیم) در غلظت های بسیار پایین تر اعمال کند. این نتایج این فرضیه را تقویت می کند که بتا-لاکتام ها و نایسین با افزایش نفوذ نایسین در سراسر OM باکتریایی و با ناکارآمد ساختن پمپ های خروج دارو، در نتیجه تجمع سلولی دارو را با تغییر نفوذپذیری سلول افزایش می دهند که منجر به فروپاشی پتانسیل غشاء و ایجاد جریان سریع مواد موجود در محیط سیتوزولی می شود (۱۸). همچنین گزارش شده است که بتا-لاکتام ها باعث تشکیل رادیکال هیدروکسیل و سوپراکسید می شوند که به DNA، لیپیدها و پروتئین ها آسیب می رساند. این ممکن است به این واقعیت نسبت داده شود که افزایش هجوم آنتی بیوتیک ها به دلیل تشکیل منافذ توسط نایسین باعث مهار سریعتر می شود (۱۶).

این تحقیق نیز با مطالعه حاضر در کلیت خود نتایج یکسانی به دست آورده اند. باکتریوسین لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به اندازه نایسین قوی نیست ولی بنظر می رسد با عملکرد یکسان با اثر بر غشا سلولی و تخریب یا ایجاد منفذ موجب ورود آنتی بیوتیک ها در سلول باکتری می شوند که می توانند بر عملکرد سلول باکتری اثر بگذارند. در مطالعه حاضر در حالت سینرژسمی میزان مقاومت اسپنتوباکتر بومانی به تتراسایکلین ۸۰٪ و جنتامایسین ۵۰٪ و در سودوموناس آئروژینوزا ۴۰٪ کاهش یافته به طوری که تتراسایکلین و جنتامایسین

AS-48 یک باکتریوسین قوی بود که با تشکیل منافذ در غشای سلولی باعث مرگ باکتری می شود. AS-48 در غلظت های زیر ۱۰ میلی گرم در لیتر حتی در برابر سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک فعال بود، در حالی که این سویه ها به حداقل ۷ آنتی بیوتیک از ۲۰ آنتی بیوتیک آزمایش شده مقاومت نشان دادند. همانطور که انتظار می رفت، نتایج نشان داد که فعالیت AS-48 مستقل از مقاومت به آنتی بیوتیک ها است. مشابه سایر باکتریوسین ها، داده های موجود نشان دهنده هم افزایی AS-48 است که با سایر ترکیبات ضد میکروبی (مانند اتامبوتول، نایسین یا لیزوزیم) ترکیب می شود، که منجر به کاهش MIC هر دو ترکیب می شود. مطالعات پیشنهاد می کنند، AS-48 غشای باکتری را نفوذپذیر می کند و موجب دسترسی جنتامایسین به سیتوپلاسم می گردد (۱۵).

از لحاظ مقایسه ای این دو مطالعه در مجموع با یکدیگر نتایج مشابهی دادند. یکی از مسیرهای احتمالی که برای باکتریوسین ها در نظر گرفته می شود اثر آنها بر روی دیواره است و می توانند میزان ورود آنتی بیوتیک را در سلول زیاد کنند تا اثر بخش باشند. اما در مطالعه ما این اثر سینرژسمی تقریباً در بعضی موارد مشاهده شد که می توان احتمال داد باکتریوسین حاصل از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تا حدی به همراه آنتی بیوتیک های مؤثر در سنتز دیواره سلولی (پپراسیلین، سفتازیدیم، آمپی سیلین) و آنتی بیوتیک مؤثر در غشا سیتوپلاسمی (کلیستین) اثر سینرژسمی دارد.

گروه ریشی (Rishi) در مطالعه خود بیان کرد که باکتریوسین نایسین پتانسیل این را دارد که در برابر آنتی بیوتیک های بتا-لاکتام در ارتباط با بیماری سالمونلوز موشی عملکرد مؤثری داشته باشد. به خصوص، ترکیبات نایسین- سفتریاکسون و نایسین- سفوتاکسیم فعالیت هم افزایی عالی را نشان دادند. البته قابل ذکر است در حالت اثر منفرد هر کدام، اثربخشی هر کدام معنادار نبوده است (۱۶). نایسین عمدتاً با نفوذ به غشای سیتوپلاسمی با تشکیل منافذ گذرا عمل می



آنتی بیوتیک های موثر بر سنتز پروتئین می باشند و لووفلوکسازین موثر بر آنزیم DNA ژیراز در سنتز اسیدهای نوکلئیک می باشد. در نتیجه باکتریوسین به همراه آنتی بیوتیک ها بر سنتز بخش های مختلف باکتری های موثر بوده و در نتیجه موجب از بین رفتن باکتری ها می گردند.

گروه گرازیا (Grazia) در مطالعه خود از یک باکتریوسین (BLIS) از باکتری *Streptococcus macedonicus* استفاده کرد. رشد میکروکوکوس لوتتوس، استرپتوکوک پیوژنز، لاکتوکوکوس لاکتیس و لاکونوستوک مزانترئیدها توسط BLIS مهار شد. فعالیت هم افزایی بالقوه علیه برخی گونه های گرم مثبت (اما نه گرم منفی) در استفاده همزمان با آنتی بیوتیک ها (آمپی سیلین، تتراسایکلین یا کانامایسین) مشاهده شد. ترکیب برخی از فراکسیون های فعال BLIS با آنتی بیوتیک ها (آمپی سیلین، تتراسایکلین یا کانامایسین) می تواند فعالیت های هم افزایی را علیه گونه های گرم مثبت خاصی نشان دهد که این اثر در حالت منفرد مشاهده نشده بود (۱۹). گروه بیسواس (Biswas) در مجموع ۸۴ ایزوله از باکتری های اسید لاکتیک برای اثر ضد باکتریایی آنها در برابر استرپتوکوک پیوژنز، انتروکوکوس فکالیس، اشیشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه و باسیلوس سرئوس و همچنین در برابر پاتوژن های بالینی حامل ژن های بتا-لاکتاماز مانند، SHIM, SHVBblaCT, SHVBblaCT, SHIMP, SHVBLACT و blaNDM غربالگری کردند. فعالیت سینرژستیک باکتریوسین ها در ترکیب با آنتی بیوتیک ها یعنی سفوتاکسیم، پلی میکسین B، ایمی پنم و تایگی سیکلین تعیین شد. باکتریوسین های خالص شده از لاکتوباسیلوس، پدیوکوکوس و انتروکوک از رشد پاتوژن های بالینی دارای بتالاکتاماز جلوگیری می کنند که در مقایسه با آنتی بیوتیک ها به تنهایی، به طور قابل توجهی مهار بیشتری دارند (۲۰).

گروه سینق (Aman Preet Singh) یک مطالعه به منظور ارزیابی اثرات هم افزایی، در صورت وجود، نایسین در ترکیب با آنتی بیوتیک های معمولی ضد سالمونلا علیه

سرووار سالمونلا انتریکا طراحی کرد. طبق نتایج مشاهده شد که ترکیبات نایسین-آمپی سیلین و نایسین-EDTA دارای اثرات افزایشی هستند، در حالی که ترکیبات نایسین-سفتریاکسون و نایسین-سفوتاکسیم به شدت در برابر سرووار تیفی موریوم هم افزایی دارند. این مطالعه نشان می دهد که نایسین پتانسیل این را دارد که در ارتباط با آنتی بیوتیک های معمولی در MIC های بسیار پایین تر عمل کند. به نظر می رسد این مشاهدات قابل توجه هستند، زیرا کاهش غلظت درمانی آنتی بیوتیک ها ممکن است یک استراتژی ارزشمند برای جلوگیری/کاهش توسعه مقاومت آنتی بیوتیکی در حال ظهور باشد. قابل ذکر است نایسین ممکن است پمپ های خروج دارو را بی اثر کند، در نتیجه با تغییر نفوذپذیری سلول، تجمع داروی سلولی را افزایش می دهد، که منجر به فروپاشی پتانسیل غشاء و ایجاد جریان سریع مواد موجود در محیط سیتوزولی می شود. این مکانیسم ها ممکن است به طور متقابل عمل کرده و منجر به افزایش اثر ضد سالمونلا شود که توسط شاخص FIC و سنجش زمان کشنده در مطالعه سینق مشاهده شده است (۲۱).

همچنین مطالعات دیگری وجود دارد که به مکانیسم اثر باکتریوسین و آنتی بیوتیک ها پرداختند. آنتی بیوتیک هایی که بیوسنتز دیواره سلولی را هدف قرار می دهند شامل آنهایی هستند که در گروه بتالاکتام قرار دارند. کاهش اخیر در اثربخشی بتا-لاکتام در برابر عفونت های شایع بیمارستانی، نیاز به جایگزین های مناسب را بوجود آورده است. پاتوژن ها آنزیم های تجزیه کننده بتا-لاکتام مانند کارباپنمازها و پنی سیلینازها را توسعه داده اند. در پرتو این روند، پتانسیل زیادی برای ادغام باکتریوسین ها، به ویژه لانتی بیوتیک ها، در درمان های جدید وجود دارد. علی رغم این پتانسیل، شیوع مقاومت به لانتی بیوتیک زمانی که ارگاناسم ها برای مدت طولانی در معرض سطوح تحت مهار لانتی بیوتیک ها قرار می گیرند، می تواند افزایش یابد. دیواره سلولی به طور گسترده ای به عنوان یک هدف عالی برای توسعه

در مجموع می‌توان گفت استفاده از باکتریوسین‌ها به عنوان یک عامل دارویی در برابر بیماری‌های انسانی هنوز در مرحله تحقیق و توسعه است، اما در حال حاضر به صورت تجاری برای نگهداری مواد غذایی و به عنوان یک پروبیوتیک استفاده می‌شود (۲۴).

فناوری‌های جدید در نظر گرفته می‌شود، زیرا سنتز آن در بین پاتوژن‌ها بسیار حفاظت شده است و در سلول‌های پستانداران وجود ندارد. علاوه بر این، دیواره سلولی برای بقای کلی باکتری بسیار مهم است زیرا یکپارچگی و مورفولوژی سلولی را تنظیم می‌کند (۲۳). (۲۲)

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان بیان کرد، باکتریوسین لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به تنهایی اثر ضد میکروبی محدودی ایجاد می‌کند ولی در مواردی اثر سینرژیستی به همراه آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده است. نتایج سینرژیستی این مطالعه در سویه‌های سودوموناس برای سفتازیدیم، لووفلوکساسین، پیراسیلین و در سویه‌های اسینتوباکتر بومانی برای تتراسایکلین، جنتامایسین، سفتازیدیم تفاوت آماری معنی داری به دست آمد. با این حال مطالعه حاضر تنها اثر ضد میکروبی آنتی‌بیوتیک و باکتریوسین لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را سنجیده است و باکتریوسین سایر باکتری‌های اسید لاکتیک مورد بررسی قرار نگرفته است. این پژوهش پیشنهاد می‌کند مطالعات بیشتری برای درک مکانیزم دقیق انجام شود تا مسیرهای بلوکه کننده را بتوان برطرف کرد.

### تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی واحد ورامین پیشوا تشکر می‌شود.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند هیچ تعارض منافی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

## Reference

1. Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: an overview. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2016;6 (8).
2. Elander RP. Industrial production of beta-lactam antibiotics. Appl Microbiol Biotechnol. 2003;61(5-6):385-92.
3. Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. IMA Fungus. 2011;2(1):87-95.
4. Tamma PD, Doi Y, Bonomo RA, Johnson JK, Simner PJ, RA ARLGTPDYB. A primer on AmpC  $\beta$ -lactamases: necessary knowledge for an increasingly multidrug-resistant world. Clinical Infectious Diseases. 2019;69(8):1446-55.
5. de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Júnior AIM, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. Biotechnology advances. 2018;36(8):2060-76.
6. Cremon C, Barbaro MR, Ventura M, Barbara G. Pre-and probiotic overview. Current opinion in pharmacology. 2018;43:87-92.
7. Telhig S, Ben Said L, Zirah S, Fliss I, Rebuffat S. Bacteriocins to thwart bacterial resistance in gram negative bacteria. Frontiers in microbiology. 2020;11:586433.
8. Molujin AM, Abbasiliasi S, Nurdin A, Lee P-C, Gansau JA, Jawan R. Bacteriocins as potential therapeutic approaches in the treatment of various cancers: A review of invitro studies. Cancers. 2022;14(19):4758.
9. Teame T, Wang A, Xie M, Zhang Z, Yang Y, Ding Q, et al. Paraprobiotics and postbiotics of probiotic *Lactobacilli*, their positive effects on the host and action mechanisms: A review. Frontiers in nutrition. 2020; 7:570344.
10. Kumariya R, Garsa AK, Rajput Y, Sood S, Akhtar N, Patel S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. Microbial pathogenesis. 2019;128:171-7.
11. Kashyap ML, Ganji S, Nakra NK, Kamanna VS. Niacin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): novel use for an old drug Journal of clinical lipidology. 2019;13(6):873-9.
12. Zamfir M, Callewaert R, Cornea PC, Savu L, Vatafu I, De Vuyst L. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. Journal of Applied Microbiology. 1999;87(6):923-31.
13. Birla S, Tiwari V, Gade A, Ingle A, Yadav A, Rai M. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Letters in Applied Microbiology. 2009;48(2):173-9.
14. Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. Cancer Drug Resistance. 2019;2(2):141-160.
15. Montalbán-López M, Cebrián R, Galera R, Mingorance L, Martín-Platero AM, Valdivia E, et al. Synergy of the Bacteriocin AS-48 and antibiotics against uropathogenic Enterococci. Antibiotics. 2020;9(9):567.
16. Rishi P, Preet Singh A, Garg N, Rishi M. Evaluation of nisin- $\beta$ -lactam antibiotics against clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhi. The Journal of antibiotics. 2014;67(12):807-11.
17. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? Nature Reviews Microbiology. 2013;11(2):95-105.
18. Gut IM, Blanke SR, Van Der Donk WA. Mechanism of inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by the lantibiotic nisin. ACS chemical biology. 2011;6(7):744-52.

19. Grazia SE, Sumayyah S, Haiti FS, Sahlan M, Heng NC, Malik A. Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) activity of *Streptococcus macedonicus* MBF10-2 and its synergistic action in combination with antibiotics. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2017;10(12):1140-5.
20. Biswas K, Upadhayay S, Rapsang GF, Joshi SR. Antibacterial and synergistic activity against  $\beta$ -Lactamase-producing nosocomial bacteria by bacteriocin of LAB isolated from lesser known traditionally fermented products of India. *HAYATI Journal of Biosciences*. 2017;24(2):87-95.
21. Singh AP, Prabha V, Rishi P. Value addition in the efficacy of conventional antibiotics by nisin against *Salmonella*. *PLoS One*. 2013;8(10):e76844.
22. Medeiros AA. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;24(Supplement\_1):S19-S45.
23. Ulvatne H, Karoliussen S, Stiberg T, Rekdaal Ø, Svendsen JS. Short antibacterial peptides and erythromycin act synergically against *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;48(2):203-8.
24. Ahmad V, Khan MS, Jamal QMS, Alzohairy MA, Al Karaawi MA, Siddiqui MU. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International journal of antimicrobial agents*. 2017;49(1):1-11.



## Scanning electron microscope analysis of untreated and electron beam irradiated wheat straw pre- and post-incubation in the rumen of sheep

Hosein Zadegi-Mirzaei<sup>1</sup>, Parvin Shawrang<sup>\*2</sup>, Farahnaz Motamedi Sedeh<sup>3</sup>, Mohammad Chamani<sup>4</sup>, Mehdi Aminafshar<sup>5</sup>

<sup>1</sup> PhD student, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Associate professor, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran

<sup>3</sup> Associate professor, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran

<sup>4</sup> Full professor, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Assistant professor, Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Place to Research:** Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Info

Abstract

### Article History:

Received 03.02.2024

Revised 05.12.2024

Accepted 05.16.2024

Online 12.30.2024

### Keywords:

Radiation

Electron Beam

Fibrolytic Bacteria

Digestibility

### \*Corresponding author:

shawrang@gmail.com;

pshawrang@aeoi.org.ir

**Introduction:** Increasing the rumen's fiber digestibility and the ruminants' total digestive tract is very important to improve the feed conversion ratio. One of the methods used for feed processing is electron beam irradiation. Increased fiber digestibility occurred in irradiated feeds, the cause of which is unknown, therefore it is necessary to evaluate the structural condition of fibrous materials pre- and post-processing and during incubation in the rumen with an electron microscope. The present study aimed to evaluate the effect of electron beam irradiation on the microscopic structure of wheat straw fibers, the relative abundance of fibrolytic bacteria, and the fiber digestibility in the total digestive tract of sheep.

**Materials and Methods:** The wheat straw sample was irradiated with electron beam power of 10 mega electron volts and electron beam current of 6 mA at doses of 250 and 500 kGy. The straw sample was transferred to bags and then inserted in the rumen for 12 hours, and the structure of the cell wall pre- and post-irradiation, as well as pre- and post-incubation in the rumen, was imaged and analyzed with a scanning electron microscope. The relative abundance of fibrolytic bacteria was evaluated by polymerase chain reaction and horizontal electrophoresis.

**Results:** The relative abundance of *Ruminococcus flavofaciens* and *Fibrobacter succinogenes* in the rumen content showed a significant increase ( $P < 0.05$ ) by irradiation. Irradiation had no effect ( $P > 0.05$ ) on the relative abundance of *Ruminococcus albus*. Electron beam irradiation increased ( $P < 0.05$ ) the dry matter digestibility of wheat straw. Dry matter digestibility increased ( $P < 0.05$ ) as the irradiation dose increased, and the dose of 500 kg had the greatest effect on the dry matter digestibility of wheat straw. Scanning electron microscope showed a huge increase in the destruction of the cell wall structures in 500 kGy irradiated wheat straw, which resulted in an increase in the permeability of fibrolytic bacteria to the internal parts of the cell wall structure. Increasing the permeability of fibrolytic bacteria ultimately led to increased access to the substrate an increase in the relative abundance of bacteria and higher digestibility of fibers.

**Conclusion:** Electron beam radiation at a dose of 250 kGy can change the structure of the cell wall and improve the digestibility of fibrous materials. Increasing the dose to 500 kGy causes more disruption of the cell wall structure, increasing the relative abundance of fibrolytic bacteria and increasing the digestibility of fibrous materials.

**Cite this article:** Shirkavand, P., Noorbakhsh, F., Honarmand Jahromi, S. Antimicrobial activity of bacteriocin of lactic acid bacteria against beta-lactamase producing bacteria and evaluation of synergistic effect by some antibiotics. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(4):57-69

**Publisher:** Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

**Print ISSN:** 1735-4226

**Online ISSN:** 1727-This is an open access

**article under the:** <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



## آنالیز میکروسکوپ الکترونی کاه گندم عمل اوری نشده و پرتوتابی شده با پرتو بیم الکترون پیش و پس از انکوباسیون میکروبی در شکمبه گوسفند

حسین زادگی-میرزائی<sup>۱</sup>، پروین شورنگ\*<sup>۲</sup>، فرحناز معتمدی سده<sup>۳</sup>، محمد چمنی<sup>۴</sup>، مهدی امین افشار<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دوره دکتری تخصصی، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، کرج، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، کرج، ایران

<sup>۴</sup> استاد، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۵</sup> استادیار، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

محل انجام تحقیق: واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

### تاریخچه مقاله

|         |            |
|---------|------------|
| ارسال   | ۱۴۰۲/۱۲/۱۲ |
| بازنگری | ۱۴۰۳/۰۲/۲۳ |
| پذیرش   | ۱۴۰۳/۰۲/۲۷ |
| نمایه   | ۱۴۰۳/۱۰/۱۰ |

### کلمات کلیدی

پرتوتابی  
بیم الکترون  
باکتری‌های فیبرولیتیک  
هضم پذیری  
دیواره سلولی

### \* نویسنده مسئول

shawrang@gmail.com;  
pshawrang@aeoi.org.ir

**مقدمه** افزایش هضم‌پذیری الیاف مواد خشی در شکمبه و در کل دستگاه گوارش دام‌ها برای بهبود بهره‌وری از منابع خوراکی اهمیت زیادی دارد. یکی از روش‌ها برای این منظور پرتوتابی بیم الکترون است. برای یافتن دلیل افزایش هضم‌پذیری در این روش، وضعیت ساختاری مواد خشی قبل و بعد از عمل‌آوری و همچنین طی انکوباسیون در شکمبه دام‌های نشخوارکننده لازم است با میکروسکوپ الکترونی بررسی شود. پژوهش حاضر با هدف مطالعه اثر پرتو الکترون بر ساختار میکروسکوپی الیاف کاه گندم، فراوانی نسبی باکتری‌های فیبرولیتیک و مقدار هضم‌پذیری در کل دستگاه گوارش گوسفند انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** نمونه‌های کاه گندم مورد پرتوتابی بیم الکترون با قدرت پرتو الکترون ۱۰ مگا الکترون ولت و جریان باریکه الکترون ۶ میلی‌آمپر با دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ کیلوگری قرار گرفتند. نمونه‌ها درون کیسه نایلونی ریخته شد و در شکمبه به مدت ۱۲ ساعت در معرض میکروب‌ها قرار گرفت. ساختار دیواره سلولی قبل و بعد از پرتوتابی و همچنین قبل و بعد از انکوباسیون در شکمبه با میکروسکوپ الکترونی نگاره تصویربرداری و آنالیز شد. فراوانی نسبی باکتری‌های هضم‌کننده الیاف با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز افقی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** فراوانی نسبی رومینوکوکوس فلاوفا سینس و فیبروباکترسوکسینوزنز در شکمبه با پرتوتابی کاه گندم افزایش معنی‌داری نشان داد ( $P < 0.05$ ). پرتوتابی تأثیری بر فراوانی نسبی باکتری رومینوکوکوس/آلبوس نداشت ( $P > 0.05$ ). پرتوتابی الکترون سبب افزایش قابلیت هضم ماده خشک کاه گندم شد و با افزایش دوز پرتوتابی این افزایش بیشتر بود ( $P < 0.05$ ). به نحوی که دوز ۵۰۰ کیلوگری بیشترین تأثیر را در افزایش قابلیت هضم ماده خشک کاه گندم داشت. بنابر نتایج میکروسکوپ الکترونی نگاره، افزایش دوز بیم الکترون سبب تخریب بیشتر ساختارهای دیواره سلولی و افزایش نفوذپذیری باکتری‌های فیبرولیتیک در بخش‌های درونی ساختار مواد خشی می‌شود. افزایش نفوذپذیری باکتری‌های هضم‌کننده الیاف در نهایت سبب افزایش دسترسی به سوبسترا و افزایش فراوانی نسبی باکتری‌ها و هضم بهتر الیاف شد.

**نتیجه‌گیری:** پرتوتابی بیم الکترون در دوز ۲۵۰ کیلوگری می‌تواند سبب تغییر ساختار دیواره سلولی و بهبود هضم‌پذیری کاه گندم شود. افزایش دوز به ۵۰۰ کیلوگری سبب بیشتر شدن به هم‌ریختگی ساختار دیواره سلولی، افزایش فراوانی نسبی باکتری‌های فیبرولیتیک و افزایش هضم‌پذیری کاه گندم می‌شود.

**شیوه آدرس دهی این مقاله:** زادگی-میرزائی، ح، شورنگ، پ، معتمدی سده، ف، چمنی، م، امین افشار، م، آنالیز میکروسکوپ الکترونی کاه گندم عمل اوری نشده و پرتوتابی شده با پرتو بیم الکترون پیش و پس از انکوباسیون میکروبی در شکمبه گوسفند. مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۲؛ ۱۸ (۴): ۵۷-۶۹

نویسندگان: حق مؤلف ©

شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹۴

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۳۶

## مقدمه

یون ساز است (۱۰، ۹). در مطالعات قبلی پرتوتابی الکترون به عنوان یکی از روش های عمل آوری فیزیکی غیرحرارتی برای افزایش تجزیه پذیری دیواره سلولی مواد خشبی در پیش معده دام های نشخوارکننده مطرح شده است (۱۳-۱۱). در این مطالعات پرتوتابی بیم الکترون سبب افزایش هضم پذیری بخش الیافی مواد خوراکی شده است.

در منابع علمی در دسترس، گزارشی درباره تغییراتی که پرتوتابی بیم الکترون در بخش الیافی مواد خوراکی ایجاد می کند یافت نشد. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره می توان تغییراتی را که در سطح اجسام و ذرات ایجاد می شود، مشاهده کرد (۱۴). فرضیه پژوهش حاضر این است که پرتوتابی با بیم الکترون می تواند ساختار الیاف و سطح تماس ذرات کاه را تغییر دهد و این موضوع بر رفتار چسبیدن و فعالیت باکتری های فیبرولیتیک شکمبه اثر می گذارد. افزایش هضم پذیری دیواره سلولی که در مطالعات قبلی (۱۵، ۱۱) مشاهده شده است می تواند مربوط به افزایش سطح تماس و افزایش جمعیت باکتری های تجزیه کننده الیاف بر روی ذرات الیافی باشد. در این پژوهش با میکروسکوپ الکترونی وضعیت ساختاری کاه گندم قبل و بعد از عمل آوری و همچنین طی انکوباسیون در شکمبه گوسفند بررسی می شود. بنابراین هدف این مطالعه بررسی اثر پرتوتابی بیم الکترون بر ساختار و سطح تماس الیاف کاه گندم، فراوانی نسبی باکتری های فیبرولیتیک و مقدار هضم پذیری در کل دستگاه گوارش گوسفند بود.

علوفه های خشبی و بقایای محصولات زراعی به دلیل داشتن مواد لیگنوسلولزی دارای قابلیت هضم کم در دستگاه گوارش دام ها می باشد (۱). وجود مواد لیگنوسلولزی عامل مهم محدودکننده استفاده از این منابع ارزان قیمت در جیره غذایی حیوانات است (۲). لیگنین به سلولز و همی سلولز متصل است و سبب تشکیل یک پوشش فیزیکی اطراف این دو ترکیب شده، به نحوی که سد غیر قابل نفوذی در برابر آنزیم ها و میکروارگانیسم ها ایجاد می کند (۳). عمل آوری مواد خشبی با هدف لیگنین زدایی انجام می شود و عمل آوری سبب تغییراتی در ساختمان دیواره سلولی گیاهان می شود و به این طریق محتویات داخل سلول گیاهی به آسانی در دسترس آنزیم ها و میکروارگانیسم های دستگاه گوارش قرار می گیرد (۴). نقش اصلی عمل آوری علوفه های خشبی بهبود هضم پذیری کربوهیدرات های موجود در لیگنوسلولز است که با شکستن پیوند لیگنین-کربوهیدرات، تخریب اکسیداتیو فنل ها و یا هیدرولیز پلی ساکاریدهای دیواره سلولی به قندها انجام می شود (۵). تاکنون روش های مختلف عمل آوری علوفه های خشبی با قابلیت هضم کم مانند کاه گندم در جهت افزایش قابلیت هضم در دستگاه گوارش پیشنهاد شده است که می توان به عمل آوری های فیزیکی (۶)، شیمیایی (۷) و بیولوژیکی (۸) اشاره کرد. هر کدام از روش های مذکور دارای معایب و مزایایی می باشند. از جمله روش های فیزیکی از نوع غیرحرارتی که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از پرتوهای

## مواد و روش ها

پرتوتابی و کار با حیوانات بنابر قوانین داخلی سازمان انرژی اتمی انجام شد.

## تهیه و آنالیز ماده مورد آزمایش

نمونه کاه از مزرعه پژوهشگاه کشاورزی کرج تهیه شد و

این مطالعه در آزمایشگاه تغذیه دام پژوهشگاه کشاورزی کرج (پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای) در اردیبهشت ماه ۱۴۰۲ انجام شد. پرتوتابی بیم الکترون نمونه های کاه گندم زیر نظر پژوهشگاه پرتوهای کاربردی و در مرکز پرتو فرآیند انجام شد. کلیه پروتکل های لازم برای



های پلی استری مشبک به ابعاد  $6 \times 12$  سانتیمتر با اندازه منافذ زیر ۵۰ میکرون ریخته شد و کیسه ها به مدت صفر، ۶ و ۱۲ ساعت در شکمبه گوسفند انکوباسیون شد. حیوانات از یک جیره کاملاً مخلوط بر اساس جداول جدول انجمن تحقیقات ملی (۲۰۱۷) شامل ۶۰ درصد علوفه و ۴۰ درصد کنسانتره، دوبار در روز (۸ صبح و ۳ بعد از ظهر) در سطح نگهداری در قبل و طی آزمایش، تغذیه شدند. قبل از شروع آزمایش، گوسفندان از این جیره به مدت ۱۰ روز برای عادت‌پذیری مصرف کردند. آب و سنگ نمک به طور آزاد در اختیار گوسفندان قرار داشت. شکمبه گذاری کیسه ها ۲ ساعت پس از خوراک دهی صبح انجام شد. تمام کیسه ها پس از خروج از شکمبه با آب سرد سه زمان ۵ دقیقه ای با ماشین لباسشویی شستشو شدند تا آب زلال از آنها خارج شد. کلیه مراحل انکوباسیون در شکمبه بنابر روش Nocek و همکاران انجام شد (۱۹).

#### تعیین فراوانی نسبی باکتری های فیرولیتیک

از واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) و الکتروفورز افقی برای تعیین فراوانی نسبی باکتری های فیرولیتیک شامل فیروباکتر سوکسینوژنز، رومینوکوکوس آلبوس و رومینوکوکوس فلاوفسینس با روش Koike و Kobayashi استفاده شد (۲۰). برای این منظور ۳ گوسفند فیستوله دار به صورت چرخشی با کاه گندم پرتوتابی نشده و پرتوتابی شده در دوزهای مختلف به مدت ده روز تغذیه شدند. نمونه از محتویات شکمبه گرفته و محتویات جامد از بخش مایع جداسازی و باکتری‌ها از ذرات الیافی شسته شد. پس از استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 16S rDNA مربوط به هر یک از باکتری‌های مذکور انجام شد. پس از اتمام مراحل تکثیر قطعه DNA مورد نظر با واکنش PCR، حضور باکتری‌های مذکور در ذرات الیاف با الکتروفورز افقی مشخص شد. تعیین فراوانی نسبی باکتری‌های تجزیه کننده الیاف با استفاده از روش دنسیتومتری و نرم افزار Gel Proc Analyzer انجام شد.

ترکیبات شیمیایی آن به روش AOAC اندازه گیری شد (۱۶). ابتدا کاه همگن سازی شد و سه نمونه از بخش های مختلف آن تهیه شد. ماده خشک با قرار دادن نمونه در آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس و خاکستر با قرار دادن نمونه در کوره الکتریکی با دمای ۵۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت، اندازه گیری شد. ترکیبات دیواره سلولی (NDF) و دیواره سلولی بدون همی سلولز (ADF) با استفاده از محلول دترژنت خنثی و اسیدی به روش ون سوست (۱۷) و با استفاده از دستگاه فایبرتک اندازه گیری شد. سه بار آزمایش ها برای هر نمونه تکرار شد تا دقت روش های آنالیز بررسی شود. مقادیر ترکیبات بین سه بار تکرار حداقل خطا را داشتند. تفاوت زیادی بین نمونه های اخذ شده از قسمت های مختلف کاه وجود نداشت و همگنی نمونه کاه گندم برای انجام پرتوتابی و سایر اندازه گیری ها مشخص شد.

#### پرتوتابی الکترون

کاه گندم با رطوبت ۷ درصد در کیسه های نابلونی به وزن ۱۰ کیلوگرم بسته بندی شد. در مرکز پرتو فرآیند یزد وابسته به سازمان انرژی اتمی ایران با استفاده از شتاب دهنده الکترون رودترون مدل TT220 پرتوتابی شد. قدرت پرتو الکترون ۱۰ مگا الکترون ولت و جریان باریکه الکترون ۶ میلی آمپر با دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ کیلوگری نمونه های کاه گندم پرتوتابی بیم الکترون شد. روش پرتوتابی به صورت یک طرفه بود. برای تأمین دوزهای مورد نیاز، نمونه‌ها چند بار در معرض پرتوهای الکترون قرار گرفت. به منظور دقت در دوز داده شده به نمونه‌ها، اندازه‌گیری دوز با استفاده از کالری متر پلی-استایرن که یک دوزیمتر مرجع است، صورت گرفت (۱۸).

#### انکوباسیون کاه گندم پرتوتابی نشده و شده در شکمبه

برای این پژوهش، از چهار رأس گوسفند نر بالغ مجهز به فیستولای شکمبه، که در اتاق متابولیکی پژوهشگاه کشاورزی کرج نگهداری می‌شدند، استفاده شد. مقدار ۵ گرم نمونه کاه گندم پرتوتابی شده و نشده درون کیسه

## آزمایشات قابلیت هضم

در طرح کاملاً تصادفی تعداد ۱۲ رأس گوسفند نر بالغ با میانگین وزن ۵۹ کیلوگرم در قفس‌های متابولیکی به منظور تعیین قابلیت هضم ماده خشک و دیواره سلولی بنابر روش Torrent و همکاران قرار داده شد (۲۱). دام‌ها به‌منظور تخلیه کامل دستگاه گوارش از خوراک قبلی و عادت به شرایط آزمایش، خوراک مورد آزمایش و محیط جدید به مدت یک هفته در داخل قفس‌ها نگهداری شدند. دوره پیش آزمایش به مدت ۱۰ روز به‌منظور تنظیم مقدار جیره غذایی مصرفی (به مقدار ۱ کیلوگرم ماده خشک در روز) و عادت پذیری به جیره جدید انجام شد. در این مرحله گوسفندها فقط با کاه گندم مورد آزمایش (مخلوطی از کاه گندم پرتوتابی شده و نشده) تغذیه شد. حیوانات آزادانه به آب و بلوک‌های نمک و مواد معدنی دسترسی داشتند. مرحله اصلی آزمایش که یک هفته برای هر نوع کاه (پرتوتابی شده و نشده) به طول انجامید شامل اندازه‌گیری خوراک مصرفی و جمع‌آوری کل مدفوع هر گوسفند بود. در این مرحله مقدار خوراک مصرفی حیوان با توجه به مقادیر ارائه شده و باقیمانده تعیین شد. در ابتدا و انتهای دوره آزمایش از خوراک مصرفی روزانه و باقیمانده خوراک هر دام جهت انجام آنالیز شیمیایی نمونه برداری شد. مدفوع هر دام به طور روزانه جمع‌آوری، توزین و برای انجام آنالیز شیمیایی نمونه برداری شد. اندازه‌گیری ماده خشک و الیاف

نامحلول در شوینده خنثی نمونه‌های مدفوع و مواد خشبی مورد مطالعه شامل کاه گندم پرتوتابی نشده و پرتوتابی شده انجام شد.

## مشاهدات میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

مشاهدات میکروسکوپ الکترونی در آزمایشگاه فیزیک واحد علوم و تحقیقات تهران انجام شد. با میکروسکوپ الکترونی نگاره می‌توان سطح ذرات ریز را به وسیله اسکن برداری با باریکه الکترونی و اندازه‌گیری انعکاس مشاهده کرد. در واقع با میکروسکوپ الکترونی نگاره سطح اجسام مورد مطالعه قرار می‌گیرد و با آن می‌توان تصویری سه بعدی از سطح نمونه فراهم کرد. سه نمونه از کاه گندم قبل و بعد از پرتوتابی بیم الکترون در دوزهای مختلف و همچنین سه نمونه قبل و بعد از انکوباسیون در کیسه‌های پلی استری که درون شکمبه گوسفند قرار داده شده بود مورد آنالیز میکروسکوپ الکترونی نگاره به روش Alwani و همکاران قرار گرفت (۲۲).

## آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای ارزیابی نرمال بودن داده‌ها قبل از آنالیز واریانس از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها بین همه گروه‌های آزمایشی با استفاده از آزمون توکی با سطح احتمال ۵ درصد انجام شد (۲۳).

## نتایج

نتایج مربوط به تعیین ترکیبات شیمیایی کاه گندم قبل و بعد از پرتوتابی در جدول ۱ گزارش شده است. پرتوتابی اثر معنی داری ( $P < 0.05$ ) بر مقدار ماده خشک، پروتئین خام، عصاره اتری و خاکستر نداشت. مقدار دیواره سلولی کاه گندم پرتوتابی شده با دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ کیلوگرم کاهش معنی داری ( $P < 0.05$ ) نشان داد. با افزایش دز

پرتوتابی بیم الکترون، مقدار دیواره سلولی کاهش یافت. در نمونه‌های DNA یک باند اختصاصی ۲۰۰bp مربوط به باکتری رومینوکوکوس آلبوس، یک باند اختصاصی ۴۵۰bp مربوط به باکتری فیروباکترسوکسینوژنز و یک باند اختصاصی ۸۰۰bp مربوط به باکتری رومینوکوکوس فلاوفسینس به دست آمد.

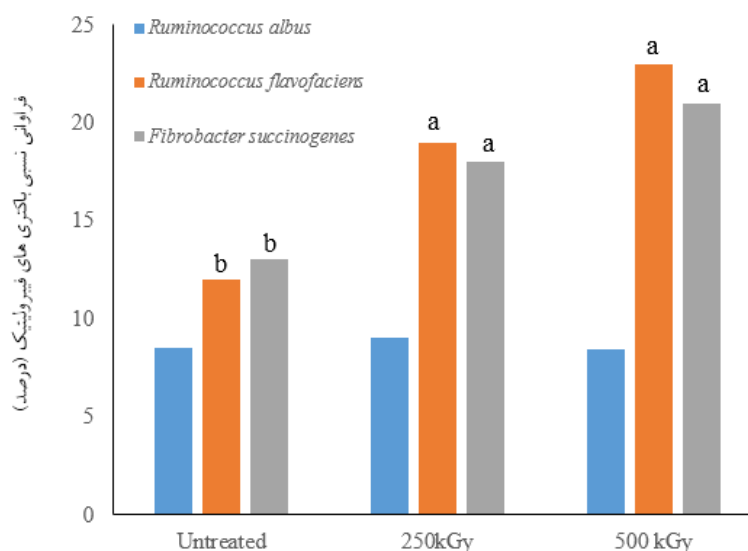
جدول ۱: ترکیبات شیمیایی کاه گندم خام و پرتوتابی شده (درصد ماده خشک)

| ماده خشک      | خاکستر خام | پروتئین خام | عصاره اتری | دیواره سلولی      |
|---------------|------------|-------------|------------|-------------------|
| پرتوتابی نشده | ۰/۹۳       | ۷/۸         | ۶/۳        | ۳/۴۷ <sup>a</sup> |
| ۲۵۰ کیلوگرمی  | ۲/۹۳       | ۵/۸         | ۴/۳        | ۹/۴۴ <sup>b</sup> |
| ۵۰۰ کیلوگرمی  | ۱/۹۳       | ۴/۸         | ۲/۳        | ۳/۴۱ <sup>c</sup> |

درج حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اختصاصی بهینه شده، این باکتری‌ها را در زمان ۱ و ۲ ساعت تشخیص نداد ولی از زمان ۳ ساعت به وضوح قابل مشاهده بود. استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از پرایمر اختصاصی تأثیر پرتوتابی بر اتصال باکتری‌های فیبروباکتر سوکسینوژنز و رومینوکوکوس فلاوسینس در زمان انکوباسیون ۳ ساعت را نشان داد. اتصال باکتری رومینوکوکوس فلاوفاسینس به ذرات پرتوتابی نشده، مشاهده نشد ولی با افزایش دوز پرتوتابی از ۲۵۰ به ۵۰۰ کیلوگرمی اتصال باکتری افزایش یافت. پرتوتابی بر اتصال

باکتری رومینوکوکوس آلبوس بی‌تأثیر بود. فراوانی نسبی باکتری‌های فیبرولیتیک در زمان انکوباسیون ۶ ساعت به بعد تفاوتی نداشت ( $P > 0.05$ ). بنابراین زمان انکوباسیون ۳ ساعت جهت مقایسه اثرات پرتوتابی در نظر گرفته شد. اثر پرتوتابی بر فراوانی نسبی باکتری‌های فیبرولیتیک در شکل ۱ نشان داده شده است. پرتوتابی تأثیری بر فراوانی نسبی باکتری رومینوکوکوس آلبوس در زمان انکوباسیون ۳ ساعت نداشت، ولی فراوانی رومینوکوکوس فلاوفاسینس و فیبروباکتر سوکسینوژنز افزایش معنی‌داری با پرتوتابی نشان داد ( $P < 0.05$ )



شکل ۱: فراوانی نسبی باکتری‌های فیبرولیتیک در محتویات شکمبه گوسفند تغذیه شده با کاه گندم پرتوتابی نشده و پرتوتابی شده

### قابلیت هضم درون تنی کاه گندم

نتایج قابلیت هضم ماده خشک کاه گندم قبل و بعد از پرتوتابی در کل دستگاه گوارش گوسفند در جدول ۲ گزارش شده است. پرتوتابی الکترون سبب افزایش قابلیت

هضم ماده خشک و الیاف نامحلول در شوینده خنثی کاه گندم شد ( $P < 0.05$ ) و با افزایش دوز پرتوتابی این افزایش بیشتر بود به نحوی که دوز ۵۰۰ کیلوگرمی

جدول ۲: قابلیت هضم ماده خشک کاه گندم پرتوتایی نشده و پرتوتایی شده (درصد)

| دوزهای پرتوتایی        | ماده خشک          | الیاف نامحلول در شوینده خنثی |
|------------------------|-------------------|------------------------------|
| کاه گندم عمل آوری نشده | ۹/۲۸ <sup>c</sup> | ۷/۲۴ <sup>c</sup>            |
| ۲۵۰ کیلوگری            | ۷/۳۶ <sup>b</sup> | ۰/۳۲ <sup>b</sup>            |
| ۵۰۰ کیلوگری            | ۲/۴۲ <sup>a</sup> | ۳/۳۶ <sup>a</sup>            |

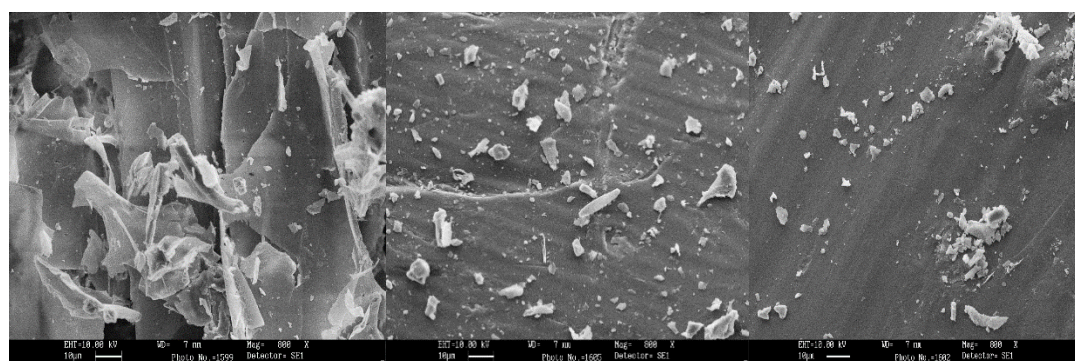
درج حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) است.

بیشترین تأثیر را در افزایش قابلیت هضم ماده خشک و الیاف نامحلول در شوینده خنثی کاه گندم داشت.

### کاه گندم

در شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم پرتوتایی شده با دوزهای مختلف قبل از انکوباسیون با بزرگنمایی ۸۰۰ برابری نشان داده شده است. تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم پرتوتایی نشده نشان داد که ذرات کاه دارای سطح صاف، بدون چین-خوردگی، حفره و شکاف است و با لایه مومی و کوتیکولی که دارای خاصیت آبرگریزی است پوشش داده شده است. کریستال‌های مومی شکل به صورت صفحه‌ای و میله‌ای دیده شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم پرتوتایی شده با دوز ۲۵۰ کیلوگری نشان داد که بر روی قسمت‌های سطحی دیواره سلولی ذرات کاه، چین‌خوردگی و شکاف ایجاد شده است و افزایش ذرات شکسته، خرد شده و چسبیده به لایه مومی شکل اپیدرم (کوتیکول) کاه

گندم که ناشی از پرتوتایی در دوز ۲۵۰ کیلوگری دیده شد. در این تصویر ذرات خرد شده با اشکال هندسی نامنظم که در اثر افزایش دوز پرتوتایی حاصل شده دیده شد به‌طوری‌که هنوز دیواره سلولی دارای انسجام و یکنواختی است. تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم پرتوتایی شده با دوز ۵۰۰ کیلوگری چین‌خوردگی و شکاف‌های عمیق با شکستگی‌های بی‌نظم دیواره سلولی که به‌صورت لایه لایه با لبه‌های تیز را نشان داد و انسجام بافتی تقریباً از بین رفته است. در این سه تصویر به دلیل اینکه کاه در شکمبه انکوباسیون نشد هیچ میکروارگانیسمی دیده نشد. شکل ۳ تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم عمل آوری نشده در زمان‌های ۶ و ۱۲ انکوباسیون در شکمبه را نشان می‌دهد. تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم عمل آوری نشده ۶ ساعت پس از انکوباسیون در شکمبه سطح ناهموار با چین و چروکیدگی، شکستگی‌ها با شکاف نامنظم که در برخی نواحی به صورت حفره دیده می‌شود را نشان داد.

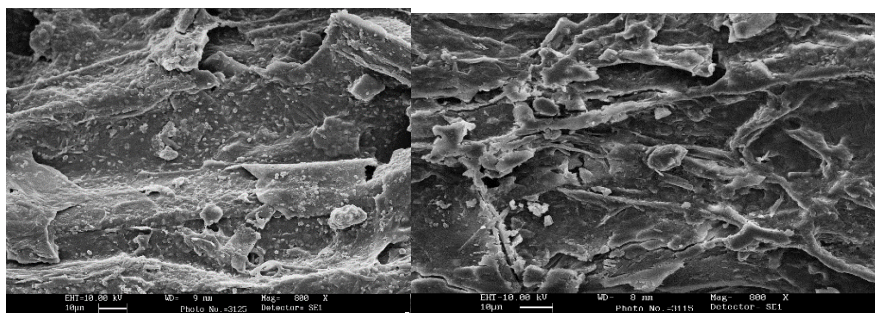


گندم پرتوتایی با دز ۵۰۰      گندم پرتوتایی با دز ۲۵۰      گندم پرتوتایی نشده

شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم قبل (شاهد) و بعد از پرتوتایی به ترتیب با دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ کیلوگری

انکوباسیون انسجام دیواره سلولی به هم ریخته و چین خوردگی خشن با حفرات فراوان ایجاد شده است. حفرات تا عمق دیواره ثانویه پیش رفته که ناشی از هجوم گروهی باکتری‌های فیبرولیتیک است. حفرات ایجاد شده ناشی از حذف یا کاهش مقدار همی سلولز و سلولز و فاصله گرفتن آن‌ها از لیگنین است.

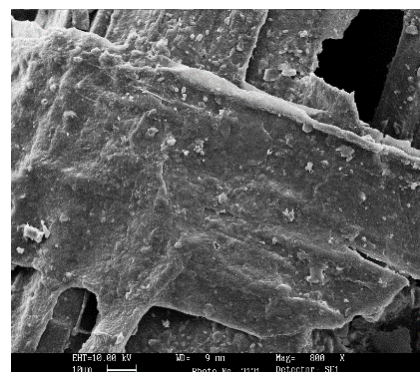
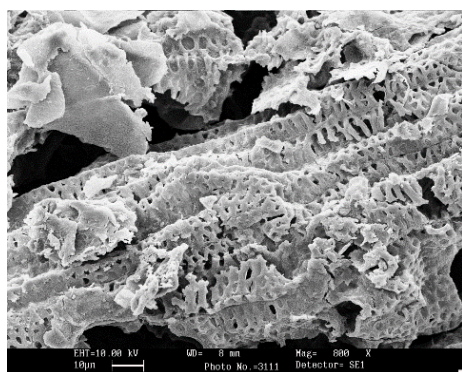
این حفرات در اثر حذف ترکیبات آلی و غیر سلولزی ناشی از ۶ ساعت انکوباسیون حاصل شده است. تخریب قسمت سطحی دیواره سلولی در اثر هجوم باکتری‌های فیبرولیتیک ناشی از انکوباسیون حاصل شده که اکثراً از نوع کوکسی‌ها بوده است. تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم عمل آوری نشده ۱۲ ساعت پس از انکوباسیون در شکمبه نشان می‌دهد که با افزایش زمان



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم پرتوتایی نشده با ۶ (راست) و ۱۲ (چپ) ساعت انکوباسیون شده در شکمبه

(تصویر سمت چپ) سبب متخلخل و نفوذپذیر شدن دیواره سلولی، تخلیه سلولز، همی سلولز و تا حدودی لیگنین شده و دیواره نازک شده و عمق آن قابل رویت است. لایه‌های سلولی اپیدرم بسیار نازک و شکننده و در مجموع دیواره باقیمانده به صورت کریستالی و شش وجهی (شبه شان زنبور عسل) شده است. تعداد محدودی میکروب در سطح دیده شد و بیشتر میکروب‌ها به عمق دیواره نفوذ کرده‌اند.

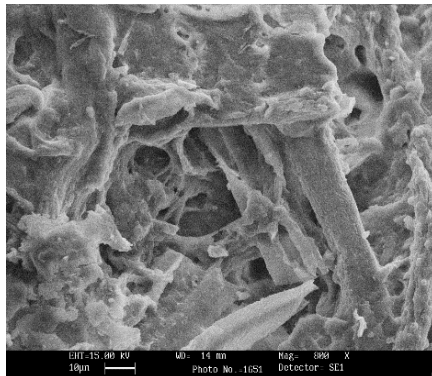
شکل ۴ تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم پرتوتایی شده با دوز ۲۵۰ کیلوگری در زمان‌های مختلف انکوباسیون را نشان می‌دهد. تصویر سمت راست نشان دهنده این است که پرتوتایی و انکوباسیون به مدت ۶ ساعت سبب افزایش شکستگی و نازک شدن لایه مومی و کوتیکول دیواره سلولی شده است. ضمناً غیر یکنواختی گسترده لایه‌های سطحی دیواره سلولی کاه و پراکندگی-های باکتری‌های فیبرولیتیک و نفوذ آنها به عمق دیواره مشاهده شد. افزایش زمان انکوباسیون به ۱۲ ساعت



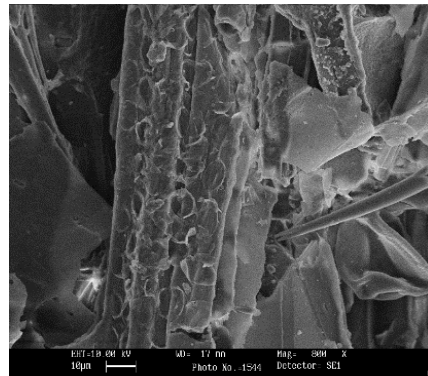
شکل ۴: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم پرتوتایی شده با دوز ۲۵۰ کیلوگری با ۶ (راست) و ۱۲ (چپ) ساعت انکوباسیون در شکمبه



ساختار دیواره سلولی باقیمانده و لایه درونی کاملاً نمایان است. تصویر سمت راست نشان داد که بعد از ۱۲ ساعت انکوباسیون کل دیواره سلولی ناپدید و هضم شده است. با افزایش دوز پرتوتابی بیم الکترون ناپدید شدن دیواره سلولی کاه گندم افزایش یافت.



شکل ۵ تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم پرتوتابی شده با دوز ۵۰۰ کیلوگری و انکوباسیون شده ۶ و ۱۲ ساعت در شکمبه را نشان می‌دهد. تصویر سمت راست کاه گندم پرتوتابی شده با دوز ۵۰۰ کیلوگری و ساعت انکوباسیون در شکمبه نشان داد که بخش کمی از



شکل ۵: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره کاه گندم پرتوتابی شده با دوز ۵۰۰ کیلوگری با ۶ (راست) و ۱۲ (چپ) ساعت انکوباسیون در شکمبه

## بحث

شدن این ترکیبات و تبدیل آن‌ها به مولکول‌هایی با وزن مولکولی کمتر می‌شوند (۲۵). نتایج قابلیت هضم ماده خشک مواد خشبی مورد مطالعه قبل و بعد از پرتوتابی نشان داد که عمل‌آوری با دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ کیلوگری پرتو الکترون قابلیت هضم کاه گندم را به ترتیب ۲۶ و ۴۶ درصد افزایش داده است. مقایسه دوزهای مختلف پرتوتابی الکترون نشان داد که با افزایش دوز پرتوتابی قابلیت هضم ماده خشک افزایش می‌یابد و دوز ۵۰۰ کیلوگری بیشترین تأثیر را در این افزایش دارد. پرتو الکترون با شکستن پیوند بین همی سلولز و سلولز، همچنین پیوندهای بین این دو پلیمر با لیگنین در دیواره سلولی سبب افزایش تجزیه پذیری در شکمبه و بنابراین افزایش قابلیت هضم ماده خشک و دیواره سلولی در کل دستگاه گوارش شده است (۲۶). بنابر گزارش Al-Masri بر اثر

عمل‌آوری با پرتو الکترون به جز دیواره سلولی اثر معنی‌داری بر سایر ترکیبات شیمیایی مواد خوراکی نداشت. پرتوتابی سبب کاهش مقدار دیواره سلولی مواد خشبی مورد مطالعه شد. نتایج پژوهش‌های دیگر نشان داد که پرتوتابی بیم الکترون سبب کاهش مقدار الیاف نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی می‌شود (۲۴، ۱۵). اثر پرتو الکترون بر مواد لیگنوسلولزی شامل شکستن پیوندهای غیرکوالانسی و همچنین پیوندهای کوالانسی بین سلولز و لیگنین است که در نهایت این مواد نامحلول را تبدیل به ترکیباتی محلول با وزن مولکولی کمتر می‌کند (۹). بر اثر برخورد پرتو الکترون با مواد پلیمری، پیوندهای غیرکوالانسی به دلیل گرفتن انرژی لازم سست شده و شکسته می‌شوند. در دوزهای بالاتر، این پرتو با دادن انرژی بیشتر به پیوندهای کوالانسی، سبب دپلمیریزه

پرتوتابی لیگنین زدایی، وابسپارش و شکستن پیوندهای کوالانسی و تغییر در ساختار سلولز کریستالی روی می‌دهد که نتیجه نهایی آن قابلیت حل شدن ترکیبات دیواره سلولی است (۲۷). بنابراین سلولز نامحلول بر اثر پرتوتابی محلول شده و از بخش غیرقابل تجزیه و کند وارد بخش سریع تجزیه شده است. Alberti و همکاران گزارش کردند پرتو الکترون، پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی را به واحدهای آرابینوز، زایلوز، گلوکز، گالاکتوز و مانوز، ۶-داکسی هگزوز و رامنوز و فوکوز، گلوکو و گالاکتوبورونیک اسید تبدیل می‌کند که این ترکیبات پس از آزاد شدن در شکمبه تخمیر می‌شوند (۲۸). پرتوتابی موجب آسیب فیزیکی و تجزیه لیگنین دیواره سلولی می‌شود، زیرا لیگنین به‌عنوان ماده اتصال دهنده میکروفیبریل‌های سلولز است. پرتوتابی موجب شکاف این ترکیب شده و به دنبال آن سلولز نیز در معرض تجزیه قرار می‌گیرد (۲۶). همچنین Al-Masri و Zarkawi گزارش کردند که یکی دیگر از دلایل افزایش تجزیه‌پذیری دیواره سلولی نمونه‌های پرتوتابی شده، شکستن اتصالات استری همی‌سلولزی با اجزای فنولی می‌باشد (۲۹)، زیرا در گیاهان تیره گندمیان، لیگنین از طریق عوامل پ-کوماریک اسید و فرولیک اسید دارای پیوند استری با آرابینوزایلان‌ها می‌باشد. پرتوتابی الکترون موجب شکسته شدن اتصالات استری همی-سلولزی (آرابینوزایلان‌ها) با اجزای فنولی شده، به‌طوری که تولید مقادیر فرولیک و کوماریک اسید و در نتیجه تجزیه‌پذیری دیواره سلولی افزایش پیدا می‌کند (۳۰، ۹). Al-Masri و Zarkawi گزارش کردند که تأثیر پرتوتابی بر اتصالات استری همی‌سلولزی کمتر از پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی و بین مولکولی سلولز می‌باشد (۲۹). پرتوهای یون‌ساز بر پیوندهای هیدروژنی بین زنجیره‌ای و پیوندهای گلیکوزیدی داخل مولکولی سلولز مؤثر می‌باشند و اثر آن‌ها بر اتصالات دیگر اندک است (۳۰). همی‌سلولز یک هتروگلیکان است که دارای ترکیبات متعددی به‌جز گلوکز و همچنین دارای پیوندهای متعددی است. سلولز یک هوموگلیکان است که از

واحدهای گلوکز تشکیل شده و فقط دارای پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی و داخل مولکولی است. بنابراین، اثر پرتوتابی یون‌ساز بر سلولز بیشتر از همی‌سلولز است (۴). بررسی میکروسکوپ الکترونی کاه گندم نشان داد که دیواره سلولی کاه گندم دارای یک کمپلکس ساختاری از چندین بافت و اندام‌های مختلف درون سلولی است که این ساختار شامل سلول‌های پارانشیم، اسکلرانشیم، مزوفیل، دسته‌های آوندی مجتمع شده در سلول‌های پارانشیمی و عناصر آوندی در بخش داخلی است. لایه میانی کاه گندم به‌وسیله حفره‌ای پوشانده شده است. قسمت خارجی آن شامل اپیدرم، فلوم و سلول‌های الیافی است. قسمت خارجی کاه (اپیدرم) حاوی موم و مواد غیر آلی در سطح است. ساقه ماشوره‌ای کاه گندم قبل از عمل‌آوری بوسیله غلاف برگ‌ها پوشیده شده که در اثر پرتوتابی از هم مجزا می‌شود (۳۱). تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که دیواره سلولی اولیه دارای پوشش حفره‌ای است. این حفرات در دیواره اولیه سلولی دارای میکروفیبریل‌های در هم آمیخته سلولزی با اتصالات عرضی است که تا حدودی توسط پلیمرهای غیر سلولزی پوشیده شده است. تجزیه و تحلیل لایه سطحی کاه گندم با میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان می‌دهد که فراساختار پیچیده و الگوهای سطحی این فراساختار مربوط به لایه‌های مومی‌پایدرم، املاح معدنی و لایه‌های سطحی الیاف کاه است که این الگو مربوط به آبگریزی و مومی بودن کاه می‌باشد (۳۱). کاهش اندازه فیزیکی کاه (خرد شدن) می‌تواند منجر به تجزیه‌پذیری سطح الیاف کاه توسط باکتری‌های فیبرولیتیک شود (۳۲). در برش عرضی بخش داخلی ساقه کاه گندم دارای یک ساختار لانه زنبوری است که این ساختار تحت تأثیر فرایندهای پرتوتابی قرار گرفته و منجر به نازک شدن جداره داخلی و لایه نرم میانی شده و در برخی مواقع ذرات ریز ناشی از شکستگی‌ها بر روی دیواره سلولی دیده می‌شود. ساقه گندم به طور میانگین دارای ۶ گره (بند) و فاصله بین دو گره را میان گره گویند که بوسیله غلاف برگ‌ها پوشیده



برای رسیدن به چنین اهدافی نیاز به آگاهی از وضعیت دیواره سلولی به ویژه کاهش میزان همی سلولز و سلولز کریستاله و همچنین تغییرات در خصوصیات فیزیکوشیمیای و لایه‌های سطحی کاه گندم می‌باشد. گزارش دادند دوزهای بالاتر از ۲۰۰ کیلوگری پرتو گاما، سبب کاهش تجزیه پذیری ماده خشک و بخش الیافی مواد خشبی می‌شود (۳۳). بنابر نتایج میکروسکوپ الکترونی نگاره، افزایش دوز بیم الکترون سبب تخریب بیشتر ساختارهای دیواره سلولی و افزایش نفوذپذیری باکتری‌های فیبرولیتیک در بخش‌های درونی ساختار مواد خشبی می‌شود. افزایش نفوذپذیری باکتری‌های هضم کننده الیاف در نهایت سبب افزایش دسترسی به سوبسترا و افزایش فراوانی نسبی باکتری‌ها و هضم بهتر الیاف می‌شود.

شده است (۳۱). این گره‌ها دارای قابلیت هضم کمی هستند. هدف اصلی پرتوتابی، ایجاد شکستگی در ساقه‌ها، گره‌ها و کاهش محتوی لیگنین مواد خشبی است تا سبب تجزیه‌پذیری بیشتر سلولز و همی‌سلولز ساقه گندم شود. لیگنین موجود در کاه گندم دارای ساختار پیچیده سه بعدی متشکل از ترکیبات پلی فنولیک بوده که این ساختار پیچیده و مستحکم پلیمرهای سلولز و همی‌سلولز را از تجزیه شدن به وسیله آنزیم‌های میکروبی حفظ می‌کند. علاوه بر این، به خاطر ویژگی‌های هتروپلیمر آمورف لیگنین در آب نامحلول و از نظر نوری غیر فعال و تخریب آن دشوار است (۴). در پژوهش کنونی، افزایش دوز بیم الکترون از ۲۵۰ به ۵۰۰ کیلوگری سبب کاهش مقدار دیواره سلولی قابل اندازه‌گیری شد و در کل دستگاه گوارش هضم پذیری ماده خشک را افزایش داد. این یافته برخلاف گزارش Shahbazi و همکاران می‌باشد که

### نتیجه گیری

بنابر نتایج این پژوهش پرتوتابی بیم الکترون در دوز ۲۵۰ کیلوگری می‌تواند سبب تغییر ساختار دیواره سلولی و بهبود هضم پذیری کاه گندم شود. افزایش دوز به ۵۰۰ کیلوگری سبب بیشتر شدن به هم ریختگی ساختار دیواره سلولی، افزایش فراوانی نسبی باکتری‌های فیبرولیتیک و افزایش هضم پذیری کاه گندم می‌شود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله عنوان می‌کنند که هیچ تعارضی وجود ندارد.

### تعارض منافع

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات به جهت تصویب و در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاه رازی برای انجام این تحقیق کمال تشکر را داریم. از مسئولین محترم پژوهشکده کشاورزی کرج به جهت راهنمایی‌های ارزنده و مساعدت در تامین مواد و امکانات فارمی و آنالیز نمونه‌ها قدردانی می‌شود. این مقاله مستخرج از رساله دانشجوی دوره دکتری تخصصی واحد علوم و تحقیقات (آقای حسین زادگی-میرزائی) می‌باشد.

## Reference

- Hendriks AT, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*. 2009; 100(1):10-8.
- Guo W, Guo XJ, Xu LN, Shao LW, Zhu BC, Liu H, Wang YJ, Gao KY. Effect of whole-plant corn silage treated with lignocellulose-degrading bacteria on growth performance, rumen fermentation, and rumen microflora in sheep. *Animal*. 2022; 16(7):100576.
- Houfani AA, Anders N, Spiess AC, Baldrian P, Benallaoua S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars—a review. *Biomass and Bioenergy*. 2020; 134:105481.
- Weng C, Peng X, Han Y. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis. *Biotechnology for Biofuels*. 2021; 14(1):1-22.
- Ginting SP. Processing technologies of lignocellulosic biomass: potentials and constraints for ruminant feed production. *WARTAZOA. Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*. 2021; 31(2):55-66.
- Gallego-García M, Moreno AD, Manzanares P, Negro MJ, Duque A. Recent advances on physical technologies for the pretreatment of food waste and lignocellulosic residues. *Bioresource Technology*. 2023; 369:128397.
- Østby H, Hansen LD, Horn SJ, Eijsink VG, Várnai A. Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology: Official Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2020; 47(9-10):623-57.
- Van Kuijk SJ, Sonnenberg AS, Baars JJ, Hendriks WH, Cone JW. Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. *Biotechnology advances*. 2015; 33(1):191-202.
- Bak JS. Electron beam irradiation enhances the digestibility and fermentation yield of water-soaked lignocellulosic biomass. *Biotechnology Reports*. 2014; 4:30-3.
- Gryczka U, Migdal W, Chmielewska D, Antoniuk M, Kaszuwara W, Jastrzebska A, Olszyna A. Examination of changes in the morphology of lignocellulosic fibers treated with e-beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*. 2014; 94:226-30.
- Shawrang P, Majdabadi A, Sadeghi AA. Changes in cell wall compositions and degradation kinetics of electron beam-irradiated sugarcane bagasse. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 2012; 36(5):527-32.
- Kim DY, Lee BM, Lee JY, Kang PH, Jeun JP. Electron beam irradiation and dilute alkali pretreatment for improving saccharification of rice straw. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2014; 57:591-5.
- Fei X, Jia W, Wang J, Chen T, Ling Y. Study on enzymatic hydrolysis efficiency and physicochemical properties of cellulose and lignocellulose after pretreatment with electron beam irradiation. *International journal of biological macromolecules*. 2020; 145:733-9.
- Inkson BJ. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In *Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods 2016*; (pp. 17-43). Woodhead publishing.
- Shawrang P, Sadeghi AA, Ahmadpanah J. Ruminal degradation kinetics of wheat straw irradiated by high doses of electron beam. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 2013; 3(1): 25-29.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. USA. 2005.
- Van Soest PV, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*. 1991; 74(10):3583-97.
- Kase KR, Adler GJ, Bjärngard BE. Comparisons of electron beam dose measurements in water and polystyrene using various dosimeters. *Medical Physics*. 1982; 9(1):13-9.
- Nocek JE, English JE. In situ degradation kinetics: Evaluation of rate determination procedure. *Journal of Dairy Science*. 1986; 69(1):77-87.
- Koike S, Kobayashi Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and

- Ruminococcus flavefaciens*. FEMS microbiology letters. 2001; 204(2):361-6.
21. Torrent J, Johnson DE, Kujawa MA. Co-product fiber digestibility: kinetic and in vivo assessment. *Journal of Animal Science*. 1994; 72(3):790-5.
  22. Alwani MS, Khalil HA, Islam N, Sulaiman O, Zaidon A, Dungani R. Microstructural study, tensile properties, and scanning electron microscopy fractography failure analysis of various agricultural residue fibers. *Journal of Natural Fibers*. 2015; 12(2):154-68.
  23. Steel RG, Torrie JH. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. New York, NY, USA: McGraw-Hill; 1986.
  24. Tabatabaie N, Fathi Nasri MH, Farhangfar H, Riasi A. Effect of electron-beam irradiation on nutritional value of Atriplex stem. *Journal of Livestock Research*. 2014; 2(2):19-28.
  25. Leskinen T, Kelley SS, Argyropoulos DS. E-beam irradiation & steam explosion as biomass pretreatment, and the complex role of lignin in substrate recalcitrance. *Biomass and Bioenergy*. 2017; 103:21-8.
  26. Takacs E, Wojnarovits L, Földvály C, Hargittai P, Borsa J, Sajo I. Effect of combined gamma-irradiation and alkali treatment on cotton-cellulose. *Radiation Physics and Chemistry*. 2000; 57(3-6):399-403.
  27. Al-Masri MR. In vitro digestible energy of some agricultural residues, as influenced by gamma irradiation and sodium hydroxide. *Applied Radiation and Isotopes*. 1999; 50(2):295-301.
  28. Alberti A, Bertini S, Gastaldi G, Iannaccone N, Macciantelli D, Torri G, Vismara E. Electron beam irradiated textile cellulose fibres.: ESR studies and derivatisation with glycidyl methacrylate (GMA). *European Polymer Journal*. 2005; 41(8):1787-97.
  29. Al-Masri MR, Zarkawi M. Effects of gamma irradiation on chemical compositions of some agricultural residues. *Radiation Physics and Chemistry*. 1994; 43(3):257-60.
  30. Dubey KA, Pujari PK, Ramnani SP, Kadam RM, Sabharwal S. Microstructural studies of electron beam-irradiated cellulose pulp. *Radiation Physics and Chemistry*. 2004; 69(5):395-400.
  31. Zhang L, Larsson A, Moldin A, Edlund U. Comparison of lignin distribution, structure, and morphology in wheat straw and wood. *Industrial Crops and Products*. 2022; 187:115432.
  32. Angers DA, Recous S. Decomposition of wheat straw and rye residues as affected by particle size. *Plant and soil*. 1997; 189:197-203.
  33. Shahbazi HR, Sadeghi AA, Fazaeli H, Raisali G, Chamani M, Shawrang P. Effects of electron beam irradiation on dry matter degradation of wheat straw in the rumen. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*. 2008; 11(4):676-9.



## Effects of Dietary Organic Selenium Levels on Immunoglobulin G Concentration and Expression of INF- $\gamma$ , IL-2, and IL-6 Genes in Female Wistar Rats

Hamid Ashrafi

PhD .Department of Animal Sciences, Science and Research Unit

Place of Research: Razi Laboratory, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Info

Abstract

### Article History:

Received 26.06.2024

Revised 28.07.2024

Accepted 31.07.2024

Online 30.12.2024

### Keywords:

Organic Selenium,  
Interferon gamma  
Interleukin-2  
Interleukin-6  
Immune System  
Response  
Female Wistar Rats

### \*Corresponding author:

E-mail address,  
ashrafihamid1071395@gmail.com

**Introduction:** High ambient temperature causes inflammation in animals. Selenium is a trace mineral that affects the health and performance of the body in stressful conditions. There are limited studies on the effect of different doses of selenium in the conditions of long-term heat stress on immune system response and the expression of genes related to inflammation. The present study was conducted to determine the effects of different doses of selenium from a selenium-methionine supplement on immune system response and the expression of interferon-gamma, interleukin-2, and 6 genes in rats during the hot season.

**Materials and Methods:** In a completely randomized design, 25 female rats were randomly divided into five groups and five replicates. Five rats were placed in standard temperature during the experiment period. After treating the relevant mice with selenium-methionine supplementation for 30 days, the expression of interleukin-2, interleukin-6, and interferon gamma genes was examined using Real Time PCR, and finally, the concentration of immunoglobulin G in the blood of the mice was evaluated using ELISA.

**Results:** Adding selenium supplements to the diet increased interferon gamma gene expression in mice under heat stress, with the highest gene expression corresponding to the 0.45 mg treatment ( $P < 0.05$ ). The relative expression of interleukin-2 gene in the groups receiving selenium supplements was lower than in the positive control group and higher than in the negative control group ( $P < 0.05$ ). Also, adding selenium supplements to the diet decreased interleukin-6 gene expression compared to the positive control treatment ( $P < 0.05$ ). The results also indicated an increase in immunoglobulin G concentration with the addition of selenium supplements to the diet.

**Conclusion:** The results of this study showed that the improvement in immune system response (increase in the concentration of immunoglobulin G), the increase in the gene expression of anti-inflammatory cytokines, and the decrease in the gene expression of inflammatory cytokines were observed with the addition of selenium-methionine supplement in the diet of rats under heat stress, and 0.45 mg of selenium from the selenium-methionine supplement is the best dose.

**Cite this article:** Ashrafi, H., Effects of Dietary Organic Selenium Levels on Immunoglobulin G Concentration and Expression of INF- $\gamma$ , IL-2, and IL-6 Genes in Female Wistar Rats. Iranian Journal of Biological Sciences. 71-84

**Publisher:** Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

**Print ISSN:** 1735-4226

**Online ISSN:** 1727-459X **This is an open**

**access article under the:** <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



# اثرات افزودن سلیوم آلی بر میزان ایمونوگلوبولین G و بیان ژن های اینترفرون گاما، اینترلوکین ۲ و ۶ در موش های ماده نژاد ویستار تحت تنش گرمایی

حمید اشرفی

دکتر، گروه علوم دامی واحد علوم و تحقیقات

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه رازی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

## چکیده

## اطلاعات مقاله

### بار بچیه مقاله

|         |            |
|---------|------------|
| ارسال   | ۱۴۰۳/۰۴/۰۶ |
| بازنگری | ۱۴۰۳/۰۵/۰۷ |
| پنرش    | ۱۴۰۳/۰۵/۱۰ |
| بمایه   | ۱۴۰۳/۱۰/۱۰ |

### کلمات کلیدی

سلیوم آلی  
اینترفرون گاما  
اینترلوکین ۲  
اینترلوکین ۶  
ایمونوگلوبولین G  
موش ماده نژاد ویستار

### \* نویسنده مسؤل

ashrafihamid1071395@g  
mail.com

**مقدمه:** دمای بالای محیط سبب ایجاد التهاب در بدن حیوانات می-شود. سلیوم ماده معدنی کمیابی است که در شرایط تنش بر سلامتی و عملکرد بدن اثر دارد. پژوهش کنونی به منظور تعیین اثرات دوزهای مختلف سلیوم از مکمل سلیوم-متیونین بر پاسخ سیستم ایمنی و بیان ژن های اینترفرون گاما، اینترلوکین ۲ و ۶ انجام شد.

**مواد و روش ها:** ۲۵ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با سن ۴ هفته و وزن بدن  $1/56 \pm 70$  گرم در قالب طرح کاملاً تصادفی به پنج گروه و هر گروه شامل پنج سر موش تقسیم شدند. تعداد ۵ سر موش در کل دوره آزمایش در دمای استاندارد و بقیه موش-ها در تنش گرمایی قرار داده شدند. پس از تیمار موشهای مربوطه با مکمل سلیوم-متیونین به مدت ۳۰ روز، بیان ژنهای اینترلوکین ۲، اینترلوکین ۶ و اینترفرون گاما با روش Real Time PCR در آنها مورد بررسی قرار گرفت و نهایتاً غلظت ایمونوگلوبولین G در خون موشها توسط تست الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت.

**نتایج:** افزودن مکمل سلیوم به جیره سبب افزایش بیان ژن اینترفرون گاما در موش های تحت تنش گرمایی شد، به طوری که بالاترین بیان ژن مربوط به تیمار ۰/۴۵ میلی گرم بود ( $P < 0.05$ ). بیان نسبی ژن اینترلوکین ۲ در گروه های دریافت کننده مکمل سلیوم نسبت به گروه شاهد مثبت پایین تر و در مقایسه با گروه شاهد منفی بالاتر بود ( $P < 0.05$ ). همچنین افزودن مکمل سلیوم به جیره سبب کاهش بیان ژن اینترلوکین ۶ در مقایسه با تیمار شاهد مثبت گردید ( $P < 0.05$ ). همچنین نتایج حاکی از افزایش غلظت ایمونوگلوبولین G با افزودن مکمل سلیوم به جیره بود.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که بهبود در پاسخ سیستم ایمنی (افزایش غلظت ایمونوگلوبولین G)، افزایش بیان ژن سیتوکین های ضد التهابی و کاهش بیان ژن سیتوکین های التهابی با افزودن مکمل سلیوم-متیونین در جیره موش های تحت تنش گرمایی مشاهده شد و ۰/۴۵ میلی گرم سلیوم از مکمل سلیوم-متیونین در هر کیلوگرم ماده خشک جیره بهترین دوز است.

شیوه آدرس دهی این مقاله: اشرفی، ح، اثرات افزودن سطوح مختلف سلیوم آلی بر غلظت ایمونوگلوبولین G و بیان ژن های اینترفرون گاما، اینترلوکین ۲ و ۶ در موش های ماده نژاد ویستار تحت تنش گرمایی. مجله دانش زیستی ایران.

۸۴:۱۸ (۴): ۷۱-۸۴

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶

شاپا الکترونیکی: X-۴۵۹-۲۷۱۷

نویسندگان: حق مؤلف ©

## مقدمه

سلیوم یک ماده معدنی کمیاب است که برای حفظ عملکردهای فیزیولوژیکی طبیعی و سلامت حیوانات ضروری است. این عنصر نقشی حیاتی در دفاع آنتی-اکسیدانی و سیستم ایمنی دارد (۱). در طول تنفس سلولی هوازی یا سازوکارهای دفاعی، رادیکال‌های آزاد به طور مداوم به عنوان محصول جانبی تولید می‌شوند. سطح اضافی رادیکال‌های آزاد ممکن است باعث آسیب اکسیداتیو به پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و حتی منجر به فرایندهای مرگ سلولی شود (۲). سلنوپروتئین‌ها گروهی از آنزیم‌های وابسته به سلیوم هستند که از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از تنش گرمایی، محافظت می‌کنند و باعث بهبود سیستم ایمنی می‌شوند (۳). خاک در بسیاری از مناطق جهان دارای سطوح پایینی از سلیوم است و زیست‌فراهمی ضعیف آن برای گیاهان منجر به مشکلاتی در تأمین سلیوم برای حیوانات مزرعه شده است (۴). حیواناتی که با جیره‌های حاوی مقادیر کم سلیوم تغذیه می‌شوند و مکمل‌های معدنی دریافت نمی‌کنند، در برابر تنش گرمایی آسیب‌پذیر هستند (۲،۳). تنش گرمایی باعث ناباروری یا سقط‌های مکرر، اندومتريوز، سندرم تخمدان پلی کیستیک و سایر اختلالات مرتبط با بارداری می‌شود (۵). در فصول گرم سال در مناطق معتدل و بویژه در مناطق گرمسیری، دمای بالای محیط عامل اصلی تنش است که بر مصرف غذا، دریافت انرژی، دفع حرارت اضافی از بدن، مصرف آب، نظام هورمونی، وضعیت آنتی-اکسیدانی و تعادل مواد معدنی در انسان و حیوانات تأثیر می‌گذارد (۶). تنش گرمایی سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش غلظت مواد معدنی کمیاب سرم در گیر در دفاع آنتی-اکسیدانی در بدن می‌شود (۷،۸). علاوه بر این، تنش گرمایی متابولیسم بدن را افزایش می‌دهد که منجر به افزایش نیاز به مواد آنتی-اکسیدانی می‌شود (۶). برای جلوگیری از این امر، جیره‌های غذایی باید حاوی مقادیر کافی از سلیوم باشند. منابع متداول سلیوم شامل سلیوم غیر آلی (سلنات سدیم و سلنیت سدیم) و سلیوم آلی (مخمر غنی شده با سلیوم، سلنومیتونین و غیره) می‌باشد (۹). تحقیقات نشان داده‌اند که سلیوم آلی به شکل کارآمدتری در بافت‌های بدن ذخیره می‌

شود و پاسخ عملکردی بهتری نسبت به مکمل‌های معدنی سلیوم ایجاد می‌کند. نوع معدنی سلیوم دارای زیست‌فراهمی حدود ۵۰ درصد می‌باشد، این در حالی است که زیست‌فراهمی برای سلیوم-متیونین به بیش از ۹۵ درصد می‌رسد (۵). در صورت استفاده از دوزهای بالای سلیوم غیر آلی، احتمال ایجاد مسمومیت وجود دارد، حال آنکه استفاده از انواع مکمل‌های آلی تا چند برابر دوز، مشکل مسمومیتی ایجاد نمی‌کند (۱۰). امروزه سلیوم در حیوانات مزرعه به عنوان یک تقویت‌کننده ایمنی نقش دارد و به دلیل محدودیت‌هایی که در بسیاری از کشورها برای گنجاندن آنتی بیوتیک‌ها در رژیم غذایی اعمال می‌شود، حیاتی است (۱۱). نقش مهم سلیوم در تنظیم عملکرد سیستم ایمنی ثابت شده است. این نقش اساسی در پاسخ سیستم ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی مشهود است و سطح پایین آن باعث تضعف سیستم ایمنی می‌شود. برخی از مطالعات نشان داده‌اند، سلیوم بر سیستم ایمنی ذاتی (بیان ژن‌های سیتوکین التهابی) و سیستم ایمنی اکتسابی (تولید پادتن) تأثیر می‌گذارد (۱۱). از مهم‌ترین سیتوکین‌ها که در تنظیم فرایندهای التهابی نقش دارند می‌توان به اینترلوکین ۲، ۶ و اینترفرون گاما اشاره کرد. هنگامی که بدن در حالت التهاب است، غلظت سلیوم در بافت‌ها و مایعات بدن به شدت کاهش می‌یابد و بیوستنز سلنوپروتئین‌ها مختل می‌شود. استفاده از مکمل سلیوم باعث بهبود سیستم ایمنی بدن و کاهش فعالیت‌های التهابی می‌شود (۱۲). حداقل مقدار سلیوم توصیه شده توسط انجمن تحقیقات ملی برای موش صحرایی ۰/۱ میلی گرم در کیلوگرم است (۱۳). این عدد حداقل مقدار سلیوم مورد نیاز موش صحرایی در شرایط طبیعی است. در شرایط تنش مقدار نیاز به سلیوم افزایش می‌یابد. با توجه به مقدار کم سلیوم در مواد خوراکی، در این پژوهش مقادیر سلیوم با منشا آلی در مقادیر ۰/۱۵ تا ۰/۴۵ میلی گرم مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر افزودن دوزهای مختلف سلیوم از مکمل سلیوم-متیونین بر فراسنجه‌های ایمنی و بیان ژن سیتوکین‌ها در شرایط تنش گرمایی طولانی مدت، مطالعات محدودی انجام شده است (۱۴).

بر بیان ژن‌های اینترفرون گاما، اینترلوکین ۲، اینترلوکین ۶ و سیستم ایمنی موش‌های در معرض تنش گرمایی به مدت یک ماه انجام شد.

موش صحرایی با توجه به شرایط متابولیکی بدن مدل مناسبی برای حیوانات تک معده‌ای جهت بررسی اثرات تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی مواد معدنی است. بنابراین پژوهش حاضر به منظور تعیین اثرات دوزهای مختلف سلیوم از مکمل سلیوم-متیونین

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه

این مطالعه در حیوانخانه آزمایشگاه رازی واحد علوم و تحقیقات انجام شد. رویه‌های مربوط به جابجایی حیوانات، مراقبت، کار و جمع‌آوری نمونه‌ها کاملاً طبق دستورالعمل‌ها و نظارت آزمایشگاه رازی و با تصویب موضوع در معاونت پژوهشی واحد علوم و تحقیقات انجام شد.

**حیوانات مورد استفاده** این مطالعه به صورت تجربی و بر روی مدل حیوانی (موش صحرایی) انجام شد. موش‌های ماده نژاد ویستار از موسسه سرم‌سازی کرج خریداری و در قفس‌های بزرگ به صورت ۵ حیوان در یک قفس بزرگ با بستر پوسته برنج اتوکلاو شده نگهداری شدند. موش‌ها برای سازگاری با شرایط محیط به مدت یک هفته در حیوانخانه نگهداری و به طور آزادانه به غذای پلت استاندارد و آب آشامیدنی دسترسی داشتند. شرایط محیطی طی دوره سازگاری رطوبت (۵۰٪)، نور (سیکل ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای  $22 \pm 31$  درجه سلسیوس بود. در طرح کاملاً تصادفی، ۲۵ سر موش صحرایی ماده با سن ۴ هفته و وزن بدن  $156 \pm 70$  گرم به طور تصادفی به پنج گروه و هر گروه پنج سر موش تقسیم شدند. تعداد ۵ سر موش در کل دوره آزمایش در دمای استاندارد نگهداری شدند و به عنوان گروه کنترل منفی در این آزمایش برجسب زده شدند. بقیه موش‌ها در شرایط رطوبت (۵۰٪)، نور (سیکل ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای  $22 \pm 31$  درجه سلسیوس طی ۱۸ ساعت و دمای  $22 \pm 38$  درجه سلسیوس به مدت ۶ ساعت در روز (جهت ایجاد تنش گرمایی) قرار داده شدند. طی مدت تنش گرمایی شاخص دما-رطوبت ۵۲ درجه سلسیوس بود. یکی از گروه‌ها در موش‌های

تحت تنش گرمایی به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد و برجسب کنترل مثبت زده شد.

**گروه‌های آزمایشی** موش‌های گروه کنترل منفی و کنترل مثبت پلت استاندارد بدون افزودنی و چهار گروه دیگر به ترتیب پلت استاندارد به اضافه ۰/۱۵، ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم سلیوم از مکمل سلیوم-متیونین به مدت ۳۰ روز دریافت کردند. پلت استاندارد حاوی ۰/۰۵ میلی گرم عنصر سلیوم در هر کیلوگرم ماده خشک بود. برای تهیه پلت حاوی مکمل سلیوم-متیونین، ابتدا پلت‌های استاندارد آسیاب شد و پس از محاسبه ماده خشک، مقدار لازم از مکمل سلیوم-متیونین افزوده و مجدد با دستگاه پلت ساز سرد، پلت گردید. برای هر دو گروه کنترل نیز پلت‌ها مجدداً به همین شیوه آسیاب و از نو تهیه شد تا اثرات احتمالی عمل آوری بر بافت فیزیکی و ترکیب شیمیایی یکسان‌سازی شود (۱۵).

**نمونه‌گیری خون** در پایان مطالعه از بزرگ سیاهرگ زیرین موش‌های صحرایی خون‌گیری به عمل آمد. پس از بیهوش کردن با تزریق ۱/۵ میلی گرم کتامین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و پس از باز نمودن شکم، از بزرگ سیاهرگ زیرین با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی لیتر نمونه خون تهیه شد. مقدار ۵ میلی لیتر خون در لوله عاری از ماده ضد انعقاد ریخته و سرم آن با سانتریفیوژ ( $1500 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه) جدا شد و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا شروع آزمایش‌های بیوشیمیایی نگهداری گردید. باقیمانده نمونه خون در لوله استریل حاوی هپارین ریخته شد و در نیتروژن مایع قرار داده شد و تا شروع آزمایش‌های بیان ژن در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۶).



## آنالیز بیان ژن‌های اینترفرون گاما، اینترلوکین ۶و۲

نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از موش‌ها در نیتروژن مایع قرار داده شد و در دمای منفی ۷۰ درجه سلسیوس تا استخراج mRNA کل نگهداری شد. از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از موش‌های صحرایی، استخراج mRNA کل با استفاده از کیت (RNeasy® Mini Qiagen, Germany, Hilden) انجام شد. mRNA کل استخراج شده، جمع‌آوری و در دمای منفی ۷۵ درجه درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس برای ساخت cDNA به کار برده شد. cDNA مطابق دستورالعمل کیت تولید شده توسط شرکت BioNeer (سئول، کره جنوبی) سنتز شد. توالی ژن‌های اینترلوکین ۲، ۶، اینترفرون گاما و GADPH با استفاده از پایگاه داده‌های ژنی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) و توالی‌های گزارش شده قبلی تهیه شد (۱۷). از ژن GADPH به عنوان ژن خانه‌دار و شاهد داخلی

یا ژن مرجع استفاده شد. پس از تهیه توالی ژن‌ها، پرایمرهای اختصاصی ژن توسط نرم افزار primer express طراحی و توسط شرکت BioNeer (سئول، کره جنوبی) سنتز شدند. مشخصات پرایمر سیتوکین‌ها و ژن مرجع در جدول ۱ نشان داده شده است. انجام تست ریل تایم PCR با استفاده از سیستم Real-Time PCR (Applied Bio systems, Foster City, CA) صورت پذیرفت. شرایط چرخه حرارتی شامل فعال سازی آنزیم در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه واسرشتی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای ۱۵ ثانیه و در دمای ۵۶ درجه سلسیوس برای ۲۰ ثانیه ذوب پرایمری و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه انجام شد. نسبت بیان نسبی ژن‌های اینترلوکین ۲، ۶ و اینترفرون گاما به عنوان ژن‌های هدف به ژن GADPH بر اساس روش لاویک و اشمیتگن (۱۸) نرمال شد.

جدول ۱: خصوصیات پرایمر سیتوکین‌ها و ژن مرجع در تست Real-time PCR

| Genes                | Primer Sequence (5' - 3')                                 | Amplicon size (bp) |
|----------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------|
| <i>Interleukin-2</i> | F-ATGTACAAGATACAACCTTGTCTT<br>R-GTCATTGTTGAGTAGATGCTTTGAC | 168                |
| <i>Interleukin-6</i> | F-CCAGAAATCCCTCCTCGCAATC<br>R-CCCTCACGGTCTTCTCCATAAACG    | 220                |
| <i>Interferon-γ</i>  | F-ACACTCAGGTCATCTTCTCAAGCC<br>R-CAGGGCGATGATCCCAAAGTAGAC  | 212                |
| <i>GADPH</i>         | F-ATCACTGCCACCCAGAAGACT<br>R-CATGCCAGTGAGCTTCCCGTT        | 200                |

F=Forward, R=Reverse, GADPH=Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase

## تیتراژ آنتی بادی

نمونه‌های سرمی جمع‌آوری شده از موش‌ها برای اندازه‌گیری غلظت ایمونوگلوبولین G با استفاده از کیت‌های الیزا و روش توصیف شده توسط Voller و همکاران (۱۹) به شرح ذیل انجام شد و نهایتاً نتایج با استفاده از اسپکتروفتومتر به صورت جذب در ۴۰۰ نانومتر بیان شد. آنالیز آماری تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از رویه‌ی مدل خطی تعمیم یافته نرم افزار SAS برای ویندوز، نسخه ۹/۴ (SAS Institute Inc., Cary, NC) انجام شد.

برای ارزیابی نرمال بودن داده‌ها قبل از آنالیز واریانس از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. از تبدیل باکس کاکس برای نرمال سازی آنها استفاده شد. داده‌های نرمال بر اساس آنالیز واریانس مناسب در قالب طرح کاملاً تصادفی برای تعیین تأثیر گروه‌های تیمار بر صفات با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ (SAS Institute Inc., Cary, NC)، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. تفاوت‌های آماری با سطح احتمال ۵ درصد اعلام شد.

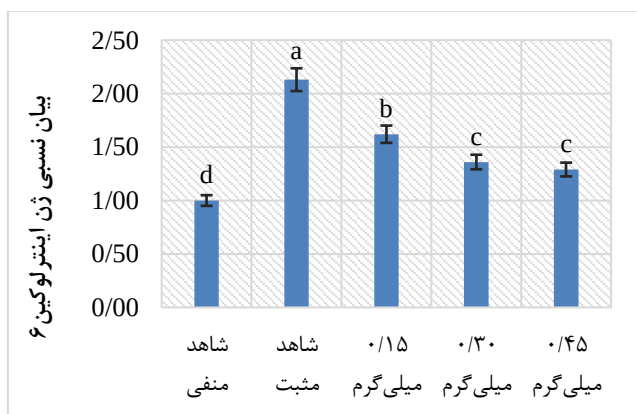
## نتایج

## بیان ژن اینترلوکین ۲

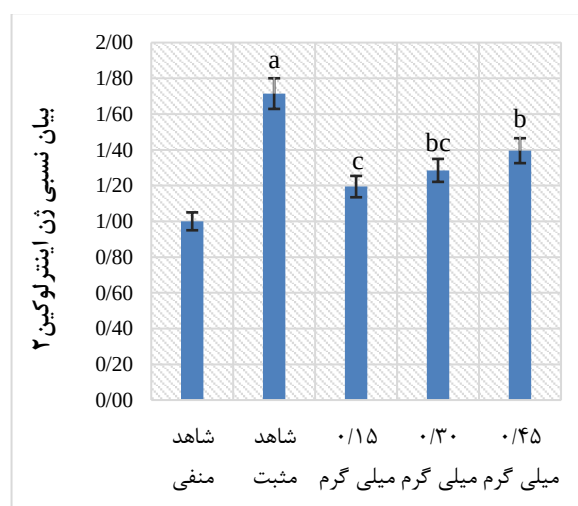
بین تیمارهای مختلف از لحاظ بیان ژن اینترلوکین ۲ تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). بیان ژن اینترلوکین ۲ در تیمار شاهد مثبت به‌طور معنی‌داری بالاتر از بیان آن در تیمار شاهد منفی بود. بیان ژن اینترلوکین ۲ در موش‌های تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل سلیوم در مقایسه با موش‌های گروه شاهد منفی به‌طور معنی‌داری بالاتر و در مقایسه با موش‌های گروه شاهد مثبت به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود. بین تیمارهای حاوی مکمل سلیوم تفاوت معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0.05$ ). به‌طوری‌که بالاترین بیان ژن اینترلوکین ۲ مربوط به تیمار حاوی ۰/۴۵ میلی گرم سلیوم و کمترین بیان ژن مربوط به تیمار حاوی ۰/۱۵ میلی گرم سلیوم بود. به‌طور کلی نتایج حاکی از یک روند افزایشی در بیان ژن اینترلوکین ۲ با افزایش سطح مکمل سلیوم می‌باشد. حاوی ۰/۴۵ میلی گرم سلیوم و کمترین بیان ژن مربوط به تیمار حاوی ۰/۱۵ میلی گرم سلیوم بود. به‌طور کلی نتایج حاکی از یک

## بیان ژن اینترلوکین ۶

آزمون مقایسه میانگین بیان ژن اینترلوکین ۶، اختلاف معنی‌داری را در بین تیمارهای مختلف نشان داد ( $P < 0.05$ ). بیان ژن اینترلوکین ۶ تیمار شاهد مثبت در مقایسه با تیمار شاهد منفی به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. موش‌های دریافت‌کننده سطوح مختلف مکمل سلیوم در مقایسه با موش‌های گروه شاهد مثبت، به‌طور معنی‌داری بیان اینترلوکین ۶ پایین‌تر و در مقایسه با موش‌های گروه شاهد منفی بیان ژن اینترلوکین ۶ بالاتر داشتند. همچنین بین موش‌های دریافت‌کننده سطوح مختلف مکمل سلیوم از لحاظ بیان ژن اینترلوکین ۶ تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). بالاترین میزان بیان ژن اینترلوکین ۶ مربوط به تیمار حاوی ۰/۱۵ میلی گرم و کمترین بیان ژن اینترلوکین ۶ مربوط به تیمار ۰/۴۵ میلی گرم بود. بین تیمارهای ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی گرم هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).



نمودار ۲: بیان نسبی ژن اینترلوکین ۶ در موش‌های تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل سلیوم-متیونین. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ( $P > 0.05$ ).



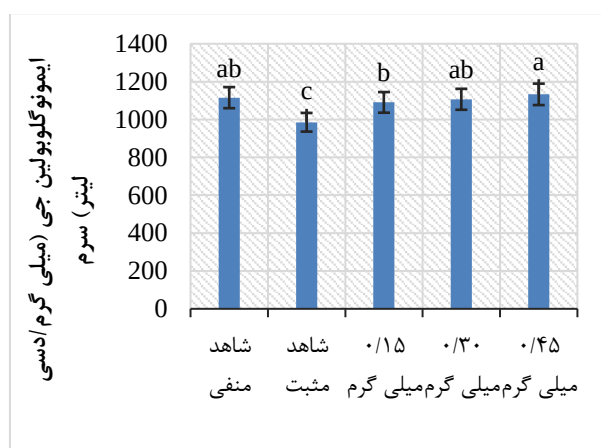
نمودار ۱: بیان نسبی ژن اینترلوکین ۲ در موش‌های تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل سلیوم-متیونین. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ( $P < 0.05$ ).

## بیان ژن اینترفرون گاما

آزمون مقایسه میانگین بیان ژن اینترفرون گاما، تفاوت معنی داری را در بین تیمارهای مختلف نشان داد ( $P < 0.05$ ). تیمار شاهد مثبت در مقایسه با تیمار شاهد منفی به طور معنی داری بیان ژن اینترفرون گامای بالاتری داشت. موش های دریافت کننده سطوح مختلف مکمل سلیوم در مقایسه با موش های گروه شاهد منفی و شاهد مثبت، بیان ژن اینترفرون گامای بالاتری داشتند. هرچند که بین موش های دریافت کننده سطوح مختلف مکمل سلیوم از لحاظ بیان ژن اینترفرون گاما تفاوت های معنی داری مشاهده نشد، اما افزایش سطح مکمل سلیوم باعث افزایش بیان ژن اینترفرون گاما شد. به طوری که بالاترین بیان ژن مربوط به سطح ۰/۴۵ میلی گرم و کمترین بیان ژن اینترفرون گاما مربوط به سطح ۰/۱۵ میلی گرم بود.

## غلظت ایمونوگلوبولین G

آزمون مقایسه میانگین میزان ایمونوگلوبولین G، تفاوت معنی داری را در بین تیمارهای مختلف نشان داد ( $P < 0.05$ ). تفاوت معنی داری از لحاظ ایمونوگلوبولین G بین تیمارهای شاهد مثبت و منفی مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). میزان ایمونوگلوبولین G موش های دریافت کننده سطوح مختلف مکمل سلیوم به طور معنی داری در مقایسه با موش های گروه شاهد مثبت بالاتر بود، هر چند در مقایسه با موش های گروه شاهد منفی تفاوت معنی داری مشاهده نگردید. به طور کلی یک روند افزایشی در میزان ایمونوگلوبولین G با افزایش سطح مکمل سلیوم در موش ها مشاهده شد.



نمودار ۴. میزان ایمونوگلوبولین G در موش های تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل سلیوم-متیونین. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ( $P < 0.05$ ).



نمودار ۳. بیان نسبی ژن اینترفرون گاما در موش های تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل

سلیوم-متیونین. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد ( $P < 0.05$ ).

## بحث

سلیوم سیستم ایمنی ذاتی (غیراختصاصی) و اکتسابی (اختصاصی) را تحت تأثیر قرار می‌دهد و تأثیر گسترده‌ای در واسطه‌های اصلی سیستم ایمنی مانند سیتوکین‌ها و آنزیم‌ها برای تقویت پاسخ‌های ایمنی از طریق فعال سازی ایمنی سلولی و هومورال دارد (۱۱). سیتوکین‌ها، پروتئین‌ها یا گلیکوپروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم هستند، که از سلول‌های ایمنی ترشح شده و عملکردهای زیادی مانند میانجیگری و تنظیم پاسخ‌های ایمنی و پاسخ‌های التهابی را در بدن به عهده دارند (۱۱). اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما به طور گسترده‌ای به عنوان عوامل تحریک‌کننده تکثیر و فعال‌سازی سلول‌های T معرفی شده‌اند (۲۰). اینترلوکین ۲ یک سیتوکین مترشح از سیستم ایمنی است که تنظیم‌کننده فعالیت سلول‌های سفید خون از جمله لنفوسیت‌ها و لکوسیت‌ها می‌باشد. سلیوم با افزایش تعداد گیرنده‌های اینترلوکین ۲ در سطح لنفوسیت‌های فعال و کشنده، برای افزایش و تمایز سلول‌های کشنده ضروری است (۲۱). اینترلوکین ۶ که یک سیتوکین مترشح از سلول‌های سفید است تنظیم‌کننده فرایندهای التهابی است و در مسیرهای وابسته به گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شود (۲۲). افزودن مکمل سلیوم به جیره جوجه‌های گوشتی سبب افزایش محتوای اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما در سرم خون و طحال جوجه‌ها شد (۲۳، ۲۴). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مکمل آلی سلیوم می‌تواند بیان نسبی ژن‌های اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما را در سرم موش‌ها افزایش دهد. در موافقت با یافته‌های ما، Luan و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که در سلول‌های قرمز جوجه، به دلیل کمبود سلیوم، بیان ۷ سیتوکین از جمله اینترلوکین ۲، اینترفرون گاما کاهش و بیان ژن اینترلوکین ۶ افزایش یافت (۱۶). Liu و همکاران (۲۰۲۰) نیز افزایش بیان ژن‌های اینترفرون گاما و اینترلوکین ۲ را در موش‌ها با افزایش سطح مکمل سلیوم مشاهده کردند (۲۵). سلیوم با افزایش تعداد گیرنده‌های اینترلوکین ۲ در سطح لنفوسیت‌های فعال و کشنده، برای افزایش و تمایز سلول‌های کشنده ضروری است. در این تحقیق بیان ژن اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما در موش‌های گروه شاهد مثبت در

مقایسه با موش‌های شاهد منفی به طور معنی‌داری بالاتر بود که با نتایج Meissonnier و همکاران (۲۰۰۸) که افزایش بیان ژن اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما را در طحال خوک‌های در معرض تنش مشاهده کردند، مطابقت دارد (۲۶). دلیل بالا بودن بیان ژن اینترلوکین ۲ در موش‌های شاهد مثبت به این دلیل است که موش‌ها در این گروه در شرایط تنش گرمایی به سر می‌برند و همچنین جیره‌های آن‌ها بدون مکمل سلیوم می‌باشد. در این شرایط به دلیل وجود تنش گرمایی، در موش‌ها تنش اکسیداتیو رخ داده است. تنش اکسیداتیو شرایط را به سمت افزایش بیان ژن سیتوکین‌های پیش التهابی مانند اینترلوکین ۲ پیش می‌برد. با افزودن مکمل سلیوم به جیره این موش‌ها، افزایش بی‌رویه بیان ژن اینترلوکین ۲ مهار می‌شود. پس از آن با افزایش سطح مکمل سلیوم، بیان ژن اینترلوکین ۲ به صورت جزئی افزایش می‌یابد، زیرا اینترلوکین ۲ دارای فعالیت‌های پیش التهابی و ضد التهابی می‌باشد (۲۷). به طور کلی یک تعادل دینامیک و قابل تغییر در دو جهت بین سیتوکین‌های پیش التهابی و ترکیبات ضدالتهابی سیستم ایمنی وجود دارد هرگونه تغییر در این تعادل باعث بروز اثرهای خطرناکی برای موجودات می‌شود به طوری که اگر تعادل به سمت سیتوکین‌های پیش التهابی جابجا شود منجر به بیماری‌های خودالتهابی و آسیب بافتی می‌شود و در صورت جابجایی تعادل به سمت سیتوکین‌ها و ترکیبات ضدالتهابی باعث قرار گرفتن میزبان در خطر آلودگی سیستمیک می‌شود (۲۸). تنش گرمایی می‌تواند بر سیستم ایمنی تأثیر بگذارد و منجر به بروز پاسخ‌های التهابی و تنش اکسیداتیو شود (۷). سلیوم یک ریز مغذی با عملکردهای متعدد مانند آنتی‌اکسیدان و توانایی‌های تقویت سیستم ایمنی است. در این تحقیق با افزایش سطح مکمل سلیوم در جیره موش‌های تحت تنش گرمایی، بیان ژن اینترلوکین ۶ کاهش پیدا کرد. در واقع این مطالعه نشان داد که تنش گرمایی به طور قابل توجهی باعث افزایش بیان سیتوکین‌های التهابی می‌شود. در این مطالعه ما دریافتیم که مکمل سلیوم-متیونین به طور قابل توجهی بیان اینترلوکین ۶ را کاهش می‌دهد.

در معرض تنش گرمایی قرار گرفتند، بیان بیش از حد اینترلوکین ۶ و فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا، مهار شدند (۲۵). آنها نتیجه گرفتند، جیره‌های غذایی مکمل شده با سلیوم آلی، موش‌ها را در برابر آسیب‌های ناشی از تنش گرمایی محافظت کرده و پاسخ التهابی را کاهش می‌دهد. این یافته‌ها با گزارش‌های قبلی مبنی بر خواص ضدالتهابی سلیوم مطابقت دارد. عملکرد ضد التهابی سلیوم ممکن است به دلیل وجود سلنوپروتئین‌های خاص مانند گلوکاتینون پراکسیداز باشد که تغییرات التهابی ناشی از اکسیداسیون را در کبد کاهش می‌دهند. سلیوم می‌تواند با تنظیم کردن توانایی سلول‌های فعال ایمنی برای پاسخ به التهاب، ایمنی را بهبود بخشد (۲۷). هنگامی که یک حیوان تحت تنش گرمایی قرار می‌گیرد، مسیر سیگنال‌دهی فاکتور هسته‌ای کاپا B بیان ژن‌های التهابی را آغاز می‌کند و اینترلوکین ۶ و سایر سیتوکین‌های التهابی را تولید می‌کند علاوه بر این، تنش گرمایی محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال موش‌ها را فعال می‌کند که آن نیز به نوبه خود تولید و آزادسازی سیتوکین‌های ضد التهابی را مهار می‌کند و تعادل بین سیتوکین‌های التهابی و ضد التهابی را مختل می‌کند. سلیوم فعال‌سازی مسیر سیگنال‌دهی NF-kB و MAPK را که نقش محوری در تنظیم مسیرهای التهابی ایفا می‌کند، کنترل می‌کند. همچنین می‌تواند NF-kB را از اتصال ژن‌های مربوط به التهاب مهار کند، که در نهایت بیان ژن سیتوکین‌های التهابی را کاهش می‌دهد (۲۵). ایمونوگلوبولین‌ها توسط سلول‌های پلاسما ترشح می‌شوند و می‌توانند به آنتی‌ژن‌های خاصی متصل شوند تا از بدن محافظت کنند (۳۵). تجویز سلیوم پاسخ ایمنی سلولی و هومورال را افزایش می‌دهد (۳۶). گزارش شده است که نانو سلیوم با افزایش لنفوسیت‌های T، ایمونوگلوبولین G و ایمونوگلوبولین M می‌تواند پاسخ ایمنی سلولی را فعال کند. همچنین پاسخ ایمنی را با واسطه آنتی‌بادی هم تقویت می‌کند. ایمونوگلوبولین G یک آنتی‌بادی است که تقریباً ۷۵ درصد از کل آنتی‌بادی‌های سرم را شامل می‌شود و نقشی حیاتی در ایمنی هومورال ایفا می‌کند (۳۷). همانطور که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود افزودن مکمل سلیوم به جیره موش‌های تحت تنش گرمایی، باعث افزایش معنی‌داری در غلظت ایمونوگلوبولین G

عملکرد ضد التهابی سلیوم به دلیل حضور آن در مرکز فعال سلنوپروتئین‌ها مانند گلوکاتینون پراکسیداز می‌باشد که اکسیداسیون ناشی از تغییرات التهابی در کبد را کاهش می‌دهد (۲۱). در جوجه‌های گوشتی تجاری، کمبود سلیوم باعث افزایش سطح سیتوکین‌های التهابی مانند اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۱ بتا شد. در مقابل، سیتوکین‌های ضد التهابی مانند اینترفرون گاما به‌طور قابل توجهی مهار شدند (۲۹). Zheng و همکاران (۲۰۲۰) در تحقیق خود مشاهده کردند، غلظت اینترلوکین ۶ در غدد پستانی موش‌های تحت تنش گرمایی به بالاترین مقدار خود رسید (۳۰). زمانی که به جیره این موش‌ها مکمل سلیوم-متیونین افزوده شد، غلظت اینترلوکین ۶ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد. کمبود سلیوم با تنظیم مسیرهای مرتبط با گیرنده‌های تال-لایک در غدد پستانی موش باعث افزایش پاسخ‌های التهابی می‌شود (۳۱). توانایی سلیوم در کاهش واکنش‌های التهابی با کاهش سیتوکین‌های التهابی از جمله اینترلوکین ۶ انجام می‌گیرد. کاهش واکنش‌های التهابی ارتباط نزدیکی با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن دارد. در سیستم آنتی‌اکسیدانی حیوانات آنزیم‌های گلوکاتینون پراکسیدازها، سوپراکسید دیسموتاز و تیوروکسین رودکتازها سلنو پروتئین‌هایی هستند که فعالیت بهینه آن‌ها در کاهش التهاب ناشی از تنش گرمایی بستگی به ذخایر کافی سلیوم در بدن بستگی دارد، زیرا سلیوم یک کوفاکتور ضروری در آنزیم‌های کلیدی درگیر در دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی است (۱۱). Abdel-Moneim و همکاران (۲۰۲۲) مشاهده کردند که افزودن مکمل سلیوم از تنظیم افزایشی شش ژن مرتبط با التهاب ناشی از تنش گرمایی از جمله اینترلوکین ۶ در جوجه‌ها جلوگیری می‌کند (۳۲). مکمل‌های آلی سلیوم در مقایسه با سلیوم غیرآلی، باعث کاهش بیان ژن‌های التهابی مانند اینترلوکین ۶ و تقویت بیشتر سیستم ایمنی شدند (۳۳). در مقایسه با گروه تنش گرمایی، مکمل سلیوم باعث کاهش بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی کبد مانند اینترلوکین ۶ و فاکتور هسته‌ای کاپا شد و به سطوحی مشابه با گروه شاهدی رسید که در معرض تنش گرمایی قرار نداشتند (۳۴). Liu و همکاران (۲۰۲۰) مشاهده کردند، تیمار با سلیوم آلی در موش‌هایی که

## سرم

می‌شود. افزایش غلظت ایمونوگلوبولین G سرم در موش‌های گروه‌های تغذیه شده با سطوح مختلف مکمل سلیوم در مقایسه با موش‌های گروه شاهد مثبت، نشان دهنده ایمن سازی موفق است. مطابق با یافته‌های ما، Li و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند که استفاده از مکمل سلیوم آلی باعث افزایش غلظت ایمونوگلوبولین‌های G در سرم خوک‌های ماده جوان شد (۳۸). آنها همچنین بیان کردند که افزایش غلظت ایمونوگلوبولین G در سرم به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های بدون مکمل سلیوم و سلنیت سدیم بیشتر بود. مطابق با یافته‌های ما، Ren و همکاران (۲۰۲۲) مشاهده کردند، گاوآژ گلیسین نانو سلیوم به موش‌ها باعث افزایش معنی‌داری در غلظت ایمونوگلوبولین‌های A، G و M سرم در مقایسه با موش‌های گروه شاهد (بدون مکمل سلیوم) شد (۷). آن‌ها همچنین بیان کردند که افزایش سطح مکمل سلیوم باعث افزایش غلظت سرمی ایمونوگلوبولین‌ها شد. در مطالعه حاضر، افزودن مکمل سلیوم آلی به جیره موش‌های تحت تنش گرمایی باعث افزایش معنی‌داری در غلظت ایمونوگلوبولین G سرم موش‌ها شد، به‌طوری که بالاترین غلظت ایمونوگلوبولین G به موش‌های تیمار ۰/۴۵ میلی گرم تعلق داشت. افزودن مکمل سلیوم-متیونین به جیره می‌تواند کارایی خوراک جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی را بهبود بخشد و ایمنی سلولی و ایمنی هومورال را افزایش دهد (۳۹). تنش گرمایی به‌طور قابل توجهی کیفیت نسبی اندام‌های ایمنی جوجه‌های گوشتی و پاسخ‌های آنتی‌بادی اولیه و ثانویه به سلول‌های قرمز خون آنها را کاهش داد، در حالی که مکمل سلیوم در جیره غذایی به‌طور مؤثری تأثیر منفی تنش گرمایی بر پاسخ‌های آنتی‌بادی ثانویه سلول قرمز را کاهش داد (۴۰). مکمل سلیوم بر تیتراژ آنتی‌بادی سرم واکسن ضد نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی تأثیری نداشت ولی تیتراژ آنتی‌بادی ضد  $H_5N_1$  سرم با افزایش سطح مکمل سلیوم در جیره افزایش یافت. علاوه بر این، سلیوم آلی اثر بهتری بر تیتراژ آنتی‌بادی داشت، که نشان می‌دهد استفاده از یک منبع مکمل سلیوم خاص می‌تواند عملکرد ایمنی جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی را بهبود بخشد (۲۰). Rao و همکاران (۲۰۱۶)

دریافتند که مکمل‌های آلی سلیوم می‌توانند عملکرد سیستم ایمنی طیور را با بهبود توانایی سلول‌های فعال ایمنی برای مقاومت در برابر عفونت افزایش دهند (۴۱). ۰/۲۵ قسمت در میلیون سلیوم می‌تواند عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی را به‌طور قابل توجهی بهبود بخشد، پاسخ ایمنی و رشد اندام‌های لنفاوی آنها را تقویت کند و همچنین می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی سرم و نسبت لنفوسیت‌ها را افزایش دهد که باعث افزایش تولید ایمونوگلوبولین‌ها می‌شود. به‌طور مشابه، Kamada و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند، غلظت ایمونوگلوبولین G سرم با گنجاندن سلیوم در جیره غذایی، به‌طور چشمگیری در گوساله‌های شیرخوار افزایش می‌یابد (۴۲). گزارش‌های قبلی نشان داده‌اند که مکمل سلیوم می‌تواند باعث افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها شود که توضیح بهتری در مورد افزایش غلظت ایمونوگلوبولین G در مطالعه حاضر است، زیرا آنتی‌بادی‌ها توسط لنفوسیت‌های B از طریق سلول‌های پلازما سنتز می‌شوند. تأمین سلیوم کافی از جیره غذایی به لنفوسیت‌های T و B اجازه فعال شدن و عملکرد بهتر را می‌دهد و در نتیجه تولید آنتی‌بادی از لنفوسیت‌ها را افزایش می‌دهد (۵). هنگامی که سلیوم به اندازه کافی تأمین نمی‌شود، تکثیر لنفوسیت‌ها در پاسخ به میتوزها کاهش می‌یابد (۵). سلول‌های ایمنی غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه می‌باشد که مستعد حمله رادیکال‌های آزاد است، در نتیجه سلیوم با خواص آنتی‌اکسیدانی مانع از اکسیداسیون آن‌ها شده و باعث می‌شود که این سلول‌ها پادتن بیشتری تولید کنند (۱۱). مصرف سلیوم همچنین بر ایمنی هومورال تأثیر می‌گذارد، زیرا گزارش شده است، کمبود سلیوم در انسان باعث کاهش ترشح ایمونوگلوبولین‌های G و M از لنفوسیت‌های B می‌شود (۴۳). همچنین سلیوم بر سطوح ایمونوگلوبولین G، ایمونوگلوبولین M و ایمونوگلوبولین A خون و عملکرد سلول‌های T اثر دارد. احتمالاً به دلیل کاهش فعالیت گلوکوکورتیکوئیدها، فعالیت و طول عمر نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها در بدن حیواناتی که در معرض کمبود سلیوم قرار دارند کمتر است (۷).

## تعارض منافع

## نتیجه گیری

نویسندگان اعلام می کنند هیچ تعارض منافی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

بنابر نتایج این پژوهش تنش گرمایی سبب ایجاد التهاب در بدن می شود و تغییرات نامطلوبی را در سیستم ایمنی بدن موش ها ایجاد می کند. همچنین افزودن مکمل سلنیوم-متیونین به جیره موش های صحرایی نژاد ویستار، سبب کاهش بیان ژن التهابی اینترلوکین ۶ و افزایش بیان ژن های ضد التهابی اینترلوکین ۲ و اینترفرون گاما شد که نشان دهنده کاهش التهاب و کاهش اثرات تنش گرمایی در بدن موش های صحرایی می باشد و ۰/۴۵ میلی گرم سلنیوم در هر کیلوگرم ماده خشک جیره از مکمل سلنیوم-متیونین بهترین دوز است.

## Reference

1. Pecoraro BM, Leal DF, Frias-De-Diego A, Browning M, Odle J, Crisci E. The health benefits of selenium in food animals: a review. *Journal of animal science and biotechnology*. 2022 May 13;13(1):58. Doi: 10.1186/s40104-022-00706-2.
2. Surai PF. Organic selenium vs. its combination with sodium selenite in poultry nutrition: food for thoughts. *Poult Sci*. 2021 Oct;100(10):101311. Doi: 10.1016/j.psj.2021.101311.
3. Ashrafi H., Sadeghi A.A., Chamani M. Effect of selenium supplementation on antioxidant indices and metabolism-related hormones in rats exposed to heat stress. *Iranian Journal of Biological Sciences*. 2023; 17(4): 35-47. Doi: 10.30495/zisti.2023.1974656.1147.
4. Jones GD, Droz B, Greve P, Gottschalk P, Poffet D, McGrath SP, Seneviratne SI, Smith P, Winkel LH. Selenium deficiency risk predicted to increase under future climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017 Mar 14;114(11):2848-53. Doi: 10.1073/pnas.1611576114.
5. Milewski S, Sobiech P, Błażej Grabowska J, Wójcik R, Żarczyńska K, Miciński J, Ząbek K. The efficacy of a long-acting injectable selenium preparation administered to pregnant ewes and lambs. *Animals*. 2021 Apr 9;11(4):1076. Doi: 10.3390/ani11041076. PMID: 33918972; PMCID: PMC8070106.
6. Belhadj Slimen I, Najar T, Ghram A, Abdrrabba MJ. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2016 Jun ;100(3):401-12. Doi: 10.1111/jpn.12379.
7. Ren Z, Okyere SK, Zhang M, Zhang X, He H, Hu Y. Glycine nano-selenium enhances immunoglobulin and cytokine production in mice immunized with H9N2 avian influenza virus vaccine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Jul 18;23(14):7914. Doi: 10.3390/ijms23147914.
8. Jamei M, Sadeghi AA, Chamani M. The effect of zinc-methionine supplementation on antioxidant status and expression of interleukin-4 and interleukin-6 genes in female rats under heat stress. *Iranian Journal of Biological Sciences*. 2022; 17(3):29-39. Doi: 10.30495/zisti.2023.1973380.1144.
9. Shi L, Ren Y, Zhang C, Yue W, Lei F. Effects of organic selenium (Se-enriched yeast) supplementation in gestation diet on antioxidant status, hormone profile and haemato-biochemical parameters in Taihang Black Goats. *Animal Feed*



Science and Technology. 2018 Apr 1; 238:57-65. DOI: 10.1016/j.anifeedsci. 2018.02.004.

10. Bogye G, Alftan G, Machay T. Randomized clinical trial of enteral yeast-selenium supplementation in preterm infants. *Biofactors*. 1998;8(1-2):139-42. Doi: 10.1002/biof.5520080123.

11. Zoidis E, Seremelis I, Kontopoulos N, Danezis GP. Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions and properties of selenoproteins. *Antioxidants*. 2018 May 14;7(5):66. Doi: 10.3390/antiox7050066.

12. Mehdi Y, Dufrasne I. Selenium in cattle: a review. *Molecules*. 2016 Apr 23;21(4):545. Doi: 10.3390/molecules21040545.

13. Novoselec J, Klir Šalavardić Ž, Đidara M, Novoselec M, Vuković R, Čavar S, Antunović Z. The effect of maternal dietary selenium supplementation on blood antioxidant and metabolic status of ewes and their lambs. *Antioxidants*. 2022 Aug 26;11(9):1664. doi: 10.3390/antiox11091664.

14. Gu X, Gao CQ. New horizons for selenium in animal nutrition and functional foods. *Animal Nutrition*. 6-80: 11; 2022. DOI: 10.1016/j.aninu.2022.06.013.

15. Almeida LM, Bassi LS, Santos RO, Orlando UA, Maiorka A, Oliveira SG. Effect of feed form and heat processing on the growth performance of growing and finishing pigs. *Livestock Science*. 2021 Mar 1; 245:104430.

16. Luan Y, Zhao J, Yao H, Zhao X, Fan R, Zhao W, Zhang Z, Xu S. Selenium deficiency influences the mRNA expression of selenoproteins and cytokines in chicken erythrocytes. *Biological trace element research*. 2016 Jun; 171:427-36. Doi: 10.1007/s12011-015-0536-8.

17. Rawash RA, Sharaby MA, Hassan GE, Elkomy AE, Hafez EE, Hafsa SH, Salem MM. Expression profiling of HSP 70 and interleukins 2, 6 and 12 genes of Barki sheep during summer and winter seasons in two different locations. *International journal of biometeorology*. 2022 Oct;66(10):2047-53. DOI: 10.1007/s00484-022-02339-6.

18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  method.

methods. 2001 Dec 1;25(4):402-8. Doi: 10.1006/meth.2001.1262.

19. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A, Fleck DG, Perkins M, Oladehin B. A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *Journal of clinical pathology*. 1976 Feb 1;29(2):150-3. Doi: 10.1136/jcp.29.2.150.

20. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne B, Kuby J (2000) *Kuby immunology*, 4th edn. WH Freeman and Company, New York, pp 303–327.

21. Liao X, Lu L, Li S, Liu S, Zhang L, Wang G, Li A, Luo X. Effects of selenium source and level on growth performance, tissue selenium concentrations, antioxidation, and immune functions of heat-stressed broilers. *Biological Trace Element Research*. 2012 Dec; 150:158-65. Doi: 10.1007/s12011-012-9517-3.

22. Xu T, Deng R, Li X, Zhang Y, Gao MQ. RNA-seq analysis of different inflammatory reactions induced by lipopolysaccharide and lipoteichoic acid in bovine mammary epithelial cells. *Microbial pathogenesis*. 2019 May 1; 130:169-77. Doi: 10.1016/j.micpath.2019.03.015.

23. Chen K, Yuan S, Chen J, Peng X, Wang F, Cui H, Fang J. Effects of sodium selenite on the decreased percentage of T cell subsets, contents of serum IL-2 and IFN- $\gamma$  induced by aflatoxin B1 in broilers. *Research in veterinary science*. 2013 Aug 1;95(1):143-5. Doi: 10.1016/j.rvsc.2013.02.019.

24. Xu D, Li W, Huang Y, He J, Tian Y. The effect of selenium and polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz. (PAMK) on immune response in chicken spleen under heat stress. *Biological Trace Element Research*. 2014 Aug; 160:232-7. Doi: 10.1007/s12011-014-0056-y. Epub 2014 Jun 26.

25. Liu K, Ding T, Fang L, Cui L, Li J, Meng X, Zhu G, Qian C, Wang H, Li J. Organic selenium ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in rats by inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020 Jul 30; 7:443. Doi: 10.3389/fvets.2020.00443.

26. Meissonnier GM, Pinton P, Laffitte J, Cossalter AM, Gong YY, Wild CP, Bertin G, Galtier P, Oswald IP. Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine

expression. *Toxicology and applied pharmacology*. 2008 Sep 1;231(2):142-9. Doi: 10.1016/j.taap.2008.04.004.

27. Tsuji PA, Carlson BA, Anderson CB, Seifried HE, Hatfield DL, Howard MT. Dietary selenium levels affect selenoprotein expression and support the interferon- $\gamma$  and IL-6 immune response pathways in mice. *Nutrients*. 2015 Aug 6;7(8):6529-49. Doi: 10.3390/nu7085297.

28. Zinchuk A, Holubovska O, Shkurba A, Hrytsko R, Vorozhbyt O, Richniak M, Herasun B. Original inhibition method of excessive synthesis of pro-inflammatory cytokine of tumour necrosis factor  $\alpha$ . *Central European Journal of Immunology*. 2015 Oct 15;40(3):345-8. Doi: 10.5114/ceji.2015.54597.

29. Liu G, Qi M, Hutchinson MR, Yang G, Goldys EM. Recent advances in cytokine detection by immunosensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016 May 15; 79:810-21. Doi: 10.1016/j.bios.2016.01.020.

30. Zheng Y, Zhao Y, He W, Wang Y, Cao Z, Yang H, Wang W, Li S. Novel organic selenium source hydroxy-selenomethionine counteracts the blood-milk barrier disruption and inflammatory response of mice under heat stress. *Frontiers in Immunology*. 2022 Dec 1; 13:1054128. Doi: 10.3389/fimmu.2022.1054128.

31. Wang H, Bi C, Wang Y, Sun J, Meng X, Li J. Selenium ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells by inhibiting activation of TLR2, NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways. *BMC veterinary research*. 2018 Dec; 14:1-8. Doi: 10.1186/s12917-018-1508-y.

32. Abdel-Moneim AM, Shehata AM, Mohamed NG, Elbaz AM, Ibrahim NS. Synergistic effect of *Spirulina platensis* and selenium nanoparticles on growth performance, serum metabolites, immune responses, and antioxidant capacity of heat-stressed broiler chickens. *Biological Trace Element Research*. 2022 Feb 1:1-2. Doi: 10.1007/s12011-021-02662-w.

33. Tang J, Cao L, Jia G, Liu G, Chen X, Tian G, Cai J, Shang H, Zhao H. The protective effect of selenium from heat stress-induced porcine small intestinal epithelial cell line (IPEC-J2) injury is associated with regulation expression of

selenoproteins. *British journal of nutrition*. 2019 Nov;122(10):1081-90. Doi: 10.1017/S0007114519001910.

34. Khan AZ, Khan IU, Khan S, Afzal S, Hamid M, Tariq M, Haq IU, Ullah N, Khan MA, Bilal S, Huwang K. Selenium-enriched probiotics improve hepatic protection by regulating pro-inflammatory cytokines and antioxidant capacity in broilers under heat stress conditions. *Journal of advanced veterinary and animal research*. 2019 Sep;6(3):355. Doi: 10.5455/javar.2019.f354.

35. Jackson DA, Elsawa SF. Factors regulating immunoglobulin production by normal and disease-associated plasma cells. *Biomolecules*. 2015 Jan 21;5(1):20-40. Doi: 10.3390/biom5010020.

36. Linterman MA, Denton AE. Selenium saves ferroptotic TFH cells to fortify the germinal center. *Nature Immunology*. 2021 Sep;22(9):1074-6. Doi: 10.1038/s41590-021-01007-y.

37. Radomska D, Czarnomysy R, Radomski D, Bielawska A, Bielawski K. Selenium as a bioactive micronutrient in the human diet and its cancer chemo preventive activity. *Nutrients*. 2021 May 13;13(5):1649. Doi: 10.3390/nu13051649.

38. Li Z, Dong Y, Chen S, Jia X, Jiang X, Che L, Lin Y, Li J, Feng B, Fang Z, Zhuo Y. Organic selenium increased gilts antioxidant capacity, immune function, and changed intestinal microbiota. *Frontiers in microbiology*. 2021 Aug 16; 12:723190. Doi: 10.3389/fmicb.2021.723190.

39. Niu Z, Liu F, Yan Q, Li L. Effects of different levels of selenium on growth performance and immunocompetence of broilers under heat stress. *Archives of Animal Nutrition*. 2009 Feb 1;63(1):56-65. Doi: 10.1080/17450390802611610.

40. Habibian M, Ghazi S, Moeini MM, Abdolmohammadi A. Effects of dietary selenium and vitamin E on immune response and biological blood parameters of broilers reared under thermoneutral or heat stress conditions. *International journal of biometeorology*. 2014 Jul; 58:741-52. Doi: 10.1007/s00484-013-0654-y.

41. Rao SR, Prakash B, Raju MV, Panda AK, Kumari RK, Reddy EP. Effect of supplementing organic forms of zinc, selenium, and chromium on performance, anti-oxidant and immune responses in broiler chicken reared in tropical summer.

Biological trace element research. 2016 Aug; 172:511-20. Doi: 10.1007/s12011-015-0587-x.

42. Kamada H, Nonaka I, Ueda Y, Murai M. Selenium addition to colostrum increases immunoglobulin G absorption by newborn calves. Journal of Dairy Science. 2007 Dec 1;90(12):5665-70. Doi: 10.3168/jds.2007-0348.

43. Marciel MP, Hoffmann PR. Molecular mechanisms by which selenoprotein K regulates immunity and cancer. Biological Trace Element Research. 2019 Nov;192(1):60-8. Doi: 10.1007/s12011-019-01774-8.