مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۵، شماره۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۹(شماره پی در پی ۱۳۸)

ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوامولسیون بره موم، عصاره اتانولی بره موم، سیپروفلوکساسین و ترکیب آنها علیه *سودوموناس ائروژینوزا*

طلیعه آرچین[۱]، عبدالغفار اونق[۱*]، علی اصغر تهرانی[۲]، سجاد کشی پور[۳]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران،[۲] گروه پاتوبیولوژی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، [۳] گروه نانوشیمی پژوهشکده نانوفناوری دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا* یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت طلب می‌باشد. با توجه به مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و خطر مقاومت آنها، مطالعات پیرامون شناسایی ترکیبات طبیعی ضدباکتریایی افزایش یافته است، لذا هدف از این پژوهش تعیین و ارزیابی اثر ضدباکتریایی نانوامولسیون بره موم، عصاره اتانولی بره موم، سیپروفلوکساسین و ترکیب آنها علیه *سودوموناس ائروژینوزا* بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال۱۳۹۷در دانشگاه ارومیه انجام شد، نانوامولسیون بره موم با روش انرژی بالا با استفاده از امواج ماورای صوت تهیه شد، سپس اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی بره موم، نانوامولسیون بره موم، سیپروفلوکساسین به تنهایی و ترکیب توام آنها(بره موم+سیپروفلوکساسین، نانوامولسیون بره موم+سیپروفلوکساسین) به روش میکروبراث دایلوش و دیسک دیفیوژن انجام شد و MIC، MBC هر یک از مواد علیه سودوموناس آئروژینوزا تعیین شد. داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: ابتدا نانوامولسیون بره موم با اندازه۱۵۶.۸ نانومتر از عصاره اتانولی بره موم تهیه شد. نتایج حاصل از آزمایش MIC و MBC نشان داد حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره الکلی بره موم و نانوامولسیون بره موم علیه *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۱۰۰۰ و ۴۶۸/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. هم‌چنین ارزیابی اثر توام عصاره بره موم و نانوامولسیون بره موم به همراه سیپروفلوکساسین به ترتیب ۲/۴۴± ۹/۷۶، ۱/۲۲±۷/۳ میکروگرم بر میلی‌لیترمی‌باشد. هم‌چنین پلیت‌های حاوی دیسک‌های ترکیبی نانوامولسیون بره موم با سیپروفلوکساسین به ترتی‌ب با غلظت‌های ۷/۳ ۱/۲۲، میکروگرم بر میلی‌لیتر هاله عدم رشد به قطر ۱۵ می‌لی متر ایجاد کرد درحالی که استفاده به تنهائی نانوامولسیون بره موم باغلظت ۴۶۸/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب ایجاد هاله مهار رشد به اندازه ۱۵ میلی‌متر شد.

نتیجه‌گیری: در این بررسی برای اولین بار نانوامولسیونی از عصاره اتانولی بره موم تهیه شد که این ماده به تنهایی و نیز همراه با سیپروفلوکساسین دارای اثرات مهار رشد و کشندگی بالا بر روی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد، هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد ترکیب نانوامولسیون بره موم با سیپرو فلوکساسین دارای اثر هم‌افزایی بوده و در نتیجه میزان دوز مصرفی هر کدام از ترکیبات و مدت زمان لازم جهت از بین بردن باکتری در مقایسه با استفاده هر کدام از آنها به تنهایی کاهش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: *سودوموناس ائروژینوزا*، سیپروفلوکساسین، نانو امولسیون بره موم، عصاره اتانولی بره موم

***نویسنده مسئول: عبدالغفار اونق**، ارومیه، دانشگاه ارومیه، گروه میکروبی‌ولوژی

Email:ownagh@yahoo.com

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت طلبی است که توانایی زیستن در تمام محیط‌ها را داشته و عامل بسیاری از عفونت‌ها در انسان مانند؛ اندوکاردیت، مننژیت، سپتی سمی و عفونت‌های مزمن ریه در بیماران سیستیک فیبروزیس می‌باشد. این تنوع در عفونت‌های سودوموناسی به دلیل گسترش سازوکارهای مختلف اکتسابی از جمله تنظیم بیان ژن است. به علاوه با تشکیل بیوفیلم توانایی محافظت در برابر سیستم ایمنی میزبان و عوامل ضد میکروبی مختلف را ایجاد می‌کند. این باکتری ارتباط مستقیمی با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد به طوری که حدود ۳۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی مربوط به مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری می‌باشد(۲ و ۱)

امروزه فلوروکوئینولون‌های نسل دوم و چهارم نظیر؛ سیپروفلوکساسین و افلوکساسین به وفور جهت درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس ائروژینوزا به کار می‌روند(۳).

پدیده ظهور مقاومت به دارو و بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف طولانی آنها، انگیزه برای جایگزین کردن موادی با منشاء طبیعی را افزایش می‌دهد. بره موم یک ماده رزینی قهوه‌ای رنگ است که به وسیله زنبوران عسل کارگر از بوته‌ها، گل‌ها و ترشحات درختان جمع‌آوری شده و زنبور کارگر داخل کندو آن را با ترشحات بزاقی خود مخلوط می‌کند(۴). کیفیت بره موم و درصد ترکیبات شیمیایی آن با توجه به پوشش گیاهی منطقه، منبع، فصل و زمان جمع‌آوری بره موم به وسیله زنبوران عسل، متفاوت می‌باشد(۵). درصد ترکیبات اصلی موجود در بره موم شامل؛ رزین(۵۵ ـ ۴۵ درصد)، موم و اسیدهای چرب(۳۵ ـ ۲۵درصد)، روغن‌های فرار(۱۰درصد) و دیگر مواد آلی و معدنی(۵ درصد) می‌باشد. رزین‌ها بخش اعظم فلاونوئیدها را تشکیل می‌دهند(تا حدود ۴۰ نوع) که همراه با تعدادی از فنول‌ها و اسیدها در این ماده یافت می‌شوند(۶). خاصیت ضد میکروبی بره موم از زمان‌های قدیم معروف بوده است(۷). در سال‌های اخیر با کشف خواص ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدتوموری و خاصیت التیام زخم، بره موم مورد توجه زیادی در پزشکی و دامپزشکی قرار گرفته است. گزارش‌های زیادی از ترکیبات سازنده و خصوصیات ضدمیکروبی بره موم وجود دارند(۱۰ـ۸). امروزه، بره موم به عنوان یک داروی طبیعی در دهان شویه، شامپو، صابون، کرم‌های آرایشی و بهداشتی و همچنین تولیدات غذایی کاربرد وسیعی پیدا کرده است(۱۱ و ۹). امولسیون‌هایی با اندازه قطرات در حدود نانومتری و به‌طور معمول در محدوده ۲۰ تا ۲۰۰ نانومتر را نانوامولسیون می‌نامند.

نانوامولسیون‌ها در کنترل و انتشار دارو، رهایش مناسب ترکیبات فعال در سراسر پوست، هدف‌گیری دارو در بخش‌های ویژه در بدن، دریافت واکسن‌ها، حمل‌کننده‌های ژن و اعمال داخل وریدی، به سبب انجام اهداف دقیق در مسیر اجرا، مفید

هستند(۱۲). هم‌چنین، نانوامولسیون‌ها نیز می‌توانند جهت فرمولاسیون در بسیاری از داروها استفاده شوند و باعث کاهش سمیت داروهای سیتوتوکسیک و نیز باعث محافظت دارو از هیدرولیز و تنزل آنزیمی در شرایط فیزیولوژیکی شوند(۱۳).

با توجه به خواص ضد میکروبی بره موم زنبور عسل این ماده می‌تواند در حالت نانو به عنوان جایگزین مناسبی برای نانو فلزات باشد. بنابراین این محصول پس از تجاری‌سازی می‌تواند برای کنترل و درمان بیماری‌های انسانی، دامی و گیاهی استفاده شود. هم‌چنین با توجه به تأثیرات ضدمیکروبی بره موم و نانوامولسیون بره موم و سیپروفلوکساسین می‌توان امیدوار بود این مواد بتواند اثرات یکدیگر را بر روی *سودوموناس ائروزینوزا* تقویت کنند. امروزه پژوهش‌های متعددی روی ترکیب آنتی‌بیوتیک‌ها و بره موم نشان داده است به عنوان مثال اثر هم افزایی ضدباکتریایی ترکیب بره موم و آنتی‌بیوتیک سفیکسیم علیه *سالمونلاانتریکا سروار تایفی موریوم* در مطالعه پریتی کالیا تأیید شد(۱۴).

ارزیابی اثر هم افزایی ضد باکتریایی عصاره بره موم و نانوامولسیون بره موم و سیپروفلوکساسین بر علیه سودوموناس ائروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند مفید باشد و از نتایج آن می‌توان در جهت مقابله با عفونت‌های ناشی از این پاتوژن استفاده کرد. لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین و تهیه نانو امولسیون بره موم و ارزیابی اثر ضد باکتریایی عصاره بره موم و نانوامولسیون بره موم و سیپرو فلوکساسین و ترکیب آنها علیه *سودوموناس ائروزینوزا PAO1* انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۷انجام شد، باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* سویه PAO1 از بخش میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شد. جهت کشت و تکثیرباکتری از محیط مولر- هینتون اگار استفاده شد.

به منظور بررسی تأثیر عصاره اتانولی بره موم، نانوامولسیون بره موم و سیپروفلوکساسین بر روی سودوموناس، سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند از باکتری تهیه شد. بدین منظور ابتدا استاندارد ۰/۵ مک فارلند با استفاده از سولفات باریم تهیه و سپس استانداردهای مک فارلند با افزودن حجم خاصی از محلول‌های اسید سولفوریک ۱ درصد و باریم کلرید ۱/۱۷۵ درصد برای به دست آوردن یک محلول سولفات باریم با دانسیته نوری خاص تهیه شد. استاندارد نیم مک فارلند کدورتی معادل با یک سوسپانسیون باکتریایی حاوی $۱/۵\times۱۰^{۸}$ واحد تشکیل دهنده کلنی بر میلی‌لیتر ایجاد می‌کند و برای تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلند نیاز به کشت ۲۴ ساعته از باکتری می‌باشد. در ادامه، ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش باکتری از کشت ذخیره به محیط کشت اگار مغذی منتقل شد و پس از رشد کشت مربوطه، به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی از پرگنه‌های تازه رشد کرده استفاده شد. سپس مقداری از

سوسپانسیون میکروبی درون لوله استریل دربدار حاوی نرمال سالین ریخته شد و کدورت آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و تا هنگام برابر شدن کدورت محلول با کدورت محلول نیم مک فارلند با نرمال سالین رقیق گردید(۱۵).

بره موم مورد استفاده در این پژوهش از کندوهای زنبورعسل واقع در نواحی مختلف استان آذربایجان غربی، جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها در اسرع وقت به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان شروع عصاره گیری نگهداری شدند.

عصاره‌گیری بره موم طبق روش چانگلو انجام گرفت، به منظور آماده سازی EEP، از نمونه‌های خام اولیه بره موم جمع‌آوری شده به مقدار ۳۰ گرم به وسیله اسکالپل استریل تیز کاملاً خرد شدند. بره موم خرد شده با ۳۰۰ میلی‌لیتر از اتانول ۵۰ درصد مخلوط و روی شیکر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد(با دور ۱۵۰ در دقیقه) تکان داده شد. به کمک کاغذ صافی نمره ۴۲ واتمن محلول به دست آمده کاملا صاف شده و به وسیله دستگاه روتاری، الکل آن تبخیر و عصاره اتانولی خالص به دست آمد. سپس عصاره خالص به دست آمده توزین و محلول ۱۰ درصد(وزن به حجم) آن در اتانول ۵۰ درصد آماده شد و به کمک فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون استریل شده و تا زمان استفاده دور از نور و در دمای یخچال نگه‌داری شد(۱۶).

برای این منظور از روش امولسیون‌سازی با انرژی بالا با استفاده از دستگاه مولد امواج ماورای صوت با قدرت ۷۵ وات و فرکانس ۳۰ کیلو هرتز برای مدت زمان ۱دقیقه همگن کرده و محلول به دست آمده در دمای اتاق نگهداری شد(۱۷).

برای تهیه مخلوط ۱۰ درصد وزنی نانو امولسیون بره موم مقدار ۸ میلی‌لیتر توئین ۲۰ ، ۰/۶ گرم عصاره بره موم، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد را مخلوط کرده و با استفاده از دستگاه مولد امواج ماورای صوت همگن گردید. برای تعیین پایداری محلول نانو امولسیون تهیه شده با اندازه‌گیری سایز و توزیع ذرات با استفاده از دستگاه پراکندگی دینامیکی نور[1] ساخت شرکت مالورن اینسترومنت انگلستان و شماره مدل ZEN1600 تعیین شد. همچنین برای تایید اندازه تشخیص داده‌شده به‌وسیله DLS و نیز تهیه تصویر عمومی‌از ساختار نانوامولسیون تهیه شده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری(TEM) با مشخصات میکروسکوپ الکترونی فیلیپس ۲۰۸ با ولتاژ شتاب 100 keV نیز استفاده شد.

در این مطالعه از روش براث میکرو دایلوشن جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد(MIC) و تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری(MBC) رقت‌های مختلف بره موم و نانو امولسیون بره موم برای *سودوموناس ائروژینوزا PAO1* استفاده شد.

1-Dynamic Light Scattering (DLS)

به طور خلاصه، رقت‌های سریال نیم برابر از عصاره الکلی بره موم در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد(از غلظت ۴۰۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر در خانه اول تا غلظت ۷/۸ میکرولیتر بر میلی‌لیتر در خانه دهم از ۱۲ خانه یک میکروپلیت) حاوی محیط کشت مولر هینتون براث(Merck,Germany) تهیه شد. بدین صورت که هر چاهک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف بره موم و۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی مورد مطالعه معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند(۱۰۸×۱/۵) می‌باشد سپس یک خانه از میکرو پلیت به عنوان کنترل حلال(اتانول۵۰ درصد) وخانه دیگری کنترل منفی حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث استریل اختصاص داده شد و میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. هم‌چنین رقت‌های مختلف مشابه آنچه توضیح داده شد برای نانوامولسیون بره موم از رقت ۷۵۰۰ تا ۷/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر با نسبت ۱:۱ نیز تهیه شد؛ سپس یک خانه از میکروپلیت کنترل منفی و خانه دیگری از میکروپلیت پایه نانوامولسیون بره موم(توئین۲۰+الکل+آب) اختصاص داده شد. جذب نوری، قبل و بعد از انکوباسیون با استفاده از دستگاه قرائت گر الیزا(بیوتک ـ آمریکا) در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. طبق تعریف MIC برابر است با کم‌ترین غلظتی از دارو که مانع رشد باکتری مورد آزمایش شود(غلظت آخرین چاهکی که در آن هیچ کدورتی ایجاد نشده باشد). هم‌چنین طبق تعریف MBC برابراست با حداقل غلظتی از دارو که ۹۹/۹ درصد از تراکم اولیه باکتری را کاهش دهد. برای اندازه‌گیری آن، همه خانه‌های فاقد کدورت روی محیط مولر- هینتون اگار(Merck,Germany) کشت داده شده و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از انکوباسیون کمترین غلظتی از تیمارها که در آن

کلنی باکتری رشد نکرده باشد به عنوان غلظت کشندگی MBC گزارش شد. به منظور تأیید نتایج، آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد. لازم به ذکر هست که رعایت موارد ایمنی حین انجام کار و موارد زیست محیطی از جمله دفن ایمن پلیت‌ها نیز انجام شد.(۱۸).

برای ارزیابی اثرات ترکیبی بره موم و نانوامولسیون بره موم با سیپروفلوکساسین از روش براث میکرودایلوشن چکر برد استفاده شد. بدین صورت که ابتدا۱۰۰ میکرولیتر از محلول سیپروفلوکساسین(sigma–Aldrich)۰/۵ درصد (هر ۱۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۰/۵گرم سیپروفلوکساسین) به چاهک میکرو پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه کرده سپس۱۰۰ میکرولیتر از استوک عصاره‌الکلی بره موم(حاوی۱/۶ گرم عصاره بره موم در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول) نیز به آن افزوده و غلظتی متشکل از ۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیپروفلوکساسین و ۸۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی بره موم به دست آمد. سپس رقت سازی محلول حاصل به صورت سریال انجام گرفت. آنگاه ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی نیم مک فارلند از باکتری مورد مطالعه را به آن افزوده

و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. هم‌چنین این روش دقیقاً برای نانو امولسیون بره موم نیز انجام شد. بدین صورت که ۱۰۰ میکرولیتر از استوک نانوامولسیون بره موم با ۱۰۰میکرولیتر از محلول سیپروفلوکساسین ۰/۵ درصد درون یک خانه از میکروپلیت ریخته شد سپس رقت‌سازی انجام گرفت؛ سپس به هر کدام از خانه‌های میکروپلیت که حاوی غلظت‌های مختلف ترکیب نانوامولسیون بره موم با سیپروفلوکساسین بودند، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی نیم مک فارلند از باکتری مورد مطالعه اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند.

برای تعیین غلظت بازدارنده افتراقی[1] همه چاهک‌های فاقد کدورت روی محیط مولر هینتون اگار کشت داده شده و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، اولین چاهک از غلظت‌های پایین تهیه شده که فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بودند به عنوان غلظت MIC تیمار توأم در نظر گرفته شد. آنگاه با استفاده از فرمول زیر شاخص FIC محاسبه شد(۱۴).

$$FICA = \frac{MIC \text{ دارو در ترکیب}}{MIC \text{ دارو به تنهایی}} \qquad FIC\ I = FIC\ A + FICB$$

$$FIC\ B = \frac{MIC \text{ دارو در ترکیب}}{MIC \text{ دارو به تنهایی}}$$

FICI≤۰/۵ اثر سینرژیستی، ۱-۰/۵ FICI اثر افزایشی، ۴-۱<FICI بدون اثر و FICI>۴ اثر آنتاگونیستی را نشان می‌دهد.

برای تعیین قطر هاله عدم رشد از روش دیسک دیفیوژن مطابق با استاندارد موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی(CLSI)، استفاده شد. ابتدااز عصاره خالص اتانولی بره موم تهیه شده, یک استوک (۱/۶گرم عصاره اتانولی بره موم در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول۵۰ درصد) تهیه شد؛ سپس رقت‌سازی با نسبت ۱:۱ انجام شد. غلظت‌های به دست آمده عبارتند از؛ ۸۰۰۰، ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶و ۷/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر. هم‌چنین نانو امولسیون تهیه شده (۳۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نیز با نسبت ۱:۱ از غلظت ۱۵۰۰۰ تا ۳/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقت‌سازی شد.

محلول سیپروفلوکساسین ۰/۵ درصد(هر ۱۰۰ میلی‌لیتر حاوی۰/۵ گرم سیپروفلوکساسین) نیز تهیه شد. سریال رقت‌های تهیه شده با نسبت ۱:۱ بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر شامل؛ ۲۵۰۰، ۱۲۵۰، ۶۲۵، ۳۱۲/۵، ۱۵۶/۲۵، ۷۸/۲، ۳۹/۰۶، ۱۹/۵۳، ۹/۷۸، ۴/۹، ۲/۴۴، ۱/۲۲ بود.

به منظور ارزیابی تأثیر توأم بره موم و سیپروفلوکساسین ونانوامولسیون بره موم و سیپروفلوکساسین محلولی متشکل از هر دو ماده مذکور تهیه شد. بدین صورت که ابتدا از استوک هر یک از مواد,۱۰۰ میکرولیتر برداشته و در داخل یک خانه میکروپلیت ریخته شد. سپس رقت‌سازی محلول حاصل با نسبت ۱:۱ به صورت سریال انجام گرفت.

1-Fractional Inhibitory Concentration(FIC)

پس از تهیه محلول‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش، دیسک‌های بلانک به مدت ۵ ساعت در ۲۰ میکرولیتر از محلول‌های تهیه شده با غلظت‌های فوق‌الذکر قرار داده شدند و در نهایت این دیسک‌ها روی محیط کشت مولر هینتون آگار(حاوی سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰/۵ مک فارلند از باکتری مورد مطالعه) قرار گرفتند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از این مدت بر اساس کمیته استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی(CLSI)، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها به وسیله خط کش اندازه‌گیری شد.

تمامی مراحل یاد شده با سه تکرار انجام شد، همچنین رعایت موارد ایمنی حین انجام کار و موارد زیست محیطی از جمله دفن ایمن پلیت‌ها نیز انجام شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

بررسی پراکنش اندازهٔ ذرات نانوامولسیون بره موم برای تهیه نانوامولسیون بره موم نیاز به تبدیل عصاره بره موم به نانوامولسیون و پایدار کردن آن به وسیله یک سورفاکتانت می‌باشد. در این مطالعه از توئین ۲۰ به عنوان عاملی برای پایدار کردن نانوامولسیون استفاده شد. توئین با جهت‌گیری در اطراف نانوامولسیون‌های بره موم تهیه شده از امواج مافوق صوت مانع از تراکم آنها می‌شود.

برای تعیین میزان اندازه نانوامولسیون‌های تهیه شده از نمونه آنالیز DLS انجام شد(نمودار ۱). این نمودار توزیع ذرات در محدوده ۱۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر را نشان می‌دهد که بیش‌ترین توزیع ذرات بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر می‌باشد. هم‌چنین بیش‌ترین اندازه ذرات ۱۵۶.۸ نانومتر می‌باشد. برای نشان دادن شکل و اندازه ذرات تصویر میکروگراف TEM تهیه شد(تصویر ۱). این تصویر تشکیل نانو امولسی‌ون بره موم را به خوبی نشان می‌دهد. توزیع بیشینه اندازه ذرات در اندازه بین ۱۴۰ تا ۱۶۰ نانومتر می‌باشد.

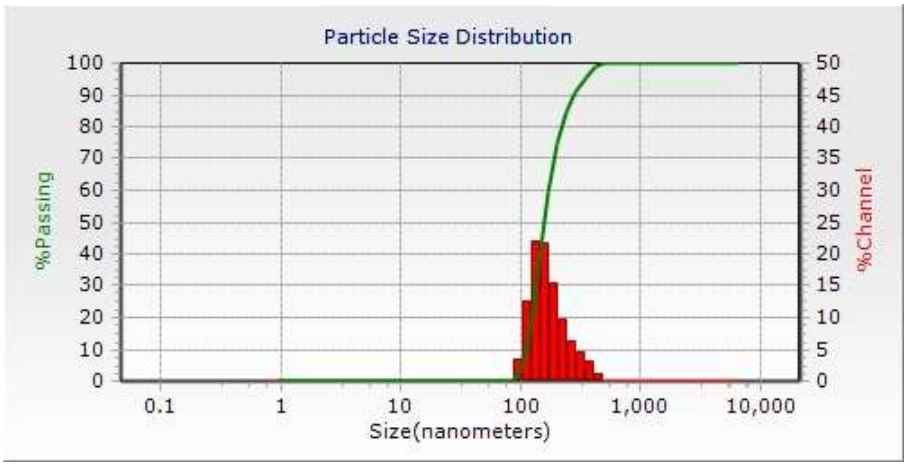
در این مطالعه خاصیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی بره موم و نانوامولسیون بره موم در مقایسه با داروی استاندارد سیپروفلوکساسین علیه *سودوموناس ائروژینوزا PAO1* با روش براث میکرو دایلوشن بررسی شد. نتایج حاصل از آزمون براث میکرودایلوشن یعنی حداقل غلظت مهار کنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) وارزیابی اثر هم افزایی بره موم و نانوامولسیون بره موم توام با سیپروفلوکساسین در جدول(۲ و ۱) نشان داده شده است. لازم به ذکر است که کنترل حلال(اتانول ۵۰ درصد) و پایه نانوامولسیون بره موم مورد استفاده در این مطالعه تأثیری روی سویه باکتریایی مورد نظر نداشت. در پلیت‌های حاوی دیسک آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین، بره موم ونانو امولسیون بره موم به تنهایی در غلظت‌های ۴/۹، ۱۰۰۰ و ۴۶۸/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر، هاله عدم رشد مطابق با CLSI ایجاد شد(جدول۳). نتایج این تحقیق نشان داد که

ترکیب نانوامولسیون بره موم همراه با سیپروفلوکساسین و ترکیب عصاره اتانولی بره موم همراه با سیپروفلوکساسین دارای اختلاف معنی‌داری($p<0/05$) نسبت به هر کدام از داروها به تنهایی بودند.

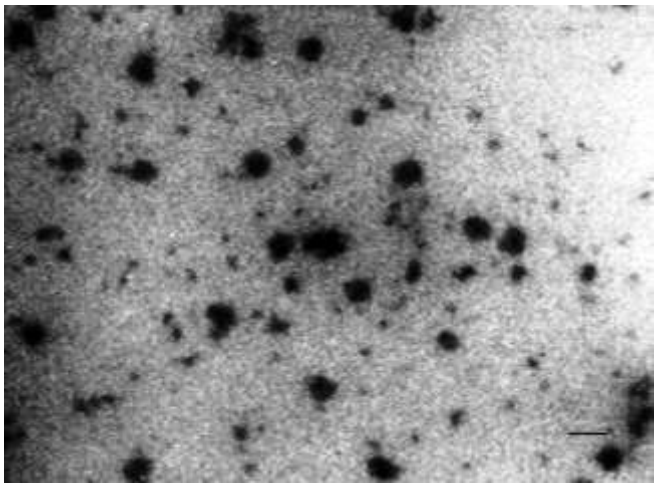
همچنین نتایج هاله عدم رشد ترکیب بره موم و نانوامولسیون بره موم با سیپروفلوکساسین با نتایج براث میکرودایلوشن مطابقت داشت و نشان می‌دهد که بره موم و نانو امولسیون بره موم در ترکیب با سیپرفلوکساسین دارای اثر هم افزایی می‌باشند(جدول۴). نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که نانوامولسیون بره موم زنبور عسل با اختلاف معنی‌داری($p<0/05$) خواص ضد میکروبی بهتری نسبت به حالت عصاره اتانولی بره موم داشته و در حالت نانو کارایی این ماده افزایش می‌یابد.

بحث

سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت‌طلبی است که عامل بسیاری از عفونت‌ها در انسان مانند؛ اندوکاردیت، مننژیت، سپتی سمی و عفونت‌های مزمن ریه در بیماران سیستیک فیبروزیس می‌باشد. به علاوه با تشکیل بیوفیلم توانایی محافظت در برابر سیستم ایمنی میزبان و عوامل ضد میکروبی مختلف را ایجاد می‌کند. این باکتری مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالای‌ی دارد به طوری که حدود ۳۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی مربوط به این باکتری می‌باشد(۲ و۱). امروزه فلوروکوئینولون های نظیر؛ سیپروفلوکساسین و افلوکساسین به وفور جهت درمان عفونت های ناشی از سودوموناس ائروژینوزا به کار می‌روند(۳)، ولی ظهور مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در *سودوموناس ائروژینوزا* و بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف طولانی مدت آنها، انگیزه برای جایگزین کردن موادی با منشاء طبیعی مثل بره موم را افزایش می‌دهد(۳)، لذا هدف از این پژوهش تعیین و ارزیابی اثر ضد باکتریایی نانوامولسیون بره موم، عصاره اتانولی بره موم، سیپروفلوکساسین و ترکیب آنها علیه *سودوموناس ائروژینوزا* بود.



نمودار ۱: توزیع اندازه ذرات بدست آمده از پراکندگی دینامیکی نور برای نمونه نانوامولسیون بره موم



تصویر ۱: میکروگراف TEM مربوط به نانوامولسیون بره موم (میله ۲۰۰ نانومتر)

جدول ۱ : نتایج MIC, MBC در رقت‌های مختلف بره موم، نانوامولسیون بره موم و سیپروفلوکساسین بر روی *سودوموناس آئروژینوزا*

نام ماده	حداقل غلظت مهارکنندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
عصاره اتانولی بره موم	۱۰۰۰	۲۰۰۰
سیپروفلوکساسین	۴/۹	۹/۸
نانوامولسیون بره موم	۴۶۸/۸	۹۳۷/۶

جدول ۲: ارزیابی اثرات ترکیبی بره موم و نانوامولسیون بره موم با سیپروفلوکساسین باروش چکر برد checkerboard method

نام ماده	حداقل غلظت مهارکنندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	اندی‌س غلظت بازدارندگی افتراقی
عصاره اتانولی بره موم +سیپروفلوکساسین	۹/۷۶+۲/۴۴	۱۹/۵۳+۴/۹	S ۰/۵
نانوامولسیون بره موم+سیپروفلوکساسین	۷/۳+۱/۲۲	۱۴/۶۴+۲/۴۴	S ۰/۲۶

جدول ۳: قطر هاله عدم رشدباکتری (برحسب میلی متر) در رقت‌های مختلف بره موم، نانوامولسیون بره موم و سیپروفلوکساسین(بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر)

رقت بره موم	۷/۸	۱۵/۶	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۴۰۰۰	–
قطر هاله	۱	۲	۴	۷	۹	۱۰	۱۳	۱۵	۱۷	۲۰	–
رقت نانوامولسیون بره موم	۷/۳	۱۴/۶۴	۲۹/۳	۵۸/۶	۱۱۷/۲	۲۳۴/۴	۴۶۸/۷۵	۹۳۷/۵	۱۸۷۵	۳۷۵۰	۷۵۰۰
قطر هاله	۲	۵	۶	۸	۱۱	۱۳	۱۵	۱۷	۲۰	۲۴	۹
رقت سیپروفلوکساسین	۱/۲۲	۲/۴۴	۴/۹	۹/۷۸	۱۹/۵۳	۳۹/۰۶	۷۸/۱	۱۵۶/۲۵	۳۱۲/۵	۶۲۵	۱۲۵۰
قطر هاله	۹	۱۲	۱۵	۱۷	۱۹	۲۱	۲۲	۲۴	۲۶	۳۰	۳۳

جدول ۴: قطر هاله عدم رشدباکتری(برحسب میلی‌متر) در رقت‌های مختلف ترکیب بره موم+ سیپروفلوکساسین و ترکیب نانو امولسیون بره موم+سیپروفلوکساسین(بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

شماره ترکیب	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	٦	٥	٤	۳	۲	۱
رقت بره موم	۱/۹٥	۳/۹	۷/۸	۱٥/٦	۳۱/۲٥	٦۲/٥	۱۲٥	۲٥۰	٥۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	٤۰۰۰
رقت سیپروفلوکساسین	۰/٦۱	۱/۲۲	۲/٤٤	٤/۹	۹/۷۸	۱۹/٥۳	۳۹/۰٦	۷۸/۱	۱٥٦/۲٥	۳۱۲/٥	٦۲٥	۱۲٥۰
قطر هاله	۱۰	۱۳	۱٤	۱۷	۲۱	۲٤	۲۷	۳۰	۳۳	۳٥	۳۹	٤۱
شماره ترکیب	۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	٦	٥	٤	۳	۲	۱
رقت نانو امولسیون بره موم	۳/٦٦	۷/۳	۱٤/٦٤	۲۹/۳	٥۸/٦	۱۱۷/۲	۲۳٤/٤	٤٦۸/۷٥	۹۳۷/٥	۱۸۷٥	۳۷٥۰	۷٥۰۰
رقت سیپروفلوکساسین	۰/٦۱	۱/۲۲	۲/٤٤	٤/۹	۹/۷۸	۱۹/٥۳	۳۹/۰٦	۷۸/۱	۱٥٦/۲٥	۳۱۲/٥	٦۲٥	۱۲٥۰
قطر هاله	۱۲	۱٥	۱۷	۱۹	۲۳	۲٥	۲۸	۳۲	۳٥	۳۸	٤۱	٤۳

سودوموناس ائروژینوزا یک باکتری گرم منفی است که همچنان به عنوان یکی از علل عمده عفونت‌های بیمارستانی فرصت‌طلب مطرح است. دلیل اصلی برجستگی آن به عنوان یک پاتوژن، مقاومت ذاتی آن به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های معمول است. عفونت‌های ایجاد شده با این نوع باکتری در جراحی‌ها و سوختگی‌ها ممکن است به صورت عفونت‌های پوستی سپتی سمی، پنومونی، مننژیت و غیره ظاهر شود. به طور کلی *سودوموناس ائروژینوزا* ۲۳ درصد از کل باکتری‌های جدا شده از بیماران، ۱۶ درصد از پنومونی‌های بیمارستانی، ۱۲ درصد از عفونت‌های مجاری ادراری کسب شده از بیمارستان، ۸ درصد از عفونت‌های زخم بعد از عمل جراحی و ۱۰ درصد از عفونت‌های خون بیمارستانی را تشکیل می‌دهد(۱۹). امروزه از فلوروکوئینولون‌ها به طور وسیع در درمان عفونت‌های سودوموناسی استفاده می‌شود(۲۰) و این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط آزمایشگاهی دارای تأثیرات مثبت چشمگیری بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مولد عفونت‌های مختلف می‌باشند(۲۱).

با توجه به شیوع بالای عفونت‌های ناشی از *سودوموناس ائروژینوزا*، اثرات جانبی آنتی‌بیوتیک‌های رایج و نیز بروز مقاومت سویه‌های مختلف این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی، استفاده از روش‌های نوین در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری ضروری به نظر می‌رسد. بروز مقاومت‌های دارویی و توانایی باکتری‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد سبب شده است تا علاقه مجددی به گیاهان و ترکیبات طبیعی به منظور بررسی اثرات ضدمیکروبی آنها به وجود آید(۲۲)، در مطالعه حاضر نیز از عصاره اتانولی بره موم به عنوان ترکیبی ضد میکروبی برعلیه *سودوموناس ائروژینوزا* استفاده شد. پژوهش‌های زیادی پیرامون عصاره اتانولی بره موم (تحت عنوان ترکیبات ضدمیکروبی) صورت گرفته است. کرو و همکاران، به مطالعه اثر عصاره الکلی بره موم پنج منطقه جغرافیایی مختلف؛ مرز ایران و ترکیه، سیبری و سه منطقه مدیترانه پرداختند. آنها درصد ترکیبات بره موم این مناطق را مقایسه و تفاوت پوشش گیاهی این مناطق را عامل تفاوت در ترکیبات

بره موم آنها دانستند. هم‌چنین به تعیین فعالیت ضد میکروبی بره موم این پنج منطقه بر روی تعدادی از میکروب‌های مخاط دهان پرداختند و نتایج نشان داد که بره موم مناطق مختلف اثرات ضد میکروبی متفاوتی دارد(۲۳).

لیبریو و همکاران به بررسی تأثیر بره موم تولید شده از زنبوران عسل شمال شرق برزیل بر روی تعدادی از مهم‌ترین پاتوژن‌های حفره دهان شامل: *کاندیدا آلبیکانس*، *استرپتوکوکوس موتانس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* پرداختند. با بررسی منطقه‌های مهار رشد روی محیط کشت این میکروب‌ها نشان دادند که عصاره بره موم بر روی *استرپتوکوکوس موتانس* و *کاندیدا آلبیکانس* تأثیر خوبی داشت(۲۴).

هم‌چنین پژوهش‌های بی‌شماری در خصوص خواص فارماکولوژی بره موم وجود دارند از جمله خواص؛ ضدباکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان، ضد تومور و غیره. بره موم به فراوانی در زنبورستان‌های ایران یافت می‌شود و بسیاری از زنبورداران آن را به عنوان یک ماده مزاحم داخل کند و معرفی می‌کنند و بعد از هر بار برداشت عسل از کندو بره موم را جدا کرده و دور می‌ریزند. امروزه در بسیاری از کشورهای دنیا بره موم در محصولات آرایشی بهداشتی، دارویی و غذایی به عنوان یک ماده طبیعی سالم با قیمت بالا در اختیار مشتریان قرار می‌گیرد(۲۵).

آهنگری و همکاران بره موم کندوهای زنبور عسل استان آذربایجان غربی را به کمک اتانول عصاره‌گیری کردند و رقت‌های مختلف از عصاره اتانولی بره موم را بر روی کراتیت تجربی در خرگوش بررسی کرده و با نیستاتین به عنوان داروی استاندارد مقایسه کرده‌اند. آنها نتیجه گرفتند که ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره اتانولی بره موم می‌تواند کراتیت ناشی از *کاندیدا آلبیکانس* را به طور کامل و در دوره زمان کوتاه‌تری نسبت به نیستاتین درمان کند(۲۶).

خسروی و همکاران تأثیر عصاره الکلی بره موم با حلال‌های اتانول و دی‌میتل‌سولفواکساید به روش تعیین قطر هاله مهار رشد MIC و MBC انجام دادند و میانگین حداقل غلظت بازدارنده رشد برای باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* ۰/۶۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌متر برای حلال اتانول به دست آمد(۲۷) نشوه و همکاران فعالیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی بره موم بر ضد باکتری‌های بیماری‌زا انسانی را بررسی کردند و نشان دادند که غلظت بالاتر از ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره اتانولی بره موم از رشد *اشریشیا کلی* ممانعت به عمل می‌آورد(۲۸) با این که مطالعه مذکور برروی باکتری‌های بیماری‌زا انسانی انجام شده بود، ولی تا حدود زیادی با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت.

به دلیل خواص و ویژگی‌های جدیدی که مواد با ابعاد نانومتری از خود نشان داده‌اند امروزه تمایل بسیار زیادی به فراوری و کاربرد آنها وجود دارد. به

طور اساسی، ویژگی‌های مربوط به نسبت بین سطح و حجم ماده در مقیاس نانومتری تغییرهای چشمگیری از خود نشان می‌دهند. نانوفناوری زیستی یکی از امیدوار کننده‌ترین حوزه‌های علم و فناوری نانو در عصر جدید است. این فناوری در حوزه‌های گوناگون علم از جمله زیست‌شناسی در حال ظهور است(۲۹). در سال‌های اخیر با توجه به معضلات استفاده طولانی مدت از آنتی‌بیوتیک‌ها، انجام پژوهش‌ها حول محور شناخت فرآورده‌ها و ترکیبات جدید مؤثر برعلیه باکتری‌های گرم منفی و مثبت مسبب عفونت‌های مختلف و به طور شاخص، عفونت‌های سودوموناسی در شرایط آزمایشگاهی و یا در عفونت‌های تجربی ایجادشده در مدل‌های حیوانی افزایش یافته است هم افزایی بین دو داده عبارت است از بر همکنش مثبت و تقویت اثر دو دارو در هنگام ترکیب با یکدیگر، که اثر مهاری بیش‌تری از مجموع اثر هر کدام از این مواد به تنهایی ایجاد کرده و سبب کاهش دوز مصرف یکی یا هر دو ماده می‌شود(۳۰). پژوهش‌های فراوانی روی اثر هم افزایی داروها ترکیبات مختلف با یکدیگر انجام شده از آن جمله می‌توان به مطالعه میرزایی و همکاران بر روی اثر ضد میکروبی پپتید گیاهی MBP1 و نانو ذره نقره و ترکیب آنها بر علیه عفونت پوستی ناشی از *سودوموناس ائروژینوزا* اشاره کرد.

انلن و همکاران جهت درمان کراتیت تجربی ایجاد شده ناشی از *سودوموناس ائروژینوزا* در خرگوش از بره موم و ترکیب بره موم و سیپروفلوکساسین استفاده کردند و نتایج آنها نشان داد بره موم به تنهایی تأثیر محدودی بر روی درمان کراتیت ایجاد شده دارد، اما ترکیب بره موم و سیپروفلوکساسین دارای بیشترین تأثیر در درمان کراتیت تجربی ایجاد شده در این مطالعه را داشت(۳۱).

در مطالعه میحائیلی و همکاران، اثرات هم افزایی عصاره اتانولی بره موم رومانیایی و پنج آنتی‌بیوتیک(آموکسی سیلین کلاوونالیک اسید، تتراسایکلین، جنتامایسین، انروفلوکساسین و فلورفنیکل) بر علیه اشریشیا کلی جدا شده از تورم پستان گاو را بررسی کردند و نشان دادند عصاره اتانولی بره موم در ترکیب با تمام آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده اثر هم افزایی دارد(۳۲). هم‌چنین در مطالعه پریتی کالیا اثر هم‌افزایی عصاره اتانولی بره موم با آنتی‌بیوتیک سفکسیم علیه *سالمونلا انتریکا سروار تایفی موریوم* نیز به اثبات رسید(۱۴) که نتایج این پژوهش‌ها با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت. در مطالعه حاضر از عصاره اتانولی بره موم و نانوامولسیون بره موم به عنوان ترکیبات ضد میکروبی بر علیه *سودوموناس آئروژینوزا* استفاده شد. پژوهش‌های زیادی پیرامون عصاره اتانولی بره موم تحت عنوان ترکیبات ضد میکروبی صورت گرفته است، اما بر اساس دانسته‌های حاضر تاکنون هیچ مطالعه‌ای پیرامون تأثیر نانوامولسیون بره موم علیه گونه‌های مختلف باکتریایی به خصوص *سودوموناس*

و اثر هم افزایی آن با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف وجود ندارد. بنابراین این مطالعه اولین پژوهش در خصوص تهیه و بررسی خواص ضدمیکروبی نانو امولسیون بره موم است که انجام شده است. از این رو لازم است پژوهش‌های بیشتری به وسیله محققان دیگر و با استفاده از بره موم مناطق مختلف دنیا انجام گیرد.

مطالعه حاضر نشان داد که نانوامولسیون بره موم در ترکیب با سیپروفلوکساسین دارای اثر هم افزایی ضد میکروبی بر علیه *سودوموناس ائروژینوزا* می‌باشد و دوز مصرف ترکیب این دارو و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین نسبت به دوز مصرف ترکیب عصاره اتانولی بره موم و آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین کمتر بود.

کسب مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به وسیله *سودوموناس ائروژینوزا*، از مشکلات درمان انحصاری آنتی‌بیوتیکی عفونت‌های ناشی از این باکتری می‌باشند. بنابراین، ترکیب بره موم ونانوامولسیون بره موم همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند ایده مناسبی جهت کاهش وقوع مقاومت دارویی باشد و به عنوان راهکار درمانی مؤثر مورد استفاده قرار گیرد؛ لذا نیاز به پژوهش‌ها و بررسی‌های بیشتر در خصوص ترکیب ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی و بره موم مناطق مختلف دنیا با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر روی سویه‌های مختلف و مقاوم باکتریایی می‌باشد. در مطالعه حاضر نانوامولسیون بره موم برای اولین بار با اندازه ۱۵۶/۸ نانومتر با روش امولسیون‌سازی با انرژی بالا با استفاده از دستگاه مولد امواج ماورای صوت وآنالیزآن به وسیله دستگاه پراکندگی نور دینامیکیDLS تهیه شد و خواص ضد میکروبی آن بررسی شد. در این مطالعه نانوامولسیون بره موم در مقایسه با عصاره اتانولی بره موم فعالیت ضدمیکروبی بهتری از خود نشان داد.

با توجه به عدم کارایی آنتی‌بیوتیک‌های موجود در از بین بردن باکتری سودوموناس و نیز عوارض ناشی از مصرف بی‌رویه و نامناسب آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک و از طرفی به دلیل در دسترس بودن ترکیبات طبیعی در داخل کشور لذا، پیشنهاد می‌شود با توجه به ناکامی درمان‌های آنتی‌بیوتیکی از جمله(بروز سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها) علیه عفونت‌های باکتریایی و همچنین داشتن عوارض جانبیآنتی‌بیوتیک‌ها انجام پژوهش‌های جدی‌تر و کاربردی‌تر پیرامون استفاده از ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی با عوارض جانبی کم به منظور درمان بالینی این گونه عفونت‌ها حایز اهمیت بوده و مدنظر محققین محترم قرار بگیرد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی در این بررسی برای اولین بار نشان داده شد که می‌توان نانوامولسیونی از عصاره اتانولی بره موم تهیه کرد که این ترکیب نانوامولسیون دارای خواص ضد باکتریایی بسیار مؤثری برعلیه *سودوموناس ائروژینوزا* در شرایط آزمایشگاه باشد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد ترکیب عصاره

اتانولی بره موم و نانوامولسیون بره موم با سیپرو فلوکساسین منجر به تأثیرگذاری بیشتر دارو بر روی ارگانیسم می‌شود. بنابراین استفاده توأم عصاره بره موم و نانوامولسیون بره موم با سیپروفلوکساسین دارای اثر هم‌افزایی بوده و در نتیجه میزان دوز مصرفی هر کدام از ترکیبات و مدت زمان لازم جهت از بین بردن باکتری در مقایسه با استفاده هر کدام از آنها به تنهایی کاهش می‌یابد. هم‌چنین استفاده توأم آنها امکان دارد شانس بروز جهش‌های ژنتیکی را به منظور مقاومت در برابر دارو در باکتری نیز کاهش دهد.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر حاصل بخشی از پایان نامه دانشجویی مقطع دکتری باکتری شناسی دانشگاه ارومیه با کد اخلاق Ref.No: AECVU-184-2008 می‌باشد، که با حمایت این دانشگاه انجام شد. نویسندگان مقاله از بخش میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، پژوهشکده نانوفناوری و مرکز میکروسکوپ الکترونی دانشگاه ارومیه و تمام کسانی که داوطلبانه در انجام این پروژه یاری کرده‌اند تشکر و قدردانی می‌نماید.

REFERENCES

1.Dashtizadeh Y, Moattari A, Gorzin AA. Phenotypic and genetically evaluation of the prevalence of efflux pumps and antibiotic resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa among burned patients admitted to Ghotbodin Shirazi Hospital. J M 2014; 7(19): 118-27.

2.Vanhems P, Lepape A, Savey A, Jambou P, Fabry J. Nosocomial pulmonary infection by antimicrobial-resistant bacteria of patients hospitalized in intensive care units: risk factors and survival. Journal of Hospital Infection 2000; 45(2): 98-106.

3.Parmar P, Salman A, Kalavathy CM, Kaliamurthy J, Prasanth DA, Thomas PA, et al. Comparison of topical gatifloxacin 0.3% and ciprofloxacin 0.3% for the treatment of bacterial keratitis. American Journal of Ophthalmology 2006; 141(2): 282-6.

4.Popova M, Trusheva B, Antonova D, Cutajar S, Mifsud D, Farrugia C, et al. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. Food Chemistry 2011; 126(3): 1431-5.

5.Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? Journal of Ethnopharmacology 2011; 133(2): 253-60.

6.Alencar S, Oldoni T, Castro M, Cabral I, Costa-Neto C, Cury J, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. Journal of Ethnopharmacology 2007; 113(2): 278-83.

7.Basim E, Basim H, Özcan M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. Journal of Food Engineering 2006; 77(4): 992-6.

8.Cardoso RL, Maboni F, Machado G, Alves SH, de Vargas AC. Antimicrobial activity of propolis extract against Staphylococcus coagulase positive and Malassezia pachydermatis of canine otitis. Veterinary Microbiology 2010; 142(3): 432-4.

9.Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia 2002; 73: S1-6.

10.Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamedi M, Amanzadeh Y, Ebrahimi SES, Ostad SN. Antioxidant power of Iranian propolis extract. Food Chemistry 2007; 103(3): 729-33.

11.Menezes H, Bacci Jr M, Oliveira S, Pagnocca F. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. Apidologie 1997; 28(2): 71-6.

12.Silva HD, Cerqueira MÂ, Vicente AA. Nanoemulsions for food applications: development and characterization. Food and Bioprocess Technology 2012; 5(3): 854-67.

13.Elgadira MA, Adam A. Selected drug delivery systems based on nanoemulsion. World Journal of Pharmaceutical Research 2014; 3(2):1796-1809.

14. Kalia P, Kumar NR, Harjai K. Synergistic effect of propolis with cefixime against Salmonella enterica serovar Typhimurium: An in vitro study. Indian Journal of Natural Products Resources. 2017; 8 (2): 140-5.

15.Gordon O, Slenters TV, Brunetto PS, Villaruz AE, Sturdevant DE, Otto M, et al. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2010; 54(3): 4208-18.

16. Lu LC, Chen YW, Chou CC. Antibacterial activity of propolis against Staphylococcus aureus. International Journal of Food Microbiology 2005; 102(2): 213-20.

17.Abouelkassem SH, Abdelrazeik A, Rakha O. Nanoemulsion of jojoba oil, preparation, characterization and insecticidal activity against Sitophilus oryzae (Coleoptera: Curculionidae) on wheat. International Journal of Agriculture Innovations and Research 2015; 4(1): 74-5.

18.Liu JW, Jang TN, Cheng YJ, Hsu GJ, Sun W, Lu CT, et al. Comparison of the Etest and broth microdilution method for tigecycline susceptibility testing against clinical isolates of Acinetobacter baumannii from Taiwan. International Journal of Antimicrobial Agents 2010; 35(2): 201-2.

19. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerging Infectious Diseases 1998; 4(4): 551.

20. Deschaght P, De Baets F, Vaneechoutte M. PCR and the detection of Pseudomonas aeruginosa in respiratory samples of CF patients. A literature review. Journal of Cystic Fibrosis 2011; 10(5): 293-7.

21.Banoee M, Seif S, Nazari ZE, Jafari-Fesharaki P, Shahverdi HR, Moballegh A, et al. ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 2010; 93(2): 557-61.

22.Heydari MA, Mobini M, Salehi M. The synergic activity of eucalyptus leaf oil and silver nanoparticles against some pathogenic bacteria. Archives of Pediatric Infectious Diseases 2017; 5(4): 61654-59

23.Koru O, Toksoy F, Acikel CH, Tunca YM, Baysallar M, Guclu AU, et al. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. Anaerobe 2007 ; 13(2) : 140-5.

24. Liberio SA, Pereira ALA, Dutra RP, Reis AS, Araújo MJA, Mattar NS, et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee Melipona fasciculata Smith. BMC Complementary and Alternative Medicine 2011; 11(1): 108.

25.Ownagh A, Tukmechi A, Adibhesam M, Ebrahimzadeh S. Comparative study on the effect of ethanol extract of propolis collected from west Azarbaijan apiaries against dermatophytes and non-dermatophytes fungi. Urmia Medical Journal 2010; 21(3): 206-14.

26.Ahangari AA, Ownagh A, Tehrani A, Tukmechi A. The effects of ethanol extract of propolis (EEP) on the experimentally induced candida keratitis in rabbits. Tehran University Medical Journal 2011; 69(1): 22-8

27.Khosravi N, Darvishi SH, Davari K. Antibacterial properties of alcoholic extract of propolis of Kurdistan on pseudomonas aeroginosa, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences 2015; 20(3): 97-106.

28.Neshvh M, Nazeri S. Antibacterial activity of ethanolic extract of propolis against human Bacterial pathogens. Proceeding of the First National Congress of Biology and Natural Sciences: 2014 Dec 594-9 Tehran, Iran

29.Narayanan KB, Sakthivel N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. Advances in Colloid and Interface Science 2011; 169(2): 59-79.

30.Biavatti MW. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009; 45(3): 371-8.

31.Onlen Y, Tamer C, Oksuz H, Duran N, Altug ME, Yakan S. Comparative trial of different anti-bacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on Pseudomonas keratitis in rabbits. Microbiological Research 2007; 162(1): 62-8.

32.Niculae M, Laura S, Emoke P, Pastiu AI, Balaci IM. In vitro synergistic antimicrobial activity of romanian propolis and antibiotics against escherichia coli isolated from bovine mastitis. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 2015; 43(2): 327.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Evaluation of the Antibacterial Effect of Propolis Nanomaterials, Propolis Ethanolic Extract, Ciprofloxacin and Their Combination Against *Pseudomonas aeruginosa*

Archin T[1], Onagh AG[1*], Tehrani AA[2], Kashipour S[3]

[1]Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran, [2]Department of Pathobiology, Urmia University, Urmia, Iran, [3]Department of Nanochemistry, Nanotechnology Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 11 Jan 2019 Accepted: 09 Jun 2019

Abstract

Background & aim: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important opportunistic pathogens. Due to the increased use of antibiotics and the risk of their resistance, studies on the detection of natural antibacterial compounds have increased. Hence, the aim of the present study was to determine and evaluate the antibacterial effect of propolis nanomaterials, ethanosybenic anodic anodomic extracts of propolis, ciprofloxacin.

Methods: In the present experimental study, which was conducted at the University of Urmia in 2018, high-energy propolis nanoparticles were prepared using ultrasonic waves. Then the antimicrobial effect of propolis ethanolic extract, propolis nanoamulsion alone, ciprofloxacin alone and their combined combination (propolis + ciprofloxacin, propolis cyanide + ciprofloxacin nanoparticles) by microenvironmental microenvironmental microenvironmental and microbial methods *Pseudomonas aeruginosa* was diagnosed. Data were analyzed using one-way variance test. In this study, high-energy propellant nanoemulsion was prepared using ultrasound waves. Antibacterial effect of ethanolic extract of propolis, propolis nanoemulsion, Ciprofloxacin alone and their combinations (EEP+Ciprofloxacin and propolis nanoemultion + ciprofloxacin), were determined. For determination of MIC, MBC and FIC of each substance, Broth microdilution and Disk diffusion test were used. Data Statistical analysis was performed using SPSS software and one-way ANOVA test.

Results: First, 8,156 nm of propolis extract was prepared from propolis nanoparticles. The results of MIC and MBC experiments indicated that the minimum inhibitory concentration of alcoholic propolis extract extract and propolis nanomaterials against *Pseudomonas aeruginosa* was 1000 and 46.88 micrograms per milliliter, respectively. Moreover, the evaluation of the combined effect of propolis extract and propolis nanomaterials with ciprofloxacin is 9.46 2 2.44, 7.3 22 1.32 µg / ml, respectively. Furthermore, platelets containing combined propolis nanoamulsion dissociation disks with ciprofloxacin with concentrations of 1.32 7 3.7, micrograms per milliliter of halo growth, respectively, caused a growth of 15 mm in diameter, while single-use nanograms per 6 milli6 milligrams of propolis The growth control halo was 15 mm larger.

Conclusion: In the present study, for the first time, nanoamulsion was prepared from the ethanolic extract of propolis, which alone and in combination with ciprofloxacin has the effects of inhibiting growth inhibition and high elongation on *Pseudomonas aeruginosa*. It had a synergistic effect and as a result, the dose of each of the compounds and the time required to kill the bacterium was reduced by comparing the use of each of them alone.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Ciprofloxacin, Propolis Nanoemulsion, Ethanolic extract of propolis

[*]**Corresponding author: Onagh AG,** Urmia, Urmia University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology

Email: ownagh@yahoo.com

Please cite this article as follows:

Archin T, Onagh AG, Tehrani AA, Kashipour S. Evaluation of the Antibacterial Effect of Propolis Nanomaterials, Propolis Ethanolic Extract, Ciprofloxacin and Their Combination Against *Pseudomonas aeruginosa.* Armaghane-danesh 2020; 25(1): 22-39.