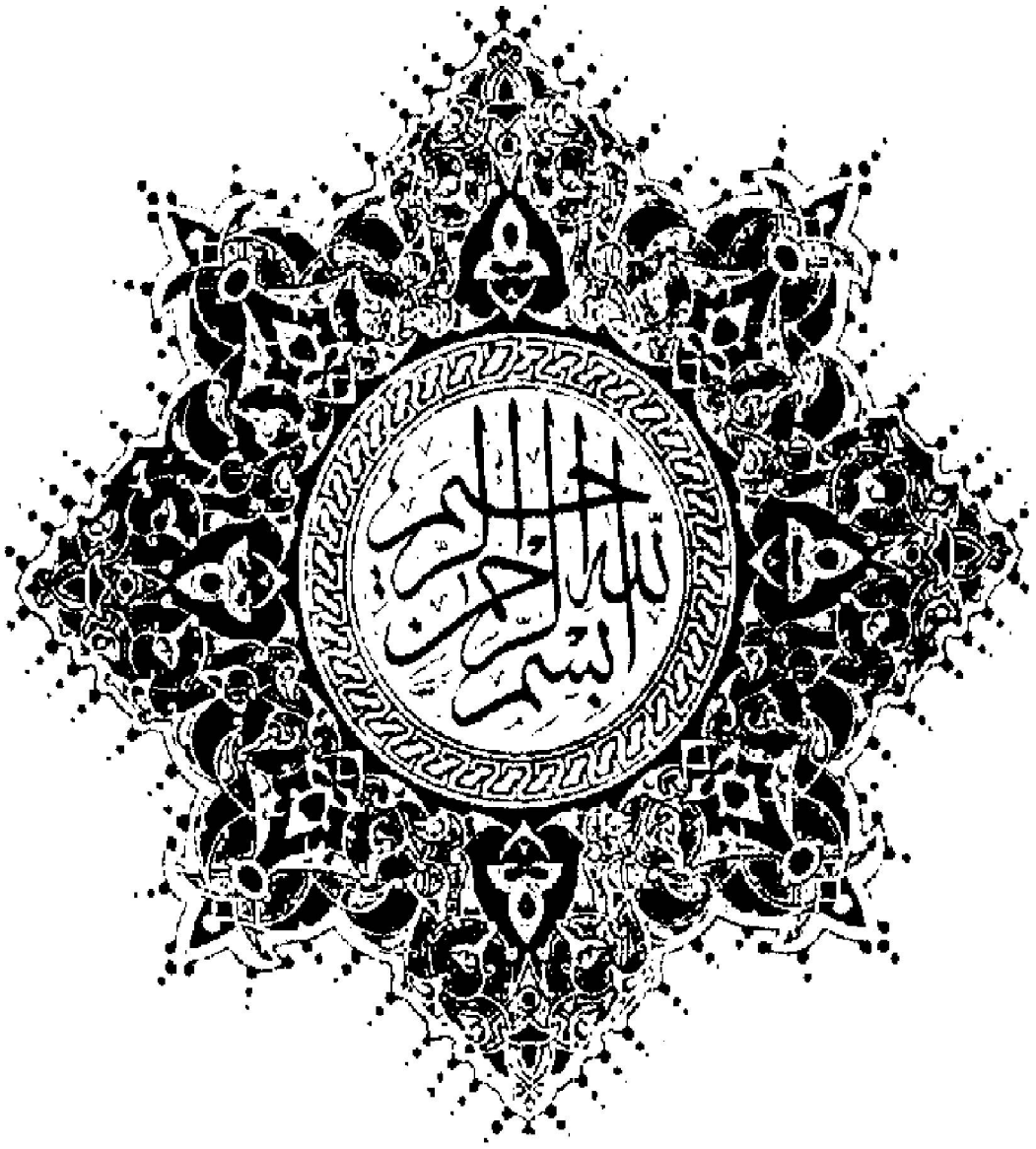

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم دارویی

دانشکده علوم و فناوری های نوین، گروه زیست شناسی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.Sc)

گرایش میکروبیولوژی

عنوان

ارزیابی اثر ضدمیکروبی نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، دارچین و مورد بر روی میکروب های شایع در سینوزیت عفونی

استاد راهنما

جناب آقای دکتر منصور بیات

اساتید مشاور

سرکار خانم دکتر ستاره حقیقت، جناب آقای دکتر افشین محسنی فر

نگارش

سوسن قربانی درآباد

مرجع تاریخ و هه

شماره پایان نامه 52 م سال تحصیلی 93-1392

منابع پارس پژوهه

سپاسگزاری

سپاس و ستایش خداوند متعال که به من توان و اراده داد تا این پایان‌نامه را به انجام برسانم. از زحمات بی‌دریغ و راهنمایی‌های ارزشمند استاد گرامی، جناب آقای دکتر [نام]، که با صبر و حوصله فراوان در تمامی مراحل این تحقیق یار و راهنمای من بودند، صمیمانه سپاسگزارم. بدون حمایت‌های علمی و معنوی ایشان، به‌ویژه در مرحله تحلیل داده‌ها و نگارش نهایی، به پایان رساندن این رساله ممکن نبود.

از استاد مشاور گرانقدر، سرکار خانم دکتر [نام]، به‌خاطر پیشنهادهای سازنده و نکته‌سنجی‌های دقیقشان در جلسات مشاوره، کمال قدردانی را دارم. همچنین از داوران محترم، آقای دکتر [نام] و خانم دکتر [نام]، که با دقت نظر و ارائه ایرادات و پیشنهادهای ارزشمند، به غنای علمی این پژوهش افزودند، تشکر می‌کنم.

از همکاران و دوستانی که در مراحل مختلف اجرای پژوهش، به‌ویژه در گردآوری داده‌ها و تحلیل آماری، یاری‌رسان بودند، به‌ویژه [نام]، [نام] و [نام]، صمیمانه سپاسگزارم. در پایان، از همسر و خانواده عزیزم که با صبر و شکیبایی، پشتیبان اصلی من در طول این دوره بوده‌اند، قدردانی می‌کنم.

تقدیم به

به بهترین و والاترین های وجودم،

پدر و مادر عزیزم که وزنکم از نگاهشان همواره جلب شد و از صمیم قلب آرزو می کنم همیشه دعاهای شما بدرقه راهم و نگاه های شما چراغ قلبم.

منابع پارس پژوهه

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

خلاصه فارسی ..... ح

فصل اول کلیات

1-1 سینوزیت 3
2-1 شیوع سینوزیت 4
3-1 عوامل مستعد کننده سینوزیت 4
4-1 منشأ سینوزیت 5
1-4-1 سینوزیت با منشأ آلرژیک 5
2-4-1 سینوزیت با منشأ ویروسی 6
3-4-1 سینوزیت با منشأ قارچی 6
4-4-1 سینوزیت با منشأ باکتریایی 6
5-1 انواع سینوزیت 8
1-5-1 سینوزیت حاد 8
1-1-5-1 علائم بالینی سینوزیت حاد 8
2-1-5-1 تشخیص و درمان سینوزیت حاد 8
2-5-1 سینوزیت مزمن 9
1-2-5-1 علائم بالینی سینوزیت مزمن 9
2-2-5-1 تشخیص و درمان سینوزیت مزمن 9
6-1 عوارض سینوزیت 9
7-1 مشخصات باکتری های مورد آزمایش 10
1-7-1 مشخصات کلی استرپتوکوک ها 10
1-1-7-1 استرپتوکوک پیوژن 11
1-1-1-7-1 بیماری زایی 12
2-1-1-7-1 تست های تشخیصی 12
3-1-1-7-1 درمان 13
2-1-7-1 استرپتوکوک پنومونیه 13
1-2-1-7-1 تست های تشخیصی 14
2-2-1-7-1 بیماری زایی 15
3-2-1-7-1 درمان 15

مرکز پارس تز وهه

2-7-1 مشخصات کلی استافیلوکوک ها 16
1-2-7-1 استافیلوکوک اورئوس 16
1-1-2-7-1 تست های تشخیصی 17
2-1-2-7-1 بیماری زایی 18
3-1-2-7-1 درمان 18
3-7-1 مشخصات کلی پسودوموناس ها 19
1-3-7-1 پسودوموناس آئروژینوزا 19
1-1-3-7-1 تست های تشخیصی 21
2-1-3-7-1 بیماری زایی 21
3-1-3-7-1 درمان 21
8-1 تاریخچه درمانی گیاهان دارویی 22
1-8-1 ویژگی های خاص تولید گیاهان دارویی 23
2-8-1 شکل های مصرف گیاهان دارویی 23
9-1 ویژگی های گیاهان دارویی مورد آزمایش 23
1-9-1 گیاه درمنه 23
1-1-9-1 ترکیبات شیمیایی و اسانس گیاه 24
2-1-9-1 خواص درمانی 25
2-9-1 گیاه اسطو خودوس 25
1-2-9-1 ترکیبات شیمیایی و اسانس گیاه 26
2-2-9-1 خواص درمانی 26
3-9-1 گیاه دارچین 26
1-3-9-1 ترکیبات شیمیایی و اسانس گیاه 29
2-3-9-1 خواص درمانی 30
4-9-1 گیاه مورد یا مورت 31
1-4-9-1 ترکیبات شیمیایی و اسانس گیاه 32
2-4-9-1 خواص درمانی 33
10-1 اسانس های گیاهی 33
11-1 نانواسانس های گیاهی 34
1-11-1 کیتوزان 34
12-1 بررسی اثرات ضد میکروبی 36
13-1 تعیین MIC به روش میکرودایلوشن (ریز رقت) 36
1-13-1 متغیر های مؤثر در انجام آزمون MIC 37
2-13-1 تعیین MBC 37

3-13-1 دیسک دیفیوژن 37
1-3-13-1 دینامیک تشکیل هاله 38
2-3-13-1 دیسک های آنتی بیوتیک 38
4-13-1 انتشار در آگار (چاهک)..... 38
14-1 روش های تهیه سوسپانسیون 39
15-1 بیان مسئله 39
16-1 ضرورت اهمیت موضوع 40
17-1 اهداف تحقیق 41
1-17-1 هدف کلی 41
2-17-1 هدف اختصاصی 41
18-1 فرضیات تحقیق 41
19-1 سوالات تحقیق 41

فصل دوم مروری بر متون گذشته

1-2 سوابق تحقیق در ایران و سایر کشور ها در زمینه استفاده از اسانس ها و نانواسانس های گیاهی 44

فصل سوم مواد و روش کار

1-3 دستگاه های مورد نیاز 49
2-3 مواد و وسایل مورد نیاز 49
1-2-3 سوش های میکروبی مورد مطالعه 51
2-2-3 اسانس های مورد مطالعه 51
3-3 روش کار 52
1-3-3 روش تهیه نانواسانس های درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین 52
1-1-3-3 تهیه محلول کیتوزان 52
2-3-3 روش تهیه محیط کشت اولیه برای رشد 54
1-2-3-3 محیط BHI 54
2-2-3-3 محیط MHA 54
3-2-3-3 محیط BA 54
3-3-3 فعال کردن باکتری ها و انتقال آن ها به محیط کشت 55
4-3-3 روش تهیه محلول سوسپانسیون میکروبی 55
5-3-3 روش ساخت کدورت های استاندارد مک فارلند 55
6-3-3 تعیین MIC با روش میکرودایلوشن 56
1-6-3-3 روش علمی تعیین MIC 56
7-3-3 تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری یا MBC 58

متابع زیرس یزوهه

8-3-3 روش انتشار در آگار (دیسک کاغذی)..... 58
1-8-3-3 دیسک های آنتی بیوتیک مورد آزمایش (شاهد مثبت) 59
9-3-3 روش انتشار در آگار (چاهک)..... 59

فصل چهارم نتایج

1-4 شرح مختصری از مطالعه..... 62
2-4 نتایج FTIR ترکیبات نانواسانس ها 62
3-4 نتایج حاصل از پراکندگی نور دینامیکی برای مطالعه اندازه نانوذرات..... 64
4-4 نتایج microscope Scanning electron مربوط به اسانس های نانوکپسول شده..... 65
5-4 نتایج microscope Transmission electronمربوط به اسانس های نانو کپسول شده..... 66
6-4 نتایج آزمون تعیین حساسیت 67
1-1-6-4 نتایج MIC نانواسانس ها..... 69
2-1-6-4 نتایج MIC اسانس ها..... 69
3-1-6-4 نتایج MBC اسانس ها و نانواسانس ها..... 70
2-6-4 نتایج اثرات ضد میکروبی نانواسانس ها به روش انتشار دیسک و مقایسه با چند آنتی بیوتیک رایج.. 76
3-6-4 نتایج آزمایش انتشار در آگار(چاهک)..... 79
1-5 بحث 84
2-5 نتیجه گیری 90
3-5 پیشنهادات 90

منابع 91
چکیده لاتین 95

مرکز پژوهش

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول 3-1 روش تهیه استاندارد لوله های مک فارلند 56
جدول 4-1 نتایج آزمایش MIC و MBC نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد 68
جدول 4-2 نتایج آزمایش MIC و MBC اسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد، دارچین بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر µg/ml.....69
جدول 4-3 قطر هاله عدم رشد سویه های میکروبی مورد آزمایش در برابر تعدادی از دیسک های آنتی بیوتیکی متداول در آزمایش دیسک دیفیوژن 78

منابع پارس پژوهه

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار 4-1 نمودارحداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر استرپتوکوک پنومونیه 72

نمودار 4-2 نمودار حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر استرپتوکوک پنومونیه 72

نمودار 4-3 نمودارحداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر استرپتوکوک پیوژن 73

نمودار 4-4 نمودارحداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر استرپتوکوک پیوژن 73

نمودار 4-5 نمودارحداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر استافیلوکوک اورئوس 74

نمودار 4-6 نمودارحداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر استافیلوکوک اورئوس 74

نمودار 4-7 نمودارحداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر پسودوموناس آئروژینوزا 75

نمودار 4-8 نمودارحداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر پسودوموناس آئروژینوزا 75

ممتاز پژوهه

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل 1-1 سینوس های پارانازال اطراف بینی و صورت 3
شکل 1-2 استرپتوکوک پیوژن رشد یافته در کشت خون 11
شکل 1-3 رنگ آمیزی گرم از خلط که در آن استرپتوکوک پنومونیه 13
شکل 1-4 رنگ آمیزی گرم استافیلوکوک اورئوس 17
شکل 1-5 رنگ آمیزی گرم پسودوموناس آئروژینوزا 20
شکل 1-6 گیاه درمنه 24
شکل 1-7 گیاه اسطوخودوس 25
شکل 1-8 گیاه دارچین 29
شکل 1-9 چوب و پودر دارچین 29
شکل 1-10 گیاه مورد 32
شکل 1-11 ساختار شیمیایی پلیمر کیتوزان 35
شکل 1-12 ساختار مولکولی کیتین 36
شکل 3-1 اسانس های تهیه شده از شرکت باریج اسانس کاشان 52
شکل 3-2 دستگاه اولترا سونی کیت در مرکز ژنتیک 53
شکل 4-1 نتایج طیف سنجی مادون قرمز حاصل از ترکیب بیوپلی ساکاریدی کیتوزان 63
شکل 4-2 نتایج طیف سنجی مادون قرمز حاصل از ترکیب اسید میرستیک 63
شکل 4-3 نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز دو ترکیب کیتوزان و اسید میرستیک در کنار هم 64
شکل 4-4 توزیع اندازه نانوذرات ترکیبات اسانس نانوکپسول شده با استفاده از دستگاه DLS 65
شکل 4-5 تصویر ساختار نانوکپسول های کیتوزان حاوی اسانس توسط میکروسکوپ الکترونی 66
شکل 4-6 تصویر ساختار نانوکپسول کیتوزان حاوی اسانس توسط میکروسکوپ الکترونی 66
شکل 4-7 میکروپلیت بعد از انجام آزمایش MIC 67
شکل 4-8 میکروپلیت بعد از انجام آزمایش MIC 68
شکل 4-9 پلیت کشت داده شده مربوط به تأثیر نانواسانس اسطوخودوس بر روی استرپتوکوک پیوژن بعد از آزمایش MIC بر روی محیط کشت بلاد آگار برای تعیین MBC 70
شکل 4-10 پلیت کشت داده شده مربوط به تأثیر نانواسانس دارچین بر روی استرپتوکوک پنومونیه بعد از آزمایش MIC بر روی محیط کشت بلاد آگار برای تعیین MBC 70
شکل 4-11 پلیت های کشت شده مربوط به تأثیر اسانس اسطوخودوس بر روی استافیلوکوک اورئوس بر روی محیط آگار برای تعیین MBC 71
شکل 4-12 پلیت های کشت داده شده مربوط به تأثیر اسانس مورد بر روی پسودوموناس آئروژینوزا بر روی محیط آگار برای تعیین MBC، رقت شماره 3 رقت MIC 71

منابع پایان نامه

شکل 4-13 پلیت های تلقیح شده با باکتری پسودوموناس آئروژینوزا حاوی دیسک های کاغذی آغشته به غلظت های مختلف نانواسانس اسطوخودوس 77
شکل 4-14 پلیت های تلقیح شده با باکتری استافیلوکوک اورئوس حاوی دیسک های کاغذی آغشته با غلظت های مختلف نانواسانس دارچین 77
شکل 4-15 پلیت تلقیح شده با باکتری استافیلوکوک اورئوس حاوی دیسک های آنتی بیوتیکی 78
شکل 4-16 پلیت تلقیح شده با پسودوموناس آئروژینوزا حاوی دیسک های آنتی بیوتیکی.....79
شکل 4-17 پلیت تلقیح شده با باکتری استرپتوکوک پیوژن حاوی دیسک های آنتی بیوتیکی 79
شکل 4-18 پلیت تلقیح شده با استافیلوکوک اورئوس. قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها به خوبی قابل مشاهده است.....80
شکل 4-19 پلیت تلقیح شده با پسودوموناس آئروژینوزا. قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها به خوبی قابل مشاهده است.....81
شکل 4-20 پلیت تلقیح شده با پسودوموناس آئروژینوزا با غلظت های مختلفی از نانواسانس درمنه 81
شکل 4-21 پلیت تلقیح شده با استافیلوکوک اورئوس با غلظت های مختلفی از نانواسانس مورد.....81

ممتاز پارس پژوهه

خلاصه فارسی

سینوزیت یکی از شایع ترین موارد در بین مراجعان به پزشک عمومی است که احتیاج به تجویز آنتی بیوتیک دارد. از جمله باکتری های شایع در ایجاد این بیماری می توان به استرپتوکوک پنومونیه، استرپتوکوک پیوژن، استافیلوکوک اورئوس و پسودوموناس آئروژینوزا اشاره کرد. امروزه با توجه به اثرات مضر داروهای شیمیایی بر بدن انسان، استفاده از روش های نوین فرمولاسیون مانند نانوکپسول کردن اسانس های گیاهی به دلیل کارایی بیشتر و همچنین کاهش عوارض سوء ناشی از کاربرد مستقیم آن ها مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه که به روش in vitro می باشد، اثر ضدمیکروبی چهار نوع نانواسانس گیاهی بر روی میکروارگانیسم های استرپتوکوک پنومونیه، استرپتوکوک پیوژن، استافیلوکوک اورئوس و پسودوموناس آئروژینوزا که از عوامل مهم سینوزیت می باشد در مقایسه با اسانس های طبیعی آن ها بررسی گردید، ابتدا تست کمی حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) و سپس تست کیفی (دیسک دیفیوژن) انجام گرفت. نتایج تست کمی MIC از نانواسانس های مورد بررسی در مورد استرپتوکوک پنومونیه با نانواسانس اسطوخودوس $0/097^{\mu g}/_{ml}$، استرپتوکوک پیوژن با نانواسانس درمنه و اسطوخودوس $0/097^{\mu g}/_{ml}$، استافیلوکوک اورئوس با نانواسانس درمنه $1/562^{\mu g}/_{ml}$ و در پسودوموناس آئروژینوزا با نانواسانس درمنه و اسطوخودوس $3/125^{\mu g}/_{ml}$ بدست آمد و نتایج بدست آمده در مقایسه با اسانس های طبیعی، تأثیر کمتر نانواسانس ها را نشان داد. و در تست دیسک دیفیوژن معلوم شد که نانواسانس ها قدرت رهایش از دیسک های کاغذی و انتشار در محیط جامد را ندارد.

نتایج، بیانگر اثرات خوب نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین بر روی چهار میکروارگانیسم های عامل سینوزیت می باشد و می توانیم به ساخت داروهای مناسب برای از بین بردن این میکروارگانیسم ها با منشأ گیاهی و با عوارض بسیار کمتر دارویی امیدوار باشیم.

واژه های کلیدی: نانواسانس، اسطوخودوس، درمنه، مورد، دارچین، MIC، MBC

مرجع پایان نامه

فصل اول

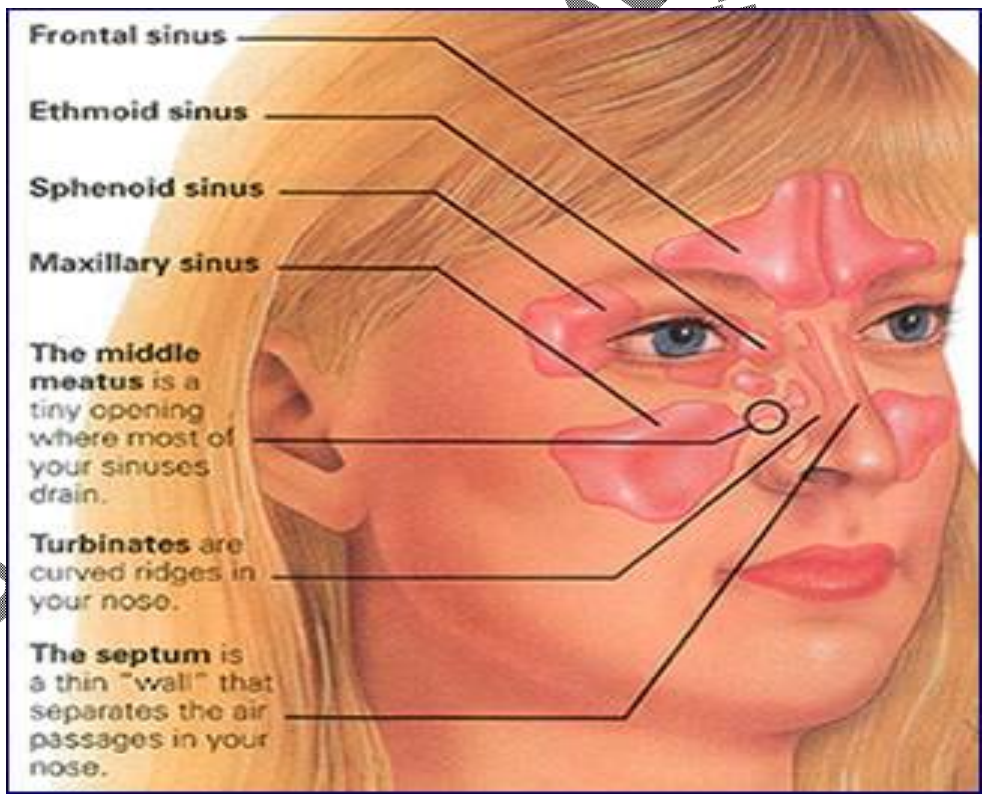
کلیات

منابع پارس پژوهه

1-1 سینوزیت[1]

سینوزیت عبارت است از یک تغییر التهابی در مخاط سینوس های پارانازال که علت آن می تواند آلرژی، ویروس، باکتری و ندرتا قارچ باشد[4].

سینوس های پارانازال، حفرات هوایی اطراف بینی هستند که توسط مخاط بینی پوشیده شده و از منافذی به فضای داخلی بینی راه می یابد و شامل فرونتال[2]، اتموئید[3]، ماگزیلاری[4] و اسفنوئید[5] می باشد(شکل 1-1)[28].



شکل 1-1 سینوس های پارانازال اطراف بینی و صورت

[1] Sinusitis
[2] Frontal
[3] Ethmoid
[4] Maxillary
[5] Sphenoid

سینوزیت شایع ترین بیماری درگیر کننده سینوس ها بوده و از نظر بالینی به سه نوع حاد (دوره بیماری کمتر از سه هفته)، تحت حاد (تداوم بیماری به مدت سه هفته تا سه ماه) و مزمن (دوره بیماری بیش از سه ماه) تقسیم می گردد[28]. سینوزیت در بیماری های سیانوتیک قلب، کاهش ایمونوگلوبولین ها، ایدز، لوله گذاری تراشه، سندروم مژه بی حرکت و عفونت های دندانی شیوع بیشتری دارد[4].

2-1 شیوع سینوزیت

سینوزیت یکی از شایع ترین علل مراجعه بیماران به پزشک می باشد[22]. سالانه در حدود 25 میلیون نفر در ایالات متحده امریکا هزینه ای نزدیک به 2 میلیون دلار به طور مستقیم بر سیستم پزشکی این کشور تحمیل می کند[34]. با توجه به آمار های ملی آمریکا، سینوزیت پنجمین بیماری تشخیصی است که برای آن آنتی بیوتیک تجویز می شود[23].

3-1 عوامل مستعد کننده سینوزیت

علاوه بر عواملی مانند عفونت ها، آلرژی، سرماخوردگی و نقص سیستم ایمنی که ممکن است هر فردی را مستعد ابتلا به سینوزیت کند، اختلالات آناتومیک و ساختار سینوس ها نیز در ابتلا به سینوزیت نقش دارد، از آن جایی که سینوس ها حفراتی توخالی در استخوان جمجمه و صورت هستند که توسط مجاری باریکی به داخل بینی راه دارد و از این طریق ترشحات داخل سینوس ها را به وسیله مژک های مخاط تنفسی به داخل بینی تخلیه می کنند ؛ هر علتی که باعث شود دهانه تخلیه سینوس ها به بینی تنگ یا بسته شود (این علت می تواند انحراف تیغه بینی، پولیپ و بزرگی شاخک های بینی و . . . باشد) باعث تجمع ترشحات در سینوس ها می شود و به دنبال آن سینوزیت وعفونی شدن این بخش از بدن رخ می دهد[20].

سینوزیت باکتریایی اغلب مولتی فاکتوریال است ولی شایعترین عوامل مستعدکننده آن، عفونتهای ویروسی مجاری تنفسی فوقانی و آلرژی هستند. به طور کلی 5 عامل به عنوان موارد مستعدکننده سینوزیت شناخته شده اند:

[۱] بیماری ها (عفونتهای تنفسی، رینیت[1] آلرژیک، فیبروز کیستی[2]، ضعف ایمنی، سندرم وگنر[3] و سندرم کارتاژنر[1])

[1] Rhinitis
[2] Cystic fibrosis
[3] Wegener syndrome

[۲] محرک ها (دود سیگار، آلودگی هوا، کلر)

[۳] عوامل آناتومیک (انحراف سپتوم بینی، هیپرتروفی آدنوییدال[2]، مژکهای بدون تحرک، پولیپ، تومور و جسم خارجی)

[۴] داروها (استفاده بیش از حد از داروهای ضد احتقان و سوء مصرف کوکایین)

[۵] تروما[3] (جراحی های دندان و شیرجه زدن)[65].

4-1 منشأ سینوزیت

درک کامل پاتوفیزیولوژی سینوزیت دست نیافتنی باقی مانده است اما چندین مسیر عفونی و التهابی شناخته شده است. عوامل میکروبی مانند ویروس ها، باکتری ها، قارچ ها و آلرژی از علل آن هستند، به خصوص در شرایط حاد. اما یکسری از فاکتور ها مانند میزبان و فاکتور های محیطی نیز به صورت مجزا یا در ترکیب با بیماری های مزمن نقش دارد[25].

1-4-1 سینوزیت با منشأ آلرژیک

فردی که زمینه ای از حساسیت داشته باشد مثلا به گرده گیاهان، مایت ها، پشم و موی حیوانات، کپک و گرد و غبار حساسیت داشته باشد، مستعد ابتلا به سینوزیت است. مخاط بینی افرادی که دچار این عارضه هستند رنگ پریده و ترشحاتشان شفاف و بی رنگ است ؛ درمان چنین سینوزیتی باید همراه با درمان آلرژی باشد. با توجه به این که این روزها عوامل آلرژی زا در محیط زندگی نسبت به زمان های گذشته بیشتر شده است، این نوع سینوزیت شیوع نسبتا بالاتری نسبت به انواع دیگر دارد. در واقع سینوزیت آلرژیک یکی از انواع معمول سینوزیت حاد است که به دلیل متورم و مسدود شدن راه های ارتباطی و دهانه سینوس ها توسط مواد آلرژیک از تخلیه سینوس ها جلوگیری کرده و سبب تجمع و عفونی شدن ترشحات می شود. حتی گاهی دیده می شود یک سینوزیت باکتریال روی یک سینوزیت آلرژیک سوار شده و سیر بیماری را بدتر می کند. این نوع سینوزیت با تب، سر درد و ترشحات پشت حلق همراه بوده و معاینات فیزیکی نشان دهنده احتقان در خور توجه در بینی و مخاط ادماتوز و خلط آبکی بینی می باشد[56,29].

---

[1] Katagener syndrome
[2] Adenoid hypertrophy
[3] Trauma

2-4-1 سینوزیت با منشأ ویروسی

تقریبا 50 درصد از سینوزیت های حاد کشت منفی دارند و اتیولوژی آنها ویروسی است ولی با این وجود احتمال اضافه شدن پاتوژن های تنفسی به آنها بسیار زیاد است[56].

در واقع آنفولانزا و سرما خوردگی باعث التهاب و تورم مخاط سینوس ها می شود که همین مسأله هم با افزایش ترشح، موجب انسداد روزنه ها می شوند و این یعنی شروع سینوزیت[29].

3-4-1 سینوزیت با منشأ قارچی

این نوع عفونت ها عمدتا در بیماران دیابتی و یا افراد دارای نقص ایمنی ممکن است در اثر نوعی قارچ به نام موکورمیکوزیس[1] به وجود آید. در بیماران با نقص ایمنی وجود دبری های سیاه و نکروتیک در ترشحات بینی نمایانگر وجود این قارچ می باشد[56,29].

عفونت های قارچی سینوس ها معمول نیستند؛ علاوه بر موکورمیکوزیس می توان آسپرژیلوس[2]، کاندیدیازیس[3]، هسیتوپلاسموزیس[4] و کوکسیدوئید[5] را نام برد که بیشترین پاتوژن در بین آنها آسپرژیلوس می باشد که از طریق بینی وارد شده و ممکن است به سینوس ها یا برونش ها یا ریه گسترش یابد. برای درمان سینوزیت قارچی گاهی نیاز به مصرف داروهای ضد قارچی است[56,29].

4-4-1 سینوزیت با منشأ باکتریایی

باکتری ها به طور طبیعی در مجاری تنفسی فوقانی به سر می برند، اما زمانی که سیستم ایمنی بدن ضعیف شود یا تخلیه سینوس ها به درستی انجام نگیرد، باکتری های محبوس شده تکثیر می یابند و عفونت ایجاد می کنند[25].

آسپیراسیون ترشحات سوراخ سینوس ها ی بیماران مبتلا به سینوزیت حاد، نشان دهنده آن است که *استرپتوکوک پنومونیه*[6] و *هموفیلوس آنفولانزا*[7] مهم ترین باکتری های پاتوژن در این ناحیه هستند. از دیگر ارگانیسم هایی که ممکن است در کشت ترشحات بیماران یافت شود می توان به *استرپتوکوک پیوژن*[8]،

---

[1] Mucormycosis
[2] *Aspergillus*
[3] Candidiasis
[4] Histoplasmosis
[5] Coccidiod
[6] *Streptococcus pneumoniae*
[7] *Haemophilus influenzae*
[8] *Streptococcus pyogenes*

موراکسلا کاتارالیس[1]، *استافیلوکوک اورئوس* [2]، *پسودوموناس آئروژینوزا*[3] و باکتری های بی هوازی همچون گونه های *پرووتلا* [4]، *پپتواستریتوکوکوس* [5] و *فوزوباکتریوم* [6] اشاره کرد[25].

از میان تمامی پاتوژن های فوق *استرپتوکوک پنومونیه* مهم ترین باکتری از نظر حدت و تأثیر بالینی می باشد که انتقال آن به طور مستقیم و یا از طریق جمعیت از جمله جمعیت مهد کودک ها یا مراکز مراقبت های طولانی تسهیل می شود. کودکان معمولا به شدت با *استرپتوکوک پنومونیه* کلونیزه می شوند اما بزرگسالان به نسبت کمتر در معرض قرار دارند[25].

در سینوزیت باکتریایی ترشحات معمولا رنگی (سبز، قهوه ای، نارنجی) و عفونی است. برای تشخیص باکتری عامل بیماری در گذشته پزشکان تأکید بر تهیه کشت از بینی و اوروفارنکس[7] داشتند در حالی که کشتی که از سینوس مستقیما تهیه می شود با کشتی که از این نواحی تهیه می شود تفاوت های بسیاری دارد. چون ارجاع همه بیماران برای کشت مقدور نیست آنتی بیوتیک انتخابی باید در برگیرنده اکثر عوامل عفونی باشد، در ابتدا آمپی سیلین[8] یا آموکسی سیلین[9] با بالاترین دوز ممکن تجویز می شود. اگر بیمار سابقه حساسیت به پنی سیلین[10] دارد می توان از اریترومایسین[11]استفاده کرد[20].

مطالعات نشان داده که اگر چه آمپی سیلین دیر به مخاط می رود ولی بعد از دو هفته اکثر موارد بهبود پیدا می کنند[20].

در بیمارانی که بعد از دو هفته جواب نمی دهند باید مشکوک به ارگانیسم های مولد بتالاکتاماز شد و با اضافه کردن یک آنتی بیوتیک دیگر مثل کلاوولینیک اسید[12] به آمپی سیلین آن را قوی تر نمود ویا سفالوسپورین [13]خوراکی که موثر بر ارگانیسم های مولد بتالاکتاماز است تجویز شود[20].

منابع پزشکی ترجمه

[1] *Moraxella catarrhalis*
[2] *Staphylococcus aureus*
[3] *Pseudomonas aeruginosa*
[4] *Prevotella*
[5] *Peptostreptococcus*
[6] *Fusobacterium*
[7] Oropharyngeal
[8] Ampicillin
[9] Amoxycillin
[10] Penicillin
[11] Erythromycin
[12] Clavulanic acid
[13] Cephalosporin

5-1 انواع سینوزیت

1-5-1 سینوزیت حاد

سینوزیت حاد معمولا به علت اضافه شدن عفونت باکتریال به یک سینوس مسدود ایجاد می شود ؛ انسداد اغلب به علت مخاط ادماتوز ناشی از عفونت ویروسی سیستم تنفسی فوقانی می باشد.

سینوزیت حاد معمولا فقط یک سینوس را درگیر می کند و سینوس اتموئید شایعترین مکان است[29]. اغلب به دنبال سرما خوردگی معمولی رخ می دهد اما می تواند به دنبال سرد شدن ناگهانی محیط یا شنا و شیرجه در آبهای آلوده نیز رخ دهد. جرم های شایع شامل پنومونیه و هموفیلوس می باشد ؛ بی هوازی ها نیز شایعند که اغلب منشا دندانی دارند. سینوزیت حاد اغلب شروع سریعی ندارد مگر به دنبال شنا و شیرجه زدن[4].

1-1-5-1 علائم بالینی سینوزیت حاد

علائم بالینی سینوزیت حاد شامل احساس پری بینی، سر درد، کاهش حس بویایی، سرفه، ترشح چرکی از بینی، درد دندان و احساس ترشح از پشت حلق می باشد. نشانه های آن شامل رنگ پریدگی مخاط بینی، وجود پولیپ بینی و انحراف سپتوم بینی می باشد. ترشحات چرکی بینی و درد صورت شایع ترین یافته بالینی در سینوزیت حاد می باشد[21,30].

2-1-5-1 تشخیص و درمان سینوزیت حاد

تشخیص سریع و درمان به موقع سینوزیت حاد در کاهش هزینه و کاهش عوارض بیماری ضروری است. بدین منظور تست های تشخیصی فراوانی استفاده می شود که شامل رادیوگرافی ساده سینوس، سی تی اسکن[1]، MRI [2]و چندین تست تشخیصی دیگر می باشد. درمان های موثر خوراکی عبارتند از آموکسی سیلین، آموکسی سیلین-کلاولانیک اسید ، کوتریموکسازول[3] و سفاکلر[4] می باشد[4].

[1] CT Scan
[2] Magnetic Resonance Imaging
[3] Cotrimoxazole
[4] Cefaclor

2-5-1 سینوزیت مزمن

سینوزیت مزمن ممکن است به دنبال حمله های پی در پی یا نادیده انگاشته شده سینوزیت حاد بروز می کند. به ویژه در صورت وجود نقص های سیستم های تنفسی و زهکشی به دلیل پولیپ های بینی یا مجرا های بسته شده سینوسی، سینوس ها دچار التهاب مزمن و تغییرات برگشت ناپذیر در مخاط می شوند[4].

1-2-5-1 علائم بالینی سینوزیت مزمن

ترشحات چرکی بینی و پشت حلق، مشکل در تنفس، از دست دادن بویایی و گهگاه سر درد از علائم شایع این عفونت است[4].

2-2-5-1 تشخیص و درمان سینوزیت مزمن

جهت تشخیص سینوزیت مزمن می توان از رادیوگرافی، CT اسکن و پونکسیون آنتروم استفاده کرد. عده ای از بیماران به شستشو، تجویز ضد احتقان های موضعی و سیستمیک، آنتی هیستامین، استروئید موضعی و آنتی بیوتیک پاسخ می دهند ولی اکثرا بیماران به جراحی نیاز پیدا می کنند[4].

6-1 عوارض سینوزیت

عوارض سینوزیت ندرتا بروز می کنند، با این حال می توانند جدی و بعضی اوقات تهدیدکننده حیات باشند. این عوارض ممکن است در اثر گسترش عفونت به صورت موضعی و یا هماتوژن به وجود آیند. شیوع این عوارض حدود یک در 10000 مورد سینوزیت در سال تخمین زده شده است و بیشتر در زمینه بیماری سینوس های فرونتال و اسفنوئیدال دیده می شود که شامل موارد زیر می باشد:

[۱] عفونت دور چشم[1] یا سلولیت دور چشم که عمدتاً به علت اتموئیدیت هستند و در بچه ها شایع تر است.

[۲] ترومبوز سینوس کاورنو[2]

[۳] سینوزیت راجعه یا مزمن (عفونت هم زمان سینوس های ماگزیلاری، فرونتال و اسنفوئید)

[۴] آبسه اپی دورال، آمپیم ساب دورال، آبسه های مغزی

[۵] مننژیت

[1] Periorbital infection
[2] Cavernus sinus thrombosis

[۶] موکوسل یا موکوپیوسل (ضایعات سیستیک و مزمن در سینوس ها که ندرتا بروز می کنند)

[۷] استئومیلیت استخوان فرونتال (تومور پاتس پافی[1])

[۸] سپتی سمی[2][65].

7-1 مشخصات باکتری های مورد آزمایش

1-7-1 مشخصات کلی استرپتوکوک ها

باکتری های جنس استرپتوکوک، کوکوسی های گرم مثبت با اندازه تقریبی 1-0/5 میکرون هستند که با آرایش زنجیره ای یا دو تایی در کنار یکدیگر قرار می گیرند[6].

ارگانیسم های این جنس فاقد فلاژله و تحرک هستند و اندوسپور تولید نمی کنند. برخی از سوش های جوان کپسول دار هستند. این جنس به طور وسیعی در طبیعت وجود دارد و به عنوان بخشی از فلور طبیعی در مخاط دستگاه تنفسی، سیستم گوارشی و ادراری تناسلی یافت می شود[6].

استرپتوکوک ها گروه ناهمگونی از باکتری ها هستند که سیستم طبقه بندی واحدی برای تقسیم بندی آنها وجود ندارد. این جنس حاوی 27 گونه است و مفیدترین سیستم نامگذاری که برای تقسیم بندی استرپتوکوک های بتا همولیتیک استفاده می شود سیستم گروه بندی لانسفیلد[3] است که در آن گروه های A تا U تعیین شده است[6].

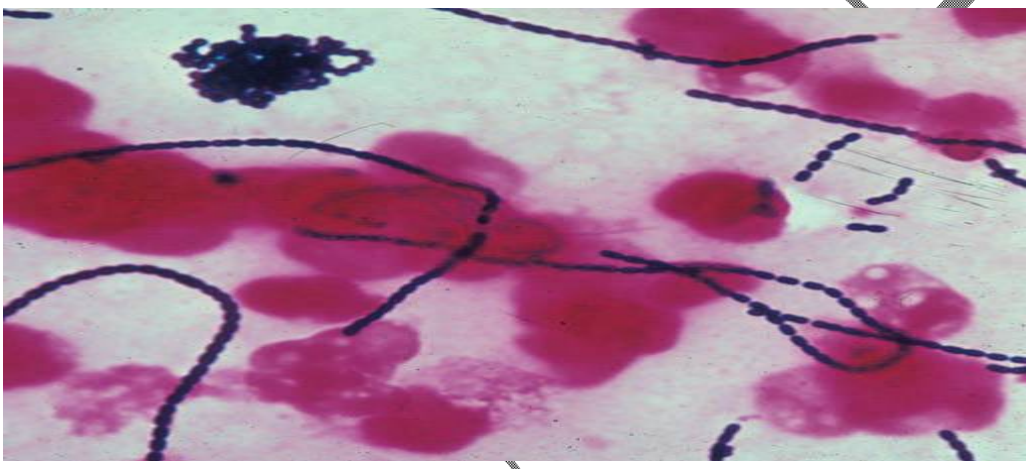
جنس استرپتوکوک بی هوازی اختیاری است، رشد باکتری ها و قدرت همولیز در مجاورت فشار 10 درصد دی اکسیدکربن تسریع می شود. درجه حرارت اپتیمم رشد در حدود ℃ 37 است اما انتروکوک ها در محدوده 15-45℃ به خوبی رشد می کنند. استرپتوکوک ها در محیط های کشت معمولی مانند آگار خون دار توانایی رشد دارد. بعد از 24 ساعت کلنی های کوچکی به اندازه 1-0/5mm را به شکل محدب، خاکستری مات و حاشیه منظم تولید می کند. در اطراف کلنی ها انواع همولیز آلفا، بتا و گاما مشاهده می شود که اساس یکی از روش های تقسیم بندی در جنس استرپتوکوک است. تست ها کاتالاز و اکسیداز در جنس استرپتوکوک منفی است و از تست کاتالاز برای تفکیک این جنس از جنس استافیلوکوک استفاده می شود. توانایی ئیدرولیز قندها در شناسایی برخی از گونه های درون این جنس کاربرد دارد. استرپتوکوک ها

[1] Potts' puffy tumor
[2] Septicemia
[3] Lancefield

حاوی توکسین ها و آنزیم هایی هستند که عمده ترین آنها شامل توکسین اریتروژن[1]، هیالورونیداز[2]، استرپتوکیناز[3]، دزاکسی ریبونوکلئاز[4] است[6].

1-1-7-1 استرپتوکوک پیوژن

استرپتوکوک گروه A که به نام *استرپتوکوک پیوژن* یا تب زا نامیده می شود کوکسی هایی به شکل کروی یا بیضوی دارد که به صورت زنجیری قرار می گیرد. این باکتری ها عمود بر محور طولی زنجیره تقسیم می شود(شکل 1-2).



شکل 1-2 استرپتوکوک پیوژن رشد یافته در کشت خون (کوکسی های گرم مثبت در زنجیره ها) نشان داده شده اند. (بزرگنمایی 1000×)

در اطراف کلنی های آن همولیز از نوع بتا به صورت حاشیه واضحی مشاهده می شود. بیشتر سویه های گروه A کپسول های ساخته شده از اسید هیالورونیک تولید می کنند. این کپسول ها به ویژه در محیط های کشت تازه دیده می شوند. آنها مانعی برای فاگوسیتوز محسوب می گردند. این کپسول به پروتئین اتصالی به اسید هیالورونیک *CD44*، بر سطح سلول های اپتلیال انسان متصل می شود. اتصال این کپسول با این ماده باعث تخریب اتصالات بین سلولی می شود تا ارگانیسم با این که در اپیتلیوم نفوذ می کند، خارج سلولی بماند. دیواره سلولی *استرپتوکوک پیوژن* از پروتئین ها (آنتی ژن های M، T و R)، کربوهیدرات ها (خاص هر گروه) و پپتیدو گلیکان تشکیل شده است[42].

[1] Erythrogenic toxin
[2] Hyaluronidase
[3] Streptokinase
[4] Deoxyribonuclease

مژک های شبیه مو از کپسول استرپتوکوک های گروه A خارج می شوند. قسمتی از مژک ها از پروتئین M ساخته شده است و اسید لیپوتئی کوئیک [1]آنها را می پوشاند. این ماده در اتصال استرپتوکوک ها به سلول های اپیتلیالی نقش مهمی دارد[42].

1-7-1-1-1 بیماری زایی

بیش از 90 درصد عفونت های استرپتوکوکی مربوط به *استرپتوکوک پیوژن* است. عامل شایع عفونت دستگاه تنفسی فوقانی و پوست در کودکان است و علت کمتر شایع سلولیت اطراف رکتوم، واژینیت، سپتی سمی، پنومونی، آندوکاردیت[2]، استئومیلیت[3]، آرتریت چرکی[4]، میوزیت[5] و سلولیت می باشد. این ارگانیسم ها منجر به عناوین خاص کلینیکی (مخملک و باد سرخ می گردد و همین طور سندروم شوک توکسیک[6] از آن جمله است). استرپتوکوک گروهA علت 2 عارضه بالقوه خطرناک غیر عفونی مثل تب رماتیسمی[7] و گلومرولونفریت[8] حاد می باشد[18].

2-7-1-1-1 تست های تشخیصی

برای این منظور ابتدا نمونه مجهول روی محیط کشت داده شده و برای مدت 48-24 ساعت در حرارت ℃ 37 انکوبه می کنیم ؛ پس از بررسی کلنی ها و همولیز بتا که به صورت حاشیه واضحی است، آزمایش های تاییدی به شرح زیر انجام می گیرد:

[۱] آزمون تعیین حساسیت به دیسک باسیتراسین[9]: برای انجام این تست، دیسک باسیتراسین در سطح محیط کشت خوندار و بر روی کشت خالص ارگانیسم قرار داده می شود و پلیت برای مدت 24 ساعت در دمای ℃ 37 نگهداری می شود وسپس از نظر تولید هاله ممانعت از رشد مورد بررسی قرار می گیرد. وجود هاله ممانعت از رشد به منزله حساس بودن در برابر باسیتراسین و بیانگر استرپتوکوک پیوژن می باشد[6].

[1] Lipoteichoic acid
[2] Endocarditis
[3] Osteomyelitis
[4] Pyoarthritis
[5] Myositis
[6] Toxic Shock Syndrome
[7] Rheumatic fever
[8] Glomerulonephritis
[9] Bacitracin

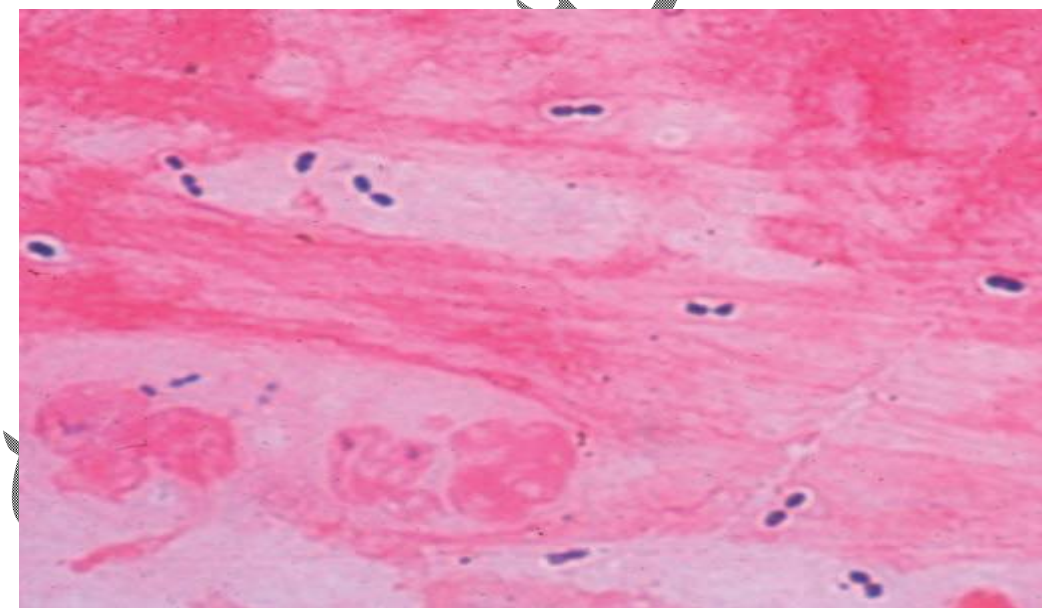
[۲] تست ئیدرولیز PYR[1]: مقداری از کلنی استرپتوکوک را بر روی کاغذ صافی آغشته به PYR منتقل کرده سپس معرف تست را به میزان 1 قطره اضافه کرده و به مدت 5 دقیقه از نظر ظاهر شدن رنگ قرمز بررسی می کنیم. رنگ قرمز به معنی مثبت بودن تست و توانایی ئیدرولیزPYR است. این تست در استرپتوکوک گروه A و انتروکوک مثبت است[6].

3-1-1-7-1 درمان

درمان فارنژیت[2] استرپتوکوکی اهمیت زیادی در پیشگیری از ابتلا به تب روماتیسمی دارد. پنی سیلین آنتی بیوتیک انتخابی در تمامی عفونت های استرپتوکوکی است. در موارد آلرژی به پنی سیلین از اریترومایسین، کلیندامایسین[3] و سفالکسین[4] استفاده می شود[6].

2-1-7-1 استرپتوکوک پنومونیه

استرپتوکوک پنومونیه یا پنوموکوک دیپلوکوک های گرم مثبت هستند که اغلب شکل لانست[5] دارند یا زنجیره ای قرار می گیرند(شکل 1-3) [42].



شکل 1-3 رنگ آمیزی گرم از خلط که در آن استرپتوکوک پنومونیه به صورت دیپلوکوک های گرم مثبت به شکل لانست دیده می شوند. (بزرگنمایی 1000×)

[1] L-pyrrolidonyl-2-naphtylamide
[2] Pharyngitis
[3] Clindamycin
[4] Cephalexin
[5] Lancet shape

پنوموکوک ها یک کپسول پلی ساکاریدی دارند که تعیین نوع را با آنتی بادی های اختصاصی سرمی امکان پذیر می سازند. پنوموک ها توسط عوامل فعال سطحی مانند نمک های صفراوی به راحتی تخریب می شوند و عوامل فعال سطحی احتمالا موجب کنار زدن یا غیر فعال شدن مهار کننده های اتولیزین های دیواره سلولی می شوند. پنوموکک جز فلور طبیعی دستگاه تنفسی فوقانی در 5 تا 40 درصد افراد هستند[42].

پنوموکوک یک پرگنه کوچک گرد در محیط کشت ایجاد می کند که ابتدا حالت گنبدی دارد و بعدا دارای قسمت مرکزی مسطح با حاشیه برجسته می شوند. در آگار خونی آلفا همولیتیک هستند که رشد آن ها با اضافه کردن 5 تا 10 درصد دی اکسید کربن افزایش می یابد. بیشتر انرژی این باکتری از تخمیر گلوکز حاصل می شود این امر با تولید سریع اسید لاکتیک همراه است که رشد را محدود می کند. خنثی سازی محیط کشت با مواد قلیایی در فواصل معین موجب رشد زیاد می گردد[42].

نمونه های پنوموکوکی که حجم زیادی کپسول تولید می کنند، پرگنه های موکوئیدی بزرگی ایجاد می نمایند. پس از تعداد کمی کشت متوالی خاصیت تولید کپسول از دست می رود زیرا تولید کپسول برای رشد باکتری بر محیط آگار ضروری نیست. با این وجود پنوموکوک ها اگر به موش تزریق شوند، دوباره کپسول تولید می کنند و بیماری زایی آنها افزایش خواهد یافت[42].

1-7-1-2-1 تست های تشخیصی

برای این منظور ابتدا نمونه مجهول روی محیط کشت خون دار کشت داده شده سپس برای مدت 48-24 ساعت در دمای 37 °C در شرایط 10-5 درصد دی اکسید کربن انکوبه و پس از بررسی کلنی، آزمایش های تاییدی به شرح زیر انجام می پذیرد:

[۱] تست حلالیت در صفرا: آنزیمی به نام آمیداز[1] در پوشش سلولی پنوموکوک وجود دارد که در مجاورت نمک های صفراوی فعال شده و اتصال میان ان- استیل مورامیک اسید و ال- آلانین را می شکند. بنابراین مجاور کردن پنوموکوک با آنزیم های صفراوی موجب لیز و تخریب باکتری می شود[6]

[۲] آزمون تعیین حساسیت به دیسک اوپتوشین[2]: برای این منظور دیسک اوپتوشین را روی سطح محیط کشت آگار خون دار بر روی کشت خالص ارگانیسم قرار داده وپس از انکوبه کردن آن به مدت 24

[1] Amidase
[2] Optochin

ساعت در دمای 37 °C و فشار 10-5 درصد دی اکسید کربن از نظر هاله ممانعت از رشد مورد بررسی قرار می گیرد. پنوموکوک به اوپتوشین حساس است[6].

[۳] واکنش کوئلانگ[1]: برای انجام این تست از آنتی سرم های پلی والان استفاده می شود. نمونه تازه خلط یا سوسپانسیون ارگانیسم در سطح لام قرار داده شده و با آنتی سرم مجاور می شود. سپس زیر میکروسکوپ از نظر تشکیل هاله شفاف بررسی می گردد[6].

2-2-1-7-1 بیماری زایی

استرپتوکوک پنومونیه یک پاتوژن بسیار مهم است که سالانه بیش از یک میلیون کودک را در سراسر جهان می کشد. بیماری ناشی از پنوموکوک در کودکان شایع و اغلب شدید است که سندروم های مختلف کلینیکی دارد. پنومونی تهدید کننده حیات، باکتریمی، منتژیت، اوتیت[2]، برونشیت[3]، سینوزیت و دیگر بیماری های عفونی[18].

3-2-1-7-1 درمان

پنی سیلین G آنتی بیوتیک انتخابی است. در موارد آلرژی به پنی سیلین از سفالوسپورین ها، اریترو مایسین و یا کلرامفنیکل[4] استفاده می شود. پنی سیلین در دوز های بالا در درمان عفونت های پنومونی موثر است اما در درمان منتژیت تاثیری ندارد. سفتی زوکسیم[5] در مبتلایان به منتژیت کاربرد دارد[6].

مقاومت آنتی باکتریال پنوموکوک یک مشکل سلامت عمومی است که 30-5 درصد نمونه های در سراسر دنیا مقاومت چند دارویی MDR (مقاومت به بیش از 3 کلاس آنتی بیوتیک ها) دارند. واکنش کنژوگه پلی ساکارید، پروتئین ضد پنوموکوک که برای شیر خواران تهیه شده در کنترل بیماری توسط سروتیپ های بیماری زای اختصاصی واکسن موفقیت آمیز می باشد. بنابراین تکامل واکسن و توزیع آن بهترین راه در کنترل این بیماری کشنده کودکی می باشد[6].

[1] Quellung
[2] Otitis
[3] Bronchitis
[4] Chloramphenicol
[5] Ceftizoxime

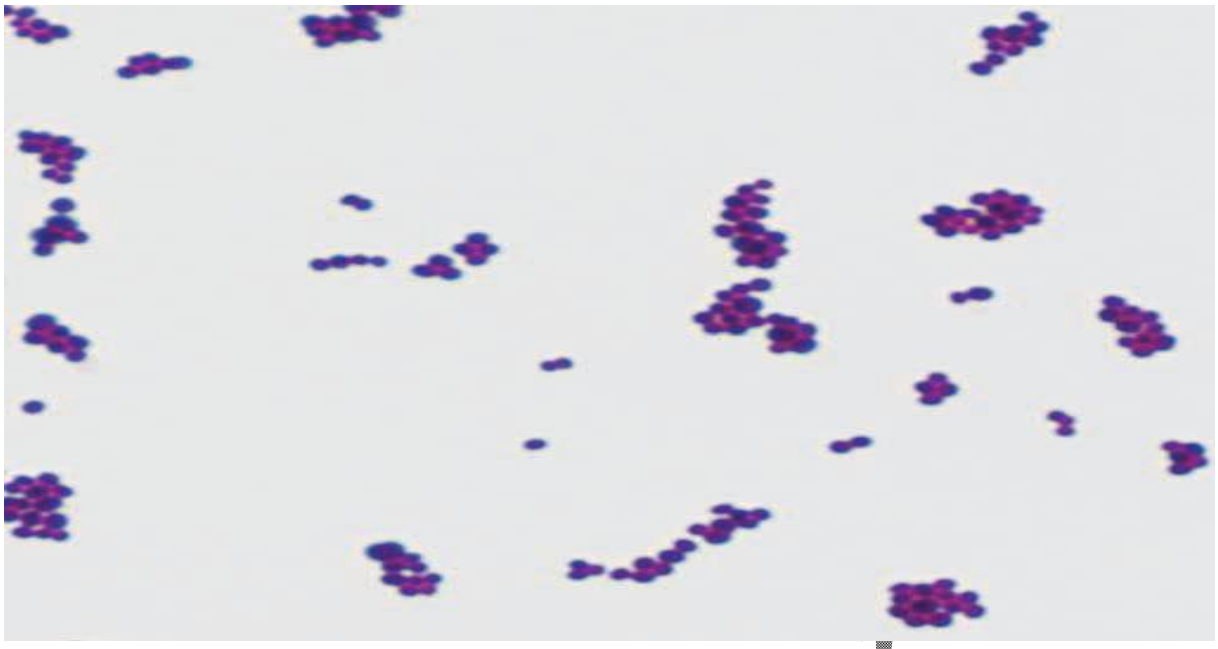
2-7-1 مشخصات کلی استافیلوکوک ها

استافیلوکوک ها کوکسی های گرم مثبت به قطر 0/5-1/5 میکرون هستند که به صورت نا منظم شبیه به خوشه انگور در کنار یکدیگر آرایش می یابند. فاقد فلاژله هستند بنابر این تحر ک ندارند. اندوسپور نیز تولید نمی کنند. برخی از سوش ها لایه لعابی شبه کپسولی یا کپسول دارند. به طور گسترده ای در طبیعت، آب و خاک و هوا پراکنده اند و جایگاه طبیعی آنها سطح بدن پستانداران است. بی هوازی اختیاری هستند و در روی محیط کشت معمولی مثل آگار خون دار و آگار غذایی رشد می کنند. درجه حرارت اپتیمم رشد آن در حدود 37 °C است اما در محدوده 6-46 °C رشد می کنند. بعد از 24 ساعت کلنی های کروی، محدب، سطح صاف و حاشیه منظم با قوام کره ای به وجود می آورند. قادر به تولید مواد رنگین (پیگمان) می باشند که این پیگمان ها از سفید تا زرد تند است. بهترین شرایط تولید پیگمان در زمان نگهداری باکتری در دمای 37°C و سپس در دمای 22 °C و شرایط هوازی است. استافیلوکوک های پاتوژن اغلب قادر به همولیز گلبول های قرمز هستند و می توانند پلاسمای تازه را منعقد نمایند و بسیاری از قند ها را تخمیر می کنند. استافیلوکوک ها به سرعت نسبت به بسیاری از دارو ها مقاوم شده و در زمینه درمان مشکلات فراوانی به بار می آورند. این جنس از باکتری ها در محیط هایی با غلظت بالای نمک مانند محیط شاب من[1] یا محیط مانیتول سالت آگار[2] حاوی 7/5 درصد نمک و 1درصد مانیتول رشد می کنند و حاوی توکسین ها و آنزیم هایی هستند که عمده ترین آنها شامل هیالورونیداز[3]، لوکوسیدین[4]، کوآگولاز[5]، انتروتوکسین[6] است[6].

1-2-7-1 استافیلوکوک اورئوس

یک کوکسی غیر متحرک با قطر 0/1-0/8 میکرون است که در سه محور تقسیم شده و خوشه هایی انگوری شکل شامل دانه هایی نامنظم از سلول را تشکیل می دهد(شکل 1-4).

[1] Chapman
[2] Manitol-Salt Agar
[3] Hyaluronidase
[4] Leukocidin
[5] Coagulase
[6] Enterotoxin



شکل 1-4 رنگ آمیزی گرم استافیلوکوک اورئوس که کوکسی های گرم مثبت را به صورت دوتایی، چهارتایی و خوشه ای نشان می دهد. (بزرگنمایی 1000×)

مهم ترین بیماری زای انسان است که اغلب سوش های آن لیزوژن هستند و بر اساس حساسیت به فاژ در سه گروه (I ، II، III) قرار می گیرد که معمولا سوش های گروه II همراه با عفونت های پوستی هستند و تولید توکسین های روده ای منحصر به فاژ گروه III می باشد[42].

اغلب سوش های *استافیلوکوک اورئوس* کلنی هایی به رنگ زرد طلایی دارند که مربوط به پیگمان های کاروتنوئید است. توانایی تخمیر قند مانیتول را نیز دارد که موجب تغییر رنگ محیط از قرمز به زرد می شود. در محیط کشت خون دار همولیز بتا ایجاد کرده و توانایی منعقد کردن پلاسمای خرگوش یا انسان را دارد که این ویژگی مربوط به داشتن آنزیم کوآگولاز است. تعداد کمی از سوش ها، یک کپسول یا لایه چسبنده تولید می کنند که ویرولانس ارگانیسم را افزایش می دهد[42].

1-1-2-7-1 تست های تشخیصی

برای این منظور ابتدا نمونه مجهول روی محیط کشت داده شده و برای مدت 48-24 ساعت در حرارت °C 37 انکوبه می گردد. سپس آزمایش های تاییدی به شرح زیر انجام می پذیرد:

[۱] تست کوآگولاز: کلنی میکروب را با 0/5 میلی لیتر پلاسمای سیتراته مجاور می کنیم و آن را به مدت 2-4 ساعت با دمای 37 °C انکوبه می کنیم. در صورت منعقد شدن پلاسما تست مثبت بوده و احتمال وجود اورئوس می رود.

[۲] محیط اختصاصی مانیتول سالت آگار: پس از کشت باکتری، پلیت را برای مدت 18-24 ساعت در حرارت 37 °C انکوبه می کنیم. وجود کلنی های زرد همراه با هاله زرد رنگ بیانگر وجود *استافیلوکوک اورئوس* است[6].

2-1-2-7-1 بیماری زایی

استافیلوکوک اورئوس، دومین علت شایع در عفونت های بیمارستانی و مسئول حدود 80 درصد از عفونت های چرکی و اغلب عفونت های پوستی است که منجر به فولیکولیت[1]، کورک یا دمل[2]، سندروم فلسی شدن پوست[3]، پنومونی، آرتریت، باکتریمی و اندوکاردیت می شود. علاوه بر این، عامل مهمی در عفونت های پس از سوختگی است. در حدود 30-50 درصد از اشخاص طبیعی ناقل *استافیلوکوک اورئوس* در سوراخ های قدامی بینی هستند که رده های لوکالیزه می تواند سبب سینوزیت و آبسه های چرکی می گردد[6].

بیماری های ناشی از توکسین این باکتری شامل مسمومیت غذایی و سندروم شوک سمی توسط بعضی گونه های اورئوس صورت می گیرد. از طرفی استاقیلوکوک اورئوس سبب سینوزیت در کودکانی که سیستیک فیبروز و یا نقص عملکرد لوکوسیت داشته می گردد و ممکن است تنها کانون عفونت در کودکان با سندروم شوک سمی باشد[18].

3-1-2-7-1 درمان

در عفونت های شدید یا منتشر مانند باکتریمی، اندوکاردیت و پنومونی از پنی سیلین های مقاوم به بتالاکتاماز مانند کلوگزاسیلین[4]، نافسیلین[5] و یا متی سیلین[6] استفاده می شود و در عفونت هایی که در برابر

[1] Folliculitis
[2] Furuncle
[3] Scalded Skin Syndrome
[4] Cloxacillin
[5] Nafcillin
[6] Methicillin

این آنتی بیوتیک ها مقاوم هستند، ونکومایسین[1] تجویز می شود. در موارد عفونت های موضعی اساس درمان بر روی تخلیه آبسه های چرکی است[6].

3-7-1 مشخصات کلی پسودوموناس ها

اعضای جنس پسودوموناس، باسیل های گرم منفی با اندازه ای در حدود 3-0/5میکرون هستند که به صورت منفرد، دوتایی و گاهی زنجیره های کوتاه در کنار یکدیگر آرایش می یابند. فلاژله دارند و متحرک هستند[6].

اغلب حاوی پیلی هستند و لایه لعابی شبه کپسولی از جنس گلیکوکالیس[2] دارند. ساختمان پوششی سلولی این باکتری ها مشابه با باسیل های گرم منفی خانواده انتروباکتریاسه است[6].

اعضای این جنس تمایل ویژه ای برای محیط های مرطوب دارند و به طور وسیعی در طبیعت، خاک، آب و گیاهان یافت می شوند. علاوه براین گاهی در پوست، گوش خارجی، سیستم تنفسی فوقانی و یا روده بزرگ اشخاص سالم نیز حضور دارند[6].

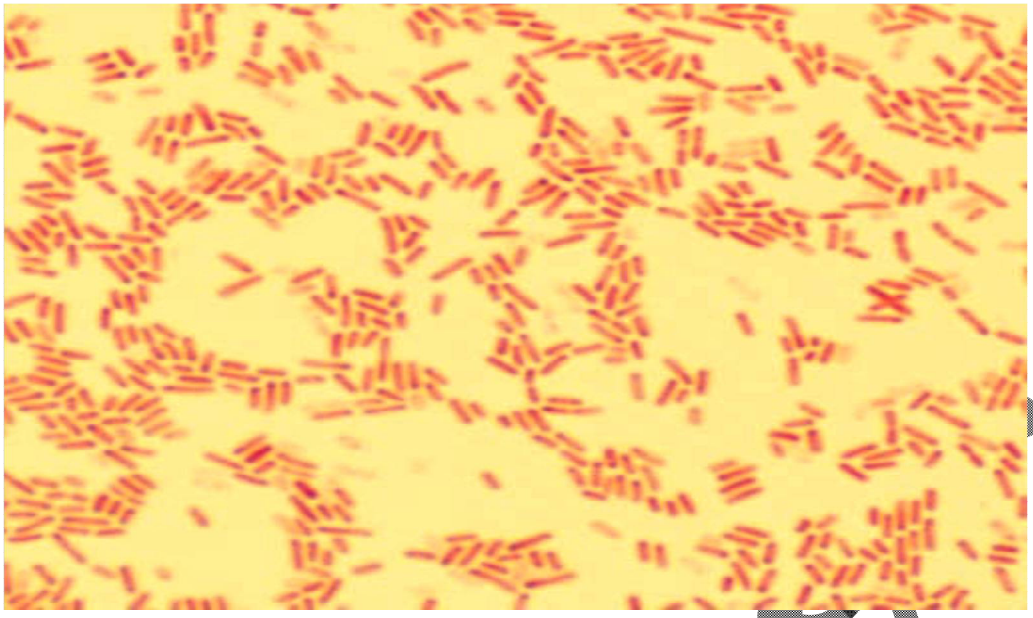
جنس پسودوموناس، هوازی اجباری است و در محیط های آگار خون دار و آگار غذایی رشد می کند. در سطح محیط کشت خون دار بعد از 24 ساعت کلنی هایی به اندازه 3-5mm، پهن با لبه های نازک و تیز، نمای ظاهری شیشه مات و با حاشیه همولیز بتا را به وجود می آورد[42].

در سوش های کپسول دار کلنی ها به فرم موکوئید و ظاهری به رنگ سبز آبی یا سبز مایل به زرد با بویی شبیه به بوی گل یاس دارند. توانایی تخمیر قندها را ندارند و تست اکسیداز آنها مثبت است. این جنس از باکتری ها حاوی آنزیم ها و توکسین هایی هستند که عمده ترین آنها شامل اندوتوکسین[3]، اگزوتوکسین A[4]، اگزوآنزیمS [5] و غیره می باشد[6].

1-3-7-1 پسودوموناس آئروژینوزا

پسودوموناس آئروژینوزا متحرک و استوانه ای شکل با اندازه تقریبی 2-0/6 میکرون می باشد. این ارگانیسم گرم منفی و به صورت منفرد، جفتی و گاهی در زنجیره های کوتاه وجود دارد(شکل 1-5).

[1] Vancomycin
[2] Glycocalyx
[3] Endotoxin
[4] Exotoxin A
[5] Exoenzym-S



شکل 1-5 رنگ آمیزی گرم پسودوموناس آئروژینوزا که به شکل باسیل هایی با اندازه 2-0/6 نشان داده شده است. (بزرگنمایی 1000×)

بعضی از سویه ها خون را همولیز می کنند. *پسودوموناس آئروژینوزا* پرگنه صاف و گرد با رنگ فلوئورسنتی سبز ایجاد می کند. این باکتری اغلب رنگدانه غیر فلوئورسنتی آبی رنگی به نام پیوسیانین[1] تولید می کند که به داخل آگار منتشر می شود. بسیاری از سویه های این باکتری همچنین رنگدانه فلوئورسنتی پیووردین[2] ایجاد می کنند که به آگار رنگ سبز می دهد. بعضی از سویه ها رنگدانه قرمز تیره پیوروبین[3] یا رنگدانه سیاه پیوملانین[4] تولید می کنند. در واقع *پسودوموناس آئروژینوزا* چندین نوع پرگنه در محیط کشت ایجاد می کنند که ممکن است فعالیت های بیوشیمیایی و آنزیمی مختلف و الگوهای حساسیت دارویی متفاوت داشته باشند[42].

این باکتری در دمای 37°C تا 42 به خوبی رشد می کند. رشد آن در دمای 42 °C به افتراق از سایر گونه های فلوئورسنت پسودوموناس کمک می کند. این باکتری قادر به تخمیر کربوهیدرات ها نیست اما بسیاری از نژادهای آن گلوکز را اکسید می کند[42].

[1] Pyocyanin
[2] Pyoverdin
[3] Pyorubin
[4] Pyomelanin

1-1-3-7-1 تست های تشخیصی

تشخیص قطعی عفونت های پسودوموناییی از طریق کشت و جداسازی ارگانیسم ها است. نمونه ها سپس در محیط کشت خون دار و محیط EMB تلقیح می شود و بعد از 24 ساعت کلنی ها در سطح محیط کشت رشد می کنند.

پسودوموناس به لحاظ مثبت بودن تست اکسیداز و اکسیداسیون قند گلوگز از ارگانیسم های خانواده انتروباکتریاسه مجزا می شود. و سپس آزمایش تاییدی محیط افتراقی O-F [1] به شرح زیر انجام می شود:

[۱] محیط افتراقی O-F باکتری ها در دو لوله مجزای محیط کشت O-F تلقیح می شوند. در سطح یکی از لوله ها پارافین اضافه می شود تا اینکه یک محیط بی هوازی فراهم گردد. سپس در دمای 37 °C برای 24 ساعت نگهداری می شوند. از آن جایی که پسودوموناس آئروژینوزا توانایی تخمیر قند را نداشته ؛ آن را از راه اکسیداسیون مصرف می کند بنابر این در لوله ای که شرایط هوازی وجود داشته و سطح آن توسط پارافین پوشانده نشده محیط کشت از سبز به زرد تغییر می یابد نشان دهنده *پسودو موناس آئروژینوزا* است[6].

1-1-3-7-2 بیماری زایی

پسودوموناس آئروژینوزا دومین علت شایع عفونت های سوختگی بعد از *استافیلوکوک اورئوس* است و عامل شایع پنومونی، عفونت گوش و چشم و عفونت های بیمارستانی است که سبب مننژیت، آبسه های مغز، انتشار مجاورتی ماستوئیدیت [2]، سینوس های پوستی با مجرا، سپتی سمی و باکتریمی می گردد[18].

1-1-3-7-3 درمان

عفونت های *پسودوموناس آئروژینوزا* در برابر اغلب آنتی بیوتیک های معمولی مقاوند اما آمینوگلیکوزید[3] ها و پنی سیلین های ضد پسودوموناییی در درمان اغلب عفونت ها مفید هستند. سفالوسپورین های نسل سوم نیز فعالیت ضد پسودوموناییی دارند[6].

[1] Oxidative-Fermentative
[2] Mastoiditis
[3] Aminoglycoside

8-1 تاریخچه درمانی گیاهان دارویی

سابقه استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری ها به تاریخ تولد بشر بر می گردد. در پی ناکامی های مختلف در بکار گیری داروهای مختلف شیمیایی و ظهور سویه های مقاوم جدید، بشر با بکارگیری دانش و تکنولوژی امروز دنیا، اقدام به تولید فراورده های دارویی با منشأ گیاهی نموده است[5].

انسان های ماقبل تاریخ، ضمن جستجوی وسیله ای برای درمان بیماری ها و یا ضمن استفاده از گیاهان برای تغذیه و غیره، به انواعی برخورد می کردند که مصرف آن ها آثار درمانی مختلف داشت و این خود باعث شد که در طی زمانی طولانی به طور تصادفی گیاهانی با اثر مقوی معده، مخدر، مسهل و غیره کشف شود و از آن ها جهت درمان بیماری ها استفاده شود. قدیمی ترین کتاب درمانی چین که شامل شرح بیش از یکصد گیاه است به یکی از امپراطوران آن کشور نسبت داده می شود که حدود 2800 سال قبل از میلاد می زیسته است. یونانیان قدیم نیز از گیاهان مفید جهت درمان بیماری ها استفاده می کردند و حتی از انواع سمی آن اطلاع داشتند. بقراط و ارسطو به نقش گیاهان در طبابت و کاربرد آن ها واقف بودند. در قرن هشتم تا دهم میلادی دانشمندان بنام و برجسته ایرانی همچون ابو علی سینا و محمد بن زکریای رازی موجب پیشرفت قابل توجهی در گیاه درمانی شدند. همچنین ابن بیطار خصوصیات بیش از 1400 گیاه دارویی را در کتاب خود جای داد. گیاه درمانی در کشور های غربی از اوایل قرون وسطی شروع به پیشرفت کرد و از قرن نوردهم کوشش همه جانبه ای جهت استخراج مواد مؤثره از گیاهان دارویی آغاز شد و تا کنون نیز این تلاش و کوشش ادامه دارد. امروزه در اکثر کشور های جهان به گیاهان درمانی توجه بسیاری می شود و پژوهشگران متعددی در این رشته مشغول به فعالیت می باشند[5].

با رونق زندگی شهری و افزایش جمعیت به تدریج از مصرف گیاهان دارویی کاسته شده و داروهای صناعی دربسیاری موارد جایگزین آنها شده اند که البته با مصرف این داروها نیز مشکلاتی از قبیل مقاومت روز افزون درمیکروارگانیسم ها و کاهش تاثیر در اثر کاربرد مداوم ایجاد شده است. در سال های اخیر کاربرد گیاهان دارویی با توجه به عوارض و هزینه کمتر و سازگاری بیماران به این داروها و به لحاظ اثر های جانبی شناخته شده داروهای سنتتیک افزایش یافته است. در ایران نزدیک به هشت هزار گونه گیاهی می روید که اغلب این گیاهان می توانند دارای اثر های دارویی باشند[9].

1-8-1 ویژگی های خاص تولید گیاهان دارویی

- ✓ تنوع زیاد در گیاهان و گونه های دارویی وجود دارد.
- ✓ شرایط زیست محیطی تأثیر شگرفی بر مواد مؤثره آن دارد.
- ✓ قیمت شان ناپایدار و در تجارت آن ها رقابت جهانی وجود دارد[62].

1-8-2 شکل های مصرف گیاهان دارویی

گیاهان دارویی عمدتا به فرم های زیر مصرف می شوند:

[۱] گیاه تازه

[۲] گیاه خشک شده یا کنسرو شده

[۳] به صورت فراوردی شده توسط حرارت

[۴] استحصال مواد مؤثره در صنعت

[۵] به صورت نانواسانس در مقیاس آزمایشگاهی که هنوز در مراحل ابتدایی است[6].

1-9 ویژگی های گیاهان دارویی مورد آزمایش

1-9-1 گیاه درمنه[1]

نام گیاه: درمنه

نام عربی: شیح[2]

تیره: کاسنی[3]

نام علمی: *Artemisia sieberi* Besser

گیاه درمنه با نام علمی *Artemisia sieberi* Besser از تیره کاسنی گیاهی به ارتفاع 20 تا40 سانتی متر با برگ های منقسم به قطعات ریز و دارای کرک سفید در قاعده ساقه و برگ های کوچک بدون کرک در بخش بالایی ساقه است. گل ها به صورت گل آذین کاپیتول بوده که در ابتدا مایل به سبز است و به تدریج زرد قهوه ای می شود. بوی آن ها معطر و طعم آن ها تلخ است(شکل 1-6)[5].

[1] Artemisia
[2] Sheyh
[3] Compositae

در قرون وسطی درمنه گیاهی جادویی قلمداد می شد. از این گیاه برای دور کردن حشرات و بید در باغ ها استفاده می کردند. در زمان باستان از درمنه برای جلوگیری از آسیب های شیطان و حیوانات وحشی در سفر استفاده می کردند[14].

شکل 1-6 گیاه درمنه

این گیاه در قسمت های شمالی ایران، به خصوص استان گلستان، مازندران و آذربایجان می روید. درمنه بومی اروپا، آسیا و شمال افریقاست ولی در حال حاضر در شمال امریکا نیز گسترش یافته است[14].

1-1-9-1 ترکیبات شیمیایی و اسانس گیاه

قسمت هوایی و به خصوص برگ های گیاه درمنه حاوی اسانس می باشد که از اسانس این گیاه در عطر سازی و معطر ساختن نوشابه، غذا و مواد آرایشی استفاده می شود. بررسی آنالیز اسانس این گیاه نشان می دهد که حاوی ترکیبات گوناگونی همانند اسکوپودرنیول[1]، اسکوپوفارنول[2]، سیمن[3]، سابینن[4]، سینئول[5]، لینالئول[6]، ائوژنول[7]، برنئول[8]، فارنزول[9]، استر و الکل و چندین سزکویی ترپن و ترکیبات دیگر می باشد[68].

[1] Scopodrniol
[2] Scopofarnol
[3] Cymene
[4] Sabinene
[5] Cineol
[6] Linaleol
[7] Eugenol
[8] Borneol
[9] Farnesol

2-1-9-1 خواص درمانی

از خواص درمانی گیاه درمنه می توان به فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد کرم، تقویت کننده معده، صفرا آور، کاهش دهنده قند خون آن اشاره کرد[5].

2-1-9-2 گیاه اسطو خودوس[1]

نام گیاه: اسطوخودوس

نام عربی: لونده اصلیه، خزامی

تیره: نعناع[2]

نام علمی: Lavandula angustifolia Mill

گیاه اسطوخودوس با نام علمی *Lavandula angustifolia* Mill گیاهی است از تیره نعناعیان که یکی از گیاهان معطر و دائمی با بوته ای به ارتفاع 30 تا 60 سانتی متر با ساقه هایی چهار گوش که در قسمت های پایین، چوبی می شود. برگ های آن متقابل، باریک و دراز، نوک تیز به رنگ سبز و گلهای آن که در فاصله ماه های خرداد و تیر ظاهر می شود؛ دارای رنگ آبی و وضع فراهم به تعداد 3 تایی با فواصل نسبتا زیاد، در قسمت های انتهایی شاخه های گل دار است (شکل 1-7)[10].

قسمت مورد استفاده این گیاه سر شاخه های گل دار و یا منحصرا گل های آن است. گل های لاواند، بوی معطر و مطبوع دارد و اگر بین انگشتان فشرده شود بوی آن قوی تر می گردد. طعم آن کمی تلخ و با احساس گرما همراه می باشد[10].

شکل 1-7 گیاه اسطوخودوس

[1] Lavander
[2] Labiatae

با وجودی که این گیاه در بسیاری از نقاط جهان مخصوصا جنوب فرانسه، مناطق مدیترانه و در تورنتو می روید، ولی چون اسانس آن از مصرف بالایی در صنایع داروسازی و آرایشی و بهداشتی برخوردار است، امروزه در برخی از کشورها نیز به طور گسترده کشت می شود[66,75].

1-2-9-1 ترکیبات شیمیایی و اسانس گیاه

اسانس این گیاه از تقطیر سر شاخه های گل دار آن به دست می آید، مایعی است بی رنگ یا زرد کم رنگ یا زرد مایل به سبز و دارای بوی معطر مشخص با طعمی نسبتا تلخ و تند است[66,75].

این اسانس به هر نسبتی در الکل 90 درجه، اتر، روغن های ثابت و اسانس ها حل می شود و اگر به نسبت مساوی با سولفور کربن مخلوط گردد، محلول کدر ایجاد می کند. وزن مخصوص آن بین 0/884 و 0/892 در گرمای 20 درجه است[10].

قسمت عمده اسانس شامل لینالول[1]، کامفور[2]، 1-8 سینئول[3]، لینالول استات[4]، بورنئول[5]، آلفا تریپنول[6] و بتا اورنئول[7] است که از این میان لینالول و 1-8 سینئول بیشترین ترکیب اسانس را تشکیل می دهند[15,59].

1-2-9-2 خواص درمانی

در طب سنتی، این گیاه به صورت خوراکی در درمان سر درد، میگرن، درد های معده ناشی از ناراحتی های عصبی و حالات هیجانی و به صورت موضعی در درمان درد های رماتیسمی کاربرد داشته و در فراورده های آرایشی و بهداشتی به عنوان معطر کننده استفاده می شود[66,75].

1-9-3 گیاه دارچین[8]

نام گیاه: دارچین

نام عربی: دارصینی[9]، قرفه[10]، سلیخه[11]

[1] Linalol
[2] Camphor
[3] 1-8 Cineole
[4] Linalol acetate
[5] Berneol
[6] α – Terpinene
[7] β – Orneol
[8] Cinnamon
[9] Darsini
[10] Qirfah
[11] Salikhah

تیره: برگ بو[1]

نام علمی: *Cinnamomum verum* J. S. Persl

گیاه دارچین با نام علمی *Cinnamomum verum* J. S. Persl گیاهی از تیره برگ بو، همیشه سبز، با بوی معطر و مطبوع به صورت درختی کوچک به ارتفاع 5 تا 7 متر با برگ هایی به وضع تقریبا متقابل، بیضوی دراز، نوک تیز، کامل، بی کرک، صاف و شفاف در سطح فوقانی پهنک و غبار آلود در سطح تحتانی آن دارد. گل های آن که در فاصله ماه های بهمن تا اوایل فروردین ظاهر می شود، منظم، نر-ماده، به رنگ سفید مایل به زرد و مجتمع به صورت خوشه منشعب می باشد. هر گل آن را پوششی مرکب از 6 کاسبرگ پایا در دو ردیف قرار می گیرد و درون آن ها 12 پرچم در 4 ردیف به نحوی جای دارد که مجموعا در 3 ردیف دیده می شوند زیرا که خارجی ترین ردیف پرچم ها، ظاهر زبانه ای و وضع غیرزایا دارد (شکل 1-8) [10].

مادگی گل های آن دارای تخمدانی یک خانه است وپس از رسیدن به میوه ای به صورت سته و بی رنگ قهوه ای مایل به آبی تبدیل می گردد که همیشه با کاسه ونهنج گل همراه است. قسمت گوشت دار میوه نیز رنگ مایل به سبز دارد ودرون آن دانه ای با مغز روغنی مشاهده می گردد. پوست خشک شده دارچین به صورت قطعات لوله ای شکل در بازرگانی عرضه می شود. سطح خارجی آن رنگ حنایی ولی سطح داخلی آن رنگ تیره و قهوه ای دارد. بوی آن مطبوع، طعم آن ها معطر، گرم، ملایم و کمی شیرین است ولی به تدریج تند و سوزاننده می شود[10].

این درخت در سیلان و هندوستان می روید و به علاوه پرورش می یابد. تکثیر آن به سهولت با کاشتن دانه یا به طریقه قلمه زدن و خوابانیدن شاخه ای از درخت صورت می گیرد[10].

[1] Lauraceae

شکل 1-8 گیاه دارچین

شکل 1-9 چوب و پودر دارچین

1-3-9-1 ترکیبات شیمیایی و اسانس گیاه

دارچین سیلان دارای آمیدون و موسیلاژ، تانن، یک ماده رنگی، اکسالات کلسیم، قند، مانیت، سینامومین[1]، اسانس و رزین است[10].

اسانس دارچین که تنها قسمت مهم دارچین است به مقدار یک درصد در پوست گیاه مذکور وجود دارد و از تقطیر آن با آب نیز حاصل می شود. این اسانس در صورت تازه بودن به رنگ زرد روشن است ولی به مرور زمان به علت اکسید شدن، به رنگ های زرد طلایی و سپس قهوه ای مایل به قرمز در می آید. وزن

[1] Cinnamon

مخصوص آن در گرمای 15 درجه بین 10/024 و 1/040 است. به مقدار کم در آب ولی به هر نسبتی در الکل 90 درجه، اتر و کلروفرم حل می گردد. بوی آن مطبوع و طعمش ملایم و گرم است[10].

قسمت اعظم این اسانس را آلدهید سینامیک[1] به وزن 65 تا 75 درصد تشکیل می دهد به علاوه دارای لینالول، ارتومتوکسی سینامیک آلدهید[2]، بتا کاریوفیلین[3]، 1-8 سینئول[4]، اوجنول[5] و ترکیبات دیگر است[69].

فعالیت ضد میکروبی دارچین به دلیل حضور آلدئید سینامیک می باشد که در سیستم های زیستی میکروارگانیسم ها دخالت کرده و مانع رشد آن ها می شود[69].

آلدئید سینامیک از طریق اتصال گروه کربونیلی به پروتئین باکتری ها و ممانعت از دکربوکسیلاسیون اسید های آمینه خاصیت ضد میکروبی خود را اعمال می کند. آلدهید سینامیک یا فنیل آکرولئین[6] و یا سینامال[7] به فرمول C_9H_8O و به وزن مولکولی 132/15 است. در بعضی اسانس ها مانند اسانس دارچین سیلان و دارچین چین[8] به مقدار زیاد وجود دارد و استخراج می شود. استخراج آلدئید سینامیک به صورت مایعی روغنی و به رنگ مایل به زرد است؛ بوی قوی دارچین دارد. وزن مخصوص آن در گرمای 25 درجه معادل 1/048 است. در حرارت 7/5- درجه نیز انجماد پیدا می کند. در 700 قسمت آب و در حدود 7 حجم الکل 60 درجه حل می شود. در الکل، اتر، کلروفرم و روغن ها نیز محلول است. آلدهید سینامیک، به علت بوی مطبوعی که دارد در عطر سازی مورد توجه است[10].

1-9-3-2 خواص درمانی

گیاه دارچین دارای خواصی همچون ضد درد، ضد باکتری، بی حس کنندگی، ضد اسهال، ضد تهوع، ضد هیستامین، ضد تب، ضد لوسمی، کاهش دهنده پر فشاری خون، دارای خاصیت تقویت کننده اعمال هضم و جریان گردش خون است[10].

1-9-4 گیاه مورد یا مورت[1]

نام گیاه: مورد یا مورت

---

[1] Aldehyde cinnamic
[2] Ortho methoxy cinnamic aldehyde
[3] β – Caryophyllene
[4] 1-8-Cineole
[5] Eugenol
[6] Phenylacrolein
[7] Cinnamal
[8] *Cinnamomum cassia* Bl.
[1] Myrtle

نام عربی: مرسین، حمبلاس، آس-قمام

تیره: مورد[1]

نام علمی: Myrtus communis L.

گیاه مورد با نام علمی *Myrtus communis* L. درختچه ای کوچک به ارتفاع ساقه 1-3 متر می باشد ولی در آب و هوای مساعد به ارتفاع بیشتر نیز می رسد.

دارای برگ هایی همیشه سبز، پایا، متقابل، ساده، نوک تیز، عاری از تار و دندانه، چرمی، به رنگ سبز تیره و معطر می باشد. طول برگ های آن 1 تا 4 سانتی متر (گاهی بیشتر) و عرض آن ها 0/5 تا 1 سانتی متر است به علاوه اگر دقت شود، نقاط کوچک و شفافی در سطح برگ های آن مشاهده می گردد. گل های نسبتا درشت و زیبای مورد، رنگ سفید و بوی مخصوص دارند و در اردیبهشت تا تیر ظاهر می شوند؛ پیدایش گل ها به صورتی است که مانند برگ ها وضع متقابل داشته در کناره آن ها به ساقه می پیوندند. هر گل آن، 5 گلبرگ مساوی به وضع گسترده دارد به طوری که وجود این حالت باعث می گردد که پرچم های متعدد و فراوان گل، تا انتهای میله و محل اتصال میله به نهنج، به صورت دسته ای از تار های بلند و ظریف رؤیت گردند و منظره بسیار زیبا به گل داده شود.

میوه آن به صورت بیضوی یا مدور به بزرگی یک نخود به رنگ سیاه مایل به آبی به ندرت سفید و دارای طعمی گس و رزینی است. پوست ساقه به صورت قطعات از آن جدا و مانند تمام قسمت های گیاه، بوی معطر از آن استشمام می شود. بر روی ساقه مورد برجستگی هایی به نام گال[2] به وجود می آید که از آن در مصارف درمانی استفاده می گردد (شکل 1-10)[8].

[1] Myrtaceae
[2] Galle

شکل 1-10 گیاه مورد

مورد درختچه ای است که از قدیم الایام مورد شناسایی ایرانیان بوده است. یونانیان قدیم و ملل دیگر برای آن احترام خاص قائل بودند و برگ های با دوام و پایای آن را سمبل عشق و ابدیت می دانسته اند. و از طرفی از قدیم الایام از آن به عنوان یک ضد عفونی کننده استفاده به عمل می آوردند[33].

گیاه دارویی مورد در ایران از پراکنش بسیار خوبی برخوردار است و درگیلان، کرمانشاه، خوزستان، کرمان، بلوچستان، خراسان، یزد، چهار محال بختیاری و لرستان دیده می شود[8].

1-4-9-1 ترکیبات شیمیایی و اسانس گیاه

برگ مورد دارای تانن، مواد رزینی و تلخ، کامفن و 30 درصد اسانس است. میوه گیاه دارای تانن، اسانس، مواد رزینی، قند های مختلف و اسید های آلی نظیر اسید مالیک و اسید سیتریک است[8]. دانه مورد دارای ماده روغنی است که از اولئین[1]، لینولئین[2]، میریستین[3] و پالمتین[4] تشکیل می یابد. برجستگی های روی ساقه مورد که گال نام دارد تانن فراوان دارد.

از برگ مورد بر اثر تقطیر با بخار آب، نوعی اسانس تهیه می شود که بازده آن 300 گرم اسانس برای هر 100 کیلوگرم برگ است. اسانس مورد مایعی به رنگ زرد مایل به سبز و دارای بوئی مطبوع و وزن مخصوصی بین 0/895 و 0/920 است و در 2 قسمت الکل 80 درجه نیز حل می شود. اسانس مورد دارای

[1] Olein
[2] Linolein
[3] Myricetin
[4] Palmetin

دیپانتن[1]، لیمونن[2]، آلفا پینن، بتا پینن، سابینن، سینئول و لینول است. میرتول[3] مایعی بی رنگ یا مایل به زرد، دارای بوی مطبوع شبیه تربانتین[4]، اوکالیپتوس است و به مقدار زیاد در الکل و اتر حل می شود در هنگام تقطیر و در دمای بین 160-170 ماده ای بنام میرتول از آن بدست می آید. میرتنول[5] مایعی است روغنی و معطر که در هنگام تقطیر در درجات گرمای بالاتر از 180 درجه حاصل می شود[35,8].

2-4-9-1 خواص درمانی

این گیاه به دلیل دارا بودن خواص ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد باکتریایی و گند زدایی بسیار مورد توجه است[48].

مورد به صورت موضعی در درمان تبخال تیپ 1 و 2 به عنوان آنتی سپتیک و در درمان التهاب مخاط بینی استفاده می‌شود. ضد احتقان، قابض، تقویت کننده، ضد عفونی کننده و ضد انگل است. به صورت خوراکی در ناراحتی های مجاری تنفسی، سینوزیت، سرفه های خشک به کار می رود و مصرف موضعی آن در بهبود زخم، مصرف خوراکی آن در درمان اختلالات سیستم گوارشی و مجاری ادرار کاربرد دارد[27].

1-10 اسانس های گیاهی

اسانس ها ترکیبات معطری هستند که در اندام های مختلف گیاه یافت می شوند. به علت تبخیر در اثر مجاورت هوا در حرارت عادی، آن ها را روغن های فرار یا اتری یا اسانس های روغنی می نامند. اسانس ها به طور کلی بی رنگ هستند؛ به خصوص هنگامی که تازه تولید شده باشند. ولی در اثر مرور زمان به علت اکسیداسیون رنگ آن ها تیره می شود. برای جلوگیری از این تغییرات باید اسانس ها را در مکان خنک، خشک و در ظرف های سر بسته از جنس شیشه نگهداری کرد. اسانس ها در الکل محلول و به میزان کمی در آب حل می شوند. اسانس ها بسته به نوع تیره های گیاهی ممکن است در اندام های تراشحی، گلبرگ ها، برگ ها یا تمام سلول های گیاه موجود باشند. اسانس ها ممکن است دارای خاصیت دور کنندگی حشرات باشند و بدین وسیله از خراب شدن گل ها و برگ ها جلوگیری کنند یا ممکن است به عنوان جلب کننده حشرات عمل کنند و بدین وسیله عمل گرده افشانی را تسهیل کنند[43]. بررسی پژوهشگران بر روی

[1] Dipenthene
[2] Limonene
[3] Myrtol
[4] Turpentine
[5] Myrtenol

ترکیبات مشابهی که در اسانس گیاهان وجود دارد نشان می دهد که این ترکیبات فعالیت بیولوژیکی نسبتا خوبی دارند. با توجه به مصرف گیاهان دارویی در درمان خیلی از بیماری ها و رویکرد علم پزشکی و دامپزشکی به این حوزه و با توجه به اثرات مضری که داروهای شیمیایی بر بدن انسان و دام دارد روز به روز این اثرات سوء مشخص تر می گردد[36]. نتایج این پایان نامه و دیگر پژوهش های انجام شده دلالت بر اثرات گوناگون از جمله خواص ضد میکروبی این دسته از گیاهان دارد.

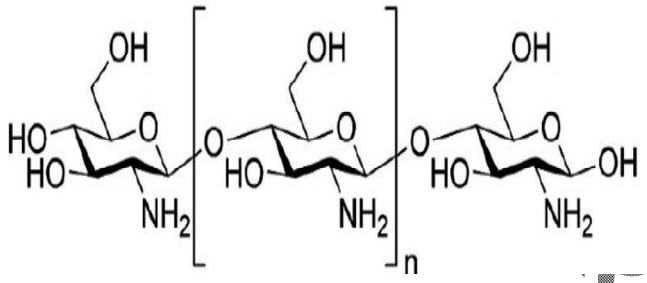
1-11 نانواسانس های گیاهی

اسانس ها نسبت به داروهای شیمیایی زودتر تجزیه می شوند و برای بدن بی ضررتر هستند. خاصیت فرار بودن، قابلیت حلالیت پایین در آب و اکسید شدن آن ها باعث می شود که قبل از کاربرد اسانس ها در کنترل برخی از بیماری های انسان و یا حیوان به فکر یافتن تکنیک جدیدی بود تا کارایی ضد میکروبی اسانس ها را افزایش داد. یکی از مهم ترین راه ها فرمولاسیون و تغییراتی است که می تواند روی اسانس ها اعمال شود تا کیفیت و میزان تأثیر و فعالیت بیولوژیکی آن طولانی تر شود. لذا به منظور افزایش اثر بخشی ترکیبات مؤثره گیاهی به خصوص اسانس های گیاهی که اثرات ضد میکروبی بسیاری از آن ها به اثبات رسیده است و تأثیر آن ها در حداقل غلظت و با توجه به محدود بودن منابع گیاهی، فرمولاسیون های جدید داروها و ترکیبات گیاهی بر مبنای بهره وری از علم نانو مورد توجه جدی قرار گرفته اند. از مهم ترین فرمولاسیون های نانو می توان به نانو ژل یا نانوکپسول ها اشاره کرد. نانو کپسول ها پس از نانو ذرات دومین عنصر پایه در فناوری نانو محسوب می شوند. نانو کپسول ها انواع متنوعی دارند، نانو کپسول های پلیمری از جمله ترکیب هایی هستند که به دنبال فرایند پلیمریزاسیون هم زمان در اندازه ها و شکل های گوناگون تولید می شوند. انتخاب پلیمر ها بستگی به فاکتور های فیزیکی، شیمیایی، خواص بیولوژیکی اسانس، نحوه اثر، نحوه کاربرد و نوع محصول دارد تا باعث ایجاد توانایی رهایش کنترل شده و حفظ مواد مؤثره، افزایش تأثیر و فعالیت بیولوژیکی طولانی تر آن شود[54].

1-11-1 کیتوزان

بر اساس نتایج بدست آمده از مطالعات مختلف، کیتوزان یک بیوپلی ساکارید غیر سمی، طبیعی و قابل تجزیه بوده که از کیتین مشتق شده و پتانسیل لازم برای استفاده به عنوان ترکیب ضد میکروبی را دارد. کیتوزان دارای خاصیت ضد میکروبی قوی برعلیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها از جمله قارچ ها،

باکتری های گرم مثبت و گرم منفی می باشد. عملکرد ضد میکروبی کیتوزان تابع عوامل داخلی مانند نوع کیتوزان، درجه استخلاف کیتوزان و همچنین عوامل خارجی از جمله نوع میکروارگانیسم، شرایط محیطی و حضور ترکیبات دیگر می باشد[12]. استفاده از کیتوزان در سیستم های غذایی باید بر اساس اطلاعات کافی در مورد خواص ضد میکروبی پیچیده این ترکیب باشد. تصویر 1-11 ساختار شیمیایی کیتوزان را نشان می دهد.



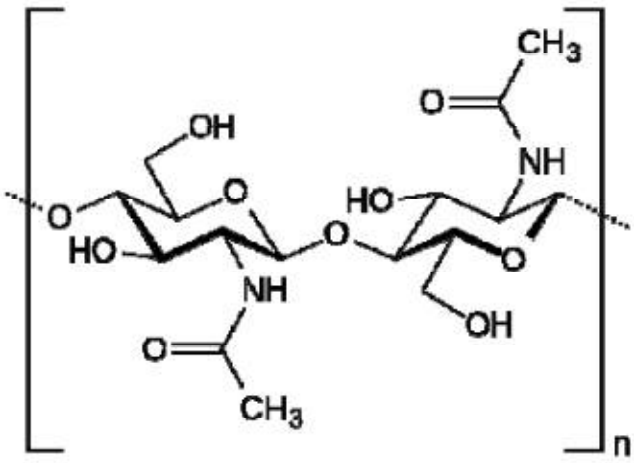
شکل 1-11 ساختار شیمیایی پلیمر کیتوزان

کیتوزان یک کوپلیمر از گلوکز آمین و ان- استیل گلوکز آمین است که به وسیله ان- دی استیلاسیون کیتین از ضایعات خرچنگ و میگو تهیه می شود. اثرات ضد میکروبی، ضد سرطانی و کاهندگی کلسترول کیتوزان به اثبات رسیده است[1].

ماده اولیه تولید کیتوزان، کیتین می باشد. این ترکیب اولین بار در سال 1811 توسط براکنت[1] از قارچ جداسازی شد و فونجین نامیده شد. کیتین بعد از سلولز، فراوان ترین پلیمر طبیعی است. کیتین ماده ای سخت با ساختار کریستالی و سفید رنگ است و ماده اصلی پوسته جانوران دریایی می باشد. کیتین یک پلی ساکارید فوق العاده قلیایی می باشد. به علت ساختار شیمیایی، خصوصیات و عملکرد های متفاوت باعث شده که تا کنون بیش از 3000 اختراع کاربردی از کیتین و کیتوزان و مشتقات آن ها به ثبت برسد[2]. این ترکیب پلیمری خطی از واحد های ان-استیل-دی گلوکز آمین (ان-استیل-2 دئوکسی-دی-گلوکز پیرانوس) می باشد که توسط پیوند های β -D به همدیگر متصل شده اند. وزن مولکولی آن ها بسیار بالا بوده و می تواند به 10 میلیون برسد. این ترکیبات در صنایع مختلف داروسازی، آرایشی، کشاورزی، صنایع غذایی، تولیدات گیاهی، پالایش آب، زیست فناوری، پزشکی و دامپزشکی، کاغذ سازی، پالایش فلزات

[1] Braconnot

سنگین، تغذیه حیوانات، شیمی فیبر و نساجی کاربرد دارند، شکل 1-12 ساختار مولکولی کیتین را نشان می دهد [12].



شکل 1-12 ساختار مولکولی کیتین

1-12 بررسی اثرات ضد میکروبی

اصولا ارزیابی اثر ضد میکروبی یک ماده، به صورت آزمایشگاهی[1] برای سه منظور انجام می گردد:

[۱] تعیین قدرت ضد میکروبی ماده به صورت محلول

[۲] تعیین حداقل غلظت ماده در بدن

[۳] تعیین حساسیت یک میکروب خاص نسبت به غلظت های مشخص ماده

1-13 تعیین MIC[2] به روش میکرودایلوشن (ریز رقت)

برای تعیین میزان سمیت و مقادیر مؤثر ترکیبات مهار کننده از جمله داروها و اسانس های گیاهی از روش بررسی تعیین حساسیت استفاده می شود. در تعیین MIC حداقل غلظت جلوگیری از رشد میکروارگانیسم توسط یک ماده مهار کننده می باشد. استاندارد نمودن مقدار تلقیح در این روش برای باکتری ها، نوع محیط کشت استفاده شده، مدت زمان انکوباسیون و تعیین نقطه انتهایی مهم است. شرایط بهینه برای این آزمون میزان تلقیح سوسپانسیون $1.5 \times 10^8\ CFU/ml$ از میکروارگانیسم ها در محیط کشت است[63].

[1] Invitro
[2] Minimum Inhibitory Concentration

مدت زمان انکوباسیون 48 تا 72 سلعت در دمای 37 درجه سانتی گراد با تقطه پایانی حداقل 50 درصد مهار رشد در مقایسه با نمونه شاهد، مورد تأیید می باشد[63].

1-13-1 متغیر های مؤثر در انجام آزمون MIC

این متغیر ها شامل این موارد است:

[۱] pH محیط کشت

[۲] تعداد میکروارگانیسم تلقیح شده

[۳] نوع میکروارگانیسم

[۴] میزان ماده مهار کننده مورد آزمایش (اسانس یا فراورده دارویی)

[۵] مدت زمان و دمای انکوباسیون

[۶] قطر محیط کشت

این عوامل می توانند در نتیجه نهایی آن و در تکرار های بعدی یا در آزمایشگاه های مختلف متفاوت بوده و MIC متفاوتی برای یک ماده شیمیایی گزارش شود[63].

1-13-2 تعیین MBC[1]

برای تعیین میزان سمیت و مقادیر مؤثر ترکیبات مهار کننده از جمله داروها و اسانس های گیاهی از روش بررسی تعیین حساسیت استفاده می شود. تعیین MBC حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم توسط یک ماده مهار کننده می باشد[63].

1-13-3 دیسک دیفیوژن[2]

این روش معمول ترین شکل ارزیابی مواد ضد میکروبی است و به نام تست Kirby-Bauer معروف است. اساس این روش بدین صورت است که سطوح پتری دیش های حاوی محیط کشت آگار به طور یکنواخت توسط مقدار مشخصی از میکروارگانیسم مورد آزمایش تلقیح می شود. سپس دیسک های کاغذی[3] که توسط غلظت های مشخصی از ماده مورد آزمایش تلقیح شده اند بر روی سطح آگار جامد قرار داده می

[1] Minimum Bactericidal Concentration
[2] Disk diffusion
[3] Paper disk

شوند. در طول انکوباسیون ماده مورد آزمایش از روی دیسک به سطح آگار انتشار می یابد در صورتی که این ماده مؤثر واقع گردد در اطراف دیسک هاله عدم رشد به صورت یک دایره روشن تشکیل می گردد. قطر هاله عدم رشد را می توان با غلظت آنتی بیوتیک موجود در دیسک متناسب دانست. سپس قطر هاله های ایجاد شده توسط کولیس اندازه گیری شده و با توجه به غلظت هر ماده با جدول استاندارد مقایسه می گردد که نتایج حاصل عبارتنداز:

[۱] میکروارگانیسم حساس[1]

[۲] میکروارگانیسم مقاوم[2][57]

1-13-3-1 دینامیک تشکیل هاله

در طی انکوباسیون، ماده ضد میکروبی از منبع ذخیره (Paper disk) در آگار انتشار می یابد. قسمتی از جمعیت میکروبی که دور از تأثیر ماده ضد میکروبی است با تقسیم سلولی ازدیاد می یابد. لبه هاله وقتی تشکیل می گردد که غلظت حداقل ماده ضد میکروبی که رشد میکروارگانیسم را روی آگار متوقف می کند، برای بار اول به یک جمعیت میکروبی برسد که تراکم آن به حدی باشد که بتواند رشد آن را متوقف کند. بنابراین محل لبه هاله با تراکم اولیه جمعیت، سرعت رشد میکروارگانیسم و سرعت انتشار ماده ضد میکروبی تعیین می گردد[40].

1-13-3-2 دیسک های آنتی بیوتیک

این دیسک ها از کاغذ هایی با کیفیت بالا و با غلظت مشخص از آنتی بیوتیک و به طو ر استاندارد تهیه شده اند. دیسک های ذخیره باید در حرارت 20- درجه سانتی گراد و دیسک های مصرفی در یخچال 8-2 درجه سانتی گراد نگهداری کنید. نگهداری دیسک ها در حرارت بالاتر باعث افت قدرت دیسک ها شده و جواب مناسبی نخواهد گرفت[57].

1-13-4 انتشار در آگار (چاهک)

اساس این روش نیز مانند روش دیسک دیفیوژن است با این تفاوت که به جای دیسک های کاغذی، چاهک هایی به قطر 6 mm در پلیت های محتوای محیط کشت آگار جامد ایجاد می شود و ته چاهک ها با

[1] Sensitive
[2] Resistant

محیط کشت مایع ته بندی می گردد. سپس سطوح پتری دیش های حاوی محیط کشت آگار به طور یکنواخت توسط مقدار مشخصی از میکروارگانیسم مورد آزمایش تلقیح می شود. سپس غلظت های مختلفی از ماده مورد آزمایش درون چاهک ها تلقیح می شود. در طول انکوباسیون ماده مورد آزمایش از درون چاهک ها به سطح آگار انتشار می یابدو در صورت مؤثر واقع شدن در اطراف چاهک ها هاله عدم رشد به صورت یک دایره روشن تشکیل می گردد. در این روش دینامیک تشکیل هاله همانند روش دیسک دیفیوژن است[40].

14-1 روش های تهیه سوسپانسیون

سوسپانسیون باکتری که دارای میزان مشخصی از میکروارگانیسم است به صورت زیر تهیه می شود:

[۱] تهیه سوسپانسیون و مقایسه با کدورت مک فارلند[1] براساس جدول استاندارد مک فارلند

[۲] اندازه گیری میزان شفافیت[2] لوله 0/5 مک فارلند در طول موج 620 نانومتر و تنظیم شفافیت سوسپانسیون با شفافیت ثابت و مشخص شده لوله 0/5 مک فارلند تازه تهیه شده که بیانگر وجود 1.5×10^8 سلول باکتری در هر میلی لیتر خواهد بود[63].

15-1 بیان مسئله

سینوزیت عبارت است از التهاب مخاطات موجود در سینوس های صورت به ویژه سینوس های بینی که توسط عوامل گوناگون از جمله عفونت های میکروبی ایجاد می شود. سینوزیت در بین مراجعان سرپایی به پزشک که احتیاج به تجویز آنتی بیوتیک دارند؛ حدود 75 % از موارد را شامل میشود. از جمله باکتریهای شایع درایجاد این بیماری می توان به *استرپتوکوک پنومونیه*، *استرپتوکوک گروهA* ، *استافیلوکوک اورئوس*، *پسودوموناس آئروجینوزا*، *هموفیلوس آنفلوانزا*، *موراکسلا کاتارالیس*، *کلامیدیا پنومونیه* و مخلوط بی هوازی ها اشاره کرد. در این پژوهش بر روی شماری از این باکتری های درگیردر عفونت سینوزیت از جمله *استرپتوکوکوس پنومونیه*، *استرپتوکوکوس پیوژن*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *پسودوموناس آئروجینوزا* بررسی هایی صورت می پذیردکه ازجمله باکتریهای شایع در عفونت سینوزیت می باشد. سینوزیت میتواند باعث تب بالا، ضعف، احساس خستگی، از بین رفتن حس چشایی، بویایی و سرفه های خلط دار که هنگام

[1] Mcfarland
[2] Transmitance

شب بدتر می شود، گردد. ممکن است در موارد بسیار نادر عفونت به استخوانهای صورت و یا غشاء پوشاننده مغز(مننژ) سرایت کند و گاهی ممکن است ایجاد آبسه در ناحیه چشم و یا مغز و یا استخوانهای صورت گردد. درمان این بیماری با توجه به سوشهای شایع و عوامل ایجاد کننده عبارت است از، آنتی بیوتیک+ترکیبات موکولیتیک+ ضد احتقانها.

در منابع مختلف گیاه درمانی، از اسانسهای گیاهی مانند درمنه (*Artemisia sieberi Besser*)، دارچین (*Cinnamomum verum* J. Presl)، اسطوخودوس (*lavandula angustifolia* Mill) و مورد (*Myrtus communis* L) به عنوان یک عامل آنتی باکتریال یاد شده است و همچنین در برخی ازمقالات به نفوذپذیری بالای این اسانسها اشاره شده است. امروزه درمان آنتی بیوتیکی این عفونت ها با مشکلات عدیده ای روبروست که همین امر استفاده از آنتی بیوتیک های رایج را با محدودیت مواجه می کند. از این رو گرایش ها به سمت استفاده از اسانس های گیاهی معطوف شده که هم عوارض کمتری دارد و هم در مواردی اثر گذاری بیشتری. نانواسانس ها مایعاتی فرار، منعکس کننده و ترکیباتی معطر و بی رنگ با منشأ ترپنی و الکلی و. . . می باشند که در مقادیر بسیار پایین اثرات بیولوژیک بیشتری را اعمال میکند بنابراین در صنعت بسیار بهینه و مقرون بصرفه است، از طرف دیگر با کاهش مقدار داروی استفاده شده ایمیونوژنیسیته نسبت به دارو کاهش یافته و بطبع عوارض ناشی از دارو نیز بسیار کاهش می یابد که از نظر علمی می تواند بسیار ارزشمند باشد. نظر به اینکه گیاهان دارویی در کشور ما پراکندگی وسیعی دارند و مصرف روزافزون داروهای شیمیایی سبب مقاومت میکروارگانیسم ها به این قبیل داروها می شود، ارزیابی اثر ضد میکروبی نانو اسانس گیاهانی درسال های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. بدین لحاظ انجام تحقیقات به منظور مقایسه اثرات ضد میکروبی نانواسانس های گیاهی ضروری می نماید.

16-1 ضرورت اهمیت موضوع

نظر به اینکه مصرف روزافزون داروهای شیمیایی روز به روز مشکلات حادتری از قبیل پدیده خودایمنی بر اثر مصرف مداوم و بی رویه و بدون توجه به طریقه خاص مصرف دارو و عوارض جانبی که برخی از خود بیماری خطرناک تر هستند را به وجود می آورند و یا به دلیل مشکل مقاومت میکروارگانیسم ها به داروهای شیمیایی، ارزیابی اثر ضد میکروبی نانو اسانس گیاهانی که خود از اسانس های گیاهی تهیه شده اند هدف این پژوهش می باشد.

17-1 اهداف تحقیق

1-17-1 هدف کلی

بررسی تأثیرات محافظت کننده نانواسانس های گیاهی (درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین) بر روی باکتری های درگیر در سینوزیت عفونی

2-17-1 هدف اختصاصی

[۱] تعیین MICنانواسانس های (درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین) بر روی باکتری های (*استرپتوکوک پنومونیه، استرپتوکوک پیوژن، استافیلوکوک اورئوس*، پسودوموناس *آئروژینوزا*) درگیر در عفونت سینوزیت

[۲] تعیین قطر هاله عدم رشد نانواسانس های (درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین) بر روی باکتری های (*استرپتوکوک پنومونیه، استرپتوکوک پیوژن، استافیلوکوک اورئوس*، پسودوموناس *آئروژینوزا*) درگیر در سینوزیت عفونی

18-1 فرضیات تحقیق

نانواسانس دارچین بر روی رشد *استرپتوکوک پنومونیه، استرپتوکوک پیوژن، استافیلوکوک اورئوس* و پسودوموناس *آئروجینوزا* اثر بازدارندگی دارد.

نانواسانس اسطوخودوس بر روی رشد *استرپتوکوک پنومونیه، استرپتوکوک پیوژن، استافیلوکوک اورئوس* وپسودوموناس *آئروجینوزا* اثر بازدارندگی دارد.

نانواسانس درمنه بر روی رشد *استرپتوکوک پنومونیه، استرپتوکوک پیوژن، استافیلوکوک اورئوس* و پسودوموناس *آئروجینوزا* اثر بازدارندگی دارد.

نانواسانس مورد بر روی رشد *استرپتوکوک پنومونیه، استرپتوکوک پیوژن، استافیلوکوک اورئوس* و پسودوموناس *آئروجینوزا* اثر بازدارندگی دارد.

19-1 سوالات تحقیق

آیا امکان دست یابی به داروهای غیر شیمیایی جدید متشکل از نانو اسانس های گیاهی برای درمان سینوزیت عفونی وجود دارد؟

آیا نانواسانس ها ی اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین اثر بازدارندگی بر روی رشد *استرپتوکوک پنومونیه*، *استرپتوکوک پیوژن*، *استافیلوکوک اورئوس* و *پسودوموناس آئروجینوزا* دارند؟

منابع پارس پژوهه

فصل دوم

مروری بر متون گذشته

منابع پارس پژوهه

1-2 سوابق تحقیق در ایران و سایر کشور ها در زمینه استفاده از اسانس ها و نانواسانس های گیاهی

استفاده از طب سنتی قرن هاست که در بسیاری از جوامع جهت درمان بیماری های مختلف انسانی شناخته شده است. در طی بیست سال گذشته علاقه مندی زیادی در خصوص استفاده از مواد طبیعی به عنوان منابع عوامل ضد باکتریایی جدید به وجودآمده است. هرچند که استفاده از آنتی بیوتیک ها درمان عفونت باکتری های مختلف را امکان پذیر ساخته است اما استفاده بی رویه و مفرط از آن منجر به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در میان میکروارگانیسم ها شده است. این امر نیاز به توسعه درمان های ضد میکروبی جدید را با استفاده از منابع گیاهی ضروری می نماید[3].

از طرفی دیگر به منظور افزایش اثر بخشی ترکیبات مؤثره گیاهی به خصوص اسانس های گیاهی که اثرات ضد میکروبی بسیاری از آن ها به اثبات رسیده است[10] و با توجه به محدود بودن منابع گیاهی، فرمولاسیون های جدید داروها و ترکیبات گیاهی بر مبنای بهره وری از علم نانو به منظور استفاده حداقل آن ها مورد توجه جدی قرار گرفته اند[54].

تاکنون مطالعات بسیار محدودی در زمینه خواص نانواسانس های درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین انجام شده است؛ بنابراین در این پژوهش اثر ضد میکروبی نانو اسانس های مذکور را در مقایسه با اسانس های طبیعی آن ها مورد مطالعه قرار داده و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) آن ها را با تکنیک میکرودایلوشن براث و دیسک دیفیوژن مورد ارزیابی قرارگرفت.

طی مطالعه یزدی و همکاران (2008) اثر ضد میکروبی مورد، آویشن، اکالیپتوس را بر روی 3 میکروارگانیسم عامل سینوزیت و برونشیت یعنی *استرپتوکوک پنومونیه*، *هموفیلوس آنفولانزا* و *موراکسلا کاتارالیس* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بیانگر اثرات خوب این اسانس ها از جمله مورد علیه این میکروارگانیسم ها بود[58].

در طی مطالعه دیگر که توسط هاشمی و همکاران (2011) در خصوص فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی مورد، اسپند و آویشن بر روی سوش های استاندارد و ایزوله های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا*

صورت گرفت مشخص گردید که آویشن و مورد اثر ضد میکروبی خوبی علیه *پسودوموناس آئروژینوزا* از خود نشان می دهد[37].

یادگار نیا و همکاران (2006) در مطالعه خود در خصوص فعالیت بیوشیمیایی اسانس گیاه مورد ایرانی نتیجه گرفتند که آنالیز GC Mass اسانس گیاه مورد حاوی 32 نوع ترکیب مختلف می باشد و این گیاه فعالیت ضد میکروبی بسیار خوبی در مقابل *استافیلوکوک اورئوس*، *اشریشیاکلی*، *کاندیدا آلبیکنس* نشان می دهد[71].

شهیدی و همکاران (2004) اثر بخشی اسانس تعدادی از گیاهان دارویی ایران را بر ضد باکتری های *پسودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا*، *بوردتلا*، *استافیلوکوک اورئوس* و قارچ های *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا یوتلیس* نشان دادند که از این میان فعال ترین مورد مربوط به بررسی ***Myrtus communis*** در مقابل *پسودوموناس آئروژینوزا* و گونه فلوئورسانس آن بود و بیشترین اثر بخشی میکروبی را داشته است[64].

در مطالعه Ozcan (2001) اثر مهار کنندگی مخلوطی از اسانس های گیاهی از جمله مورد، نعناع و کومین را در غلظت های 1، 10 و 15 درصد بر روی میکروارگانیسم های *استافیلوکوک اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *کاندیدا روگوزا* و گونه *آسپرژیلوس نایجر* نشان داد[55].

Bonjar (2004) اثر عصاره متانولی برگ مورد را بر برخی از باکتری ها از جمله استافیلوکوک ها نشان داد[24]

در یک بررسی که توسط محققانی از دانشگاه شهید بهشتی، دانشگاه شاهد و موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور در ایران صورت گرفت پس از مشخص کردن آنالیز ترکیبات شیمیایی مورد ایرانی با روش دیسک دیفیوژن و MIC و MBC اثر اسانس بر روی *استافیلوکوک اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *کاندیدا آلبیکنس* نشان داده شد[71].

Inouye و همکاران (2001) در طی پژوهشی پس از آنالیز ترکیبات شیمیایی 14 اسانس گیاهی از جمله اسطوخودوس و دارچین، فعالیت های ضد باکتریایی آن ها را بر علیه پاتوژن های دستگاه تنفسی مورد بررسی قرار دادند. که از این میان بیشترین اثر بخشی بر روی باکتری های *استرپتوکوک پنومونیه* و *استرپتوکوک پیوژن* گزارش شد[41].

در تحقیقات به عمل آمده توسط یک سری از محققان(2006) اثرات ضد افسردگی، ضد میکروبی، ضد عفونی کنندگی و قاعدگی آوری گیاه اسطوخودوس به عنوان مهم ترین اثرات آن گزارش شده است[62].

رسولی و همکاران (2000) در طی مطالعه ای پس از آنالیز ترکیبات شیمیایی دو اسانس اسطوخودوس و مریم گلی نشان دادند که این دو اسانس در 12 ترکیب مشترک هستند و لینالول بیشترین مقدار را در بین 12 ترکیب مشترک و در بین کل ترکیبات اسانس گل اسطوخودوس دارد. سپس اثر ضد میکروبی این دو اسانس را بر *اشریشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس* مورد ارزیابی قرار دادند[59].

Nikaido و Vaara (1985) در طی مطالعه ای نشان دادند که اثر ضد میکروبی اسانس در منه کوهی بر باکتری های گرم منفی در مقایسه با باکتری های گرم مثبت کمتر است که احتمالا به دلیل لیپوپلی ساکارید های دیواره سلولی باکتری های گرم منفی است[52].

حکیمی میبدی و همکاران (12003) در تحقیقی فعالیت بیولوژیکی اسانس درمنه ایرانی مورد بررسی قرار دادند در این پژوهش خاصیت ضد میکروبی و قارچ کشی اسانس گیاه درمنه مطرح شد. همچنین در این تحقیق به این موضوع اشاره شده است که ترکیب اصلی اسانس درمنه دشتی شامل کامفور، لیمونن، سینئول، کامفن و پینین است[36].

Heywood و همکاران (1997) در طی مطالعه ای ترکیبات شیمیایی اسانس حاصل از عصاره های برگ گیاه درمنه را بدین ترتیب گزارش کردند که در عصاره آبی مشتقات مهمی نظیر آلکالوئید ها، فلاوونوئید ها، تانن ها و فنل ها وجود دارد و از این گونه گیاهی در جهت مقابله با بیماری های باکتریایی در انسان و گیاه می توان سود برد[38].

عنایتی (2013) در پایان نامه دکترای خود اثر نانواسانس های درمنه، مرزه و زیره را بر روی گونه های آسپرژیلوس جدا شده از پودر ماهی کارخانجات استان مازندران بررسی کرد و به نتایج قابل ملاحظه ای رسیده است. طبق بررسی های آزمایشگاهی و داده های آماری نانو اسانس مرزه در بین نانواسانس های ذکر شده دارای بیشترین خاصیت ضد قارچی بود[16.]

نگهبان و همکاران (2013) در طی مطالعه ای کارایی اسانس نانو کپسول شده گیاه درمنه ***Artemisia sieberi*** ***Besser*** را بر شاخص های تغذیه شب پره پشت الماسی ***Plutella xylostella*** در مقایسه با اسانس های معمولی مورد بررسی قرار دادند و نتایج امر نشان داد که استفاده از فناوری نانو کپسول در آفت کش ها موجب افزایش کارایی، سازگاری بیشتر با محیط زیست، بهبود کیفیت و رهایش کنترل شده این مواد می گردد بنابراین نانو کپسول اسانس گیاه درمنه را به عنوان یک حشره کش در کنترل این حشره با قابلیت بالا معرفی کردند که نیاز به مطالعات تکمیلی در این زمینه داشت[51].

سفیدکن و همکارانش در پژوهشی اثر ضد سرطانی نانو کپسول عصاره گیاه علف چشمه *Nasturtium officinalis* Br. R (L) مورد بررسی قرار دادند و نتایج حاکی از آن بود که نانوکپسول عصاره گیاه چشمه نسبت به عصاره تام در غلظت ثابت و در مدت زمان مشابه تعداد بیشتری از سلول های سرطانی را از بین ببرند[13].

منابع پارس پژوهه

فصل سوم

مواد و روش کار

منابع پارس پژوهه

1-3 دستگاه های مورد نیاز

- هود لامینار مدل ژال
- دستگاه اسپکتوفتومتر
- دستگاه اولتراسونیک کیت
- دستگاه الایزاریدر مدل TECAN
- دستگاه همزن مغناطیسی
- فور Memmert
- اتوکلاو Fedegari
- انکوباتور معمولی Memmert
- انکوباتور CO_2 دار Memmert
- اسپکتروفوتومتر APEL PD303S
- ترازوی دیجیتال METTLER TOLEDO JB1603
- شیکر لوله Heidolph Relax top
- یخچال 4 درجه مدل سامسونگ

2-3 مواد و وسایل مورد نیاز

- اسانس درمنه
- اسانس اسطوخودوس
- اسانس مورد
- اسانس دارچین
- سوش استاندارد *استرپتوکوک پنومونیه*
- سوش استاندارد *استرپتوکوک پیوژن*

مرکز پارس پژوهه

- سوش استاندارد *استافیلوکوک اورئوس*
- سوش استاندارد *پسودوموناس آئروژینوزا*
- محیط کشت BHI (Brain Heart Infusion broth)
- محیط کشت Mueller Hinton broth
- محیط کشت Mueller Hinton agar
- محیط کشت بلاد آگار HiMedia
- کیتوزان
- اسید استیک 1 درصد
- اسید میریستیک
- کربودی ایمید
- هیدروکسید سدیم
- اتانول
- پودر قند گلوکز (Merck)
- شیشه فالکون 50 میلی لیتر
- ارلن 100 میلی لیتر
- سمپلر1000-100 میکرولیتر Brand
- سمپلر 100-10 میکرولیتر Brand
- مگنت هیتر IKA RH Basic 2
- سر سمپلر استریل
- سوآب استریل
- لوپ و آنس
- سرنگ استریل
- لوله آزمایش استریل
- پلیت یکبار مصرف استریل

منابع پارس پژوهه

- آب مقطر استریل
- سرم فیزیولوژی استریل
- محلول استاندارد 0/5 مک فارلند
- پلیت 96 خانه ته صاف استریل
- دیسک کاغذی بلانک (پادتن طب)
- دیسک های آنتی بیوتیک (پادتن طب)

1-2-3 سوش های میکروبی مورد مطالعه

برای انجام آزمایش، از چهار سوش میکروبی به شرح زیر استفاده شد که تمامی آنها از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران[1] به شرح زیر تهیه گردید:

[1] *Streptococcus pneumonia* PTCC (1240) NCTC (7465)
[2] *Streptococcus pyogenes* PTCC (1447) CIP (5405)
[3] *Staphylococcus aureus* PTCC (1112) ATCC (6538)
[4] *Pseudomonas aeruginosa* PTCC (1430) ATCC (27853)

2-2-3 اسانس های مورد مطالعه

اسانس های مورد مطالعه در این تحقیق به صورت تجاری از شرکت باریج اسانس تهیه گردیده شد. همچنین برای اطمینان از عدم آلودگی اسانس ها به میکروارگانیسم های قارچی و باکتریایی، این اسانس ها را بر روی محیط های کشت برده، هیچ گونه آلودگی مشاهده نگردید.

[1] PTCC: Persian type culture collection

شکل 3-1 اسانس های تهیه شده از شرکت باریج اسانس کاشان

3-3 روش کار

3-3-1 روش تهیه نانواسانس های درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین

3-3-1-1 تهیه محلول کیتوزان

برای تهیه محلول کیتوزان 0/5 درصد که در ساخت نانوژل به کار برده می شود، 0/5 گرم کیتوزان را در اسید استیک 1 درصد با pH=3-3/5 حل شده و برای حل شدن بهتر، آن را همراه با یک مگنت روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار داده تا کاملا حل شد، برای یکنواخت سازی محلول را به مدت 20 دقیقه سونی کیت نمودیم. (شکل 3-2)

منبع پایان نامه

شکل 3-2 دستگاه اولترا سونی کیت در مرکز ژنتیک

کربودی ایمید و میرستیک اسید را در داخل همزن قطره قطره به محلول کیتوزان اضافه شد سپس به وسیله ی یک باز (هیدروکسید سدیم)pH آن را به 9-8/5 رساندیم. 75 درصد از میرستیک اسید آزاد است و 25 درصد از آن درگیر واکنش است. نصف این مقدار می خواهیم وارد واکنش کنیم تا خاصیت آبدوستی واکنش ما حفظ شود. بنابراین مقدار کربودی ایمید را 3 برابر میرستیک اسید در نظر گرفتیم تا قابلیت ایجاد پیوند بین همه را داشته باشد که مقدار اضافه آن در طی واکنش شسته شود (کربودی ایمید به نور حساس است لذا واکنش در تاریکی انجام شد).

محلول فوق حالت ژله ای به خود گرفت و غلیظ شد، سپس محلول را 3 بار سانتریفوژ کرده (سانتریفوژ با دور 19000). در مرحله اول سانتریفوژ، ژل تشکیل شده را جدا سپس روی این ژل اتانول ریخته شد. اتانول ژل را شستشو داده و باعث شد که کربودی ایمید اضافی، کیتوزان و میرستیک اسید پیوند نیابد و از محلول خارج شود. مرحله 2 و3 سانتریفوژ با استفاده از اتانول انجام شد.

برای اینکه بتوان ژل را یکنواخت (مایع) کرد به وسیله اسید استیک با pH=3-3/5 ژل را رقیق کرده و در نهایت به خاطر اینکه ناخالصی ها، آلودگی ها، ترکیبات پیوند نیافته و برای ریز تر شدن ذرات، نانوژل را از

فیلتر با Cut off، 0/2 میکرومتر عبور دادیم. سپس برای درست کردن 5000 ppm نانواسانس حدود 25 میکرولیتر از اسانس را با 5000 میکرولیتر نانوژل آماده شده در مرحله قبل مخلوط کرده و در دستگاه اولترا سونی کیت به مدت 5 دقیقه با دور 0/5-0/6 و دامنه 60-70 سونی کیت نمودیم.

3-3-2 روش تهیه محیط کشت اولیه برای رشد

3-3-2-1 محیط BHI[1]

محیط BHI (E. Merk, 64271 Darmstadt , Germany) غنی از مواد مغذی می باشد که جهت رشد بسیاری از میکروارگانیسم ها می توان از آن استفاده نمود. این محیط را می توان به صورت آبگوشت (BHIbroth) یا سخت شده به وسیله آگار (BHI agar) با یا بدون اضافه کردن خون مورد استفاده قرار داد. که در این پژوهش ازBHI براث استفاده شد وپس از اتوکلاو کردن آن را در یخچال نگهداری کردیم.

3-3-2-2 محیط MHA[2]

محیط MH آگار (E. Merk, 64271 Darmstadt, Germany) به عنوان یک محیط مغذی پایه جهت تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری ها (آنتی بیوگرام) به روش دیسک استفاده می شود. برای تهیه این محیط پس از حل نمودن پودر دهیدراته محیط در آب مقطر و اتوکلاو نمودن در پلیت های استریل تقسیم می نمایند. و پس از بسته شدن محیط ها برای اطمینان از عدم آلودگی، محیط کشت های آماده شده تا زمان مصرف در یخچال 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

3-3-2-3 محیط BA[3]

محیط کشت آگار خون دار(E. Merk , 64271 Darmstadt , Germany) یکی از محیط های کشت مغذی است که رشد بسیاری از باکتری ها را تأمین می کند و همچنین ایجاد همولیز بر روی این محیط به راحتی قابل بررسی است. برای تهیه آن محیط پس از تهیه آگار پایه لازم است محیط 40 تا 50 درجه سانتی گراد خنک شود.

[1] Brain Heart Infusion
[2] Mueller Hinton agar
[3] Blood agar

در این مرحله 5 میلی لیتر خون تازه به ازای هر 100 میلی لیتر محیط افزوده و پس از مخلوط کردن در پلیت های استریل تقسیم شد و پس از بسته شدن محیط ها برای اطمینان از عدم آلودگی، محیط کشت های آماده شده تا زمان مصرف در یخچال 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

3-3-3 فعال کردن باکتری ها و انتقال آن ها به محیط کشت

باکتری های مذکور به صورت آمپول های لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری های صنعتی ایران تهیه کردیم. آمپول میکروبی را به وسیله اره مخصوص از محل مشخص باز کرده و حدود 0/5 میلی لیتر از محیط کشت استریل را که قبلا تهیه شده و توسط اتوکلاو استریل گردیده است به ماده خشک موجود در آمپول میکروبی اضافه کرده و بعد از یکنواخت شدن سوسپانسیون حاصل آن را درون یک لوله آزمایش که حاوی 10 سی سی محیط کشت استریل شده منتقل کردیم و آن را برای مدت 15 دقیقه در معرض هوای آزمایشگاه قرار داده و سپس آن را در شرایط هوازی به مدت 48-24 ساعت انکوبه کردیم، این محیط، محیط کشت پایه برای میکروب ها بود.

3-3-4 روش تهیه محلول سوسپانسیون میکروبی

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، در ابتدا 24 ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت مولر هینتون آگار و بلاد آگار (مرک آلمان) تلقیح شد. پس از رشد کلنی های باکتری، به کمک آنس استریل از قله 3-4 کلنی میکروبی برداشت کرده و داخل یک لوله حاوی سرم فیزیولوژی به صورت سوسپانسیون در آورده تا کدورتی به اندازه کدورت لوله استاندارد نیم مک فارلند به دست آید و غلظت سوسپانسیون باکتری پس سنجش با دستگاه اسپکتروفتومتر غلظتی برابر با $1.5 \times 10^8\ CFU/ml$ بود[63]. برای بدست آوردن غلظت $1.5 \times 10^6\ CFU/ml$ و غلظت نهایی، دوباره با سرم فیزیولوژی استریل رقت 1: 100 تهیه، تا سوسپانسیون نهایی برای انجام آزمون حساسیت دارویی و انجام آزمون MIC و ریختن سوسپانسیون به داخل گوده ها آماده شد[61].

3-3-5 روش ساخت کدورت های استاندارد مک فارلند

کدورت های مک فارلند، مرجعی برای تخمین تقریبی غلظت های سوسپانسیون موجود در لوله های حاوی میکروارگانیسم ها می باشند. روش ساخت کدورت های مک فارلند به قرار زیر است. ابتدا 11 عدد لوله

آزمایش دارای اندازه یکسان و تمیز انتخاب کرده سپس محلول آبی 1/175 درصد کلرید باریم و 1 درصد اسیدسولفوریک را تهیه و طبق مقادیر درج شده طبق جدول شماره 3-1 به آهستگی این مواد را به ترتیب داخل لوله ها ریخته به طوری که در هر لوله آزمایش 10 میلی لیتر محلول داشته باشد. سپس درب لوله ها را بسته و به طور کامل مخلوط کردیم تا کدورت هر کدام از لوله ها تقریبا برابر غلظت سوسپانسیون مورد نظر که در جدول شماره 3-1 نشان داده است به دست آید.

جدول 3-1 روش تهیه استاندارد لوله های مک فارلند [32]

Tube NO.	Barium Chloride 1%(ml)	Sulfuric acid 1% (ml)	Approximally cell 10^8ml) *density(1
0.5	0.05	9.95	$1.5x10^8$
1	0.1	9.9	$3x10^8$
2	0.2	9.8	$6x10^8$
3	0.3	9.7	$9x10^8$
4	0.4	9.6	$12x10^8$
5	0.5	9.5	$15x10^8$
6	0.6	9.4	$18x10^8$
7	0.7	9.3	$21x10^8$
8	0.8	9.2	$24x10^8$
9	0.9	9.1	$27x10^8$
10	1	9.0	$30x10^8$

3-3-6 تعیین MIC با روش میکرودایلوشن

در این پژوهش برای سنجش MIC از روش میکرودایلوشن استفاده شد. در این روش از میکروپلیت های 96 خانه ته صاف استریل به همراه محیط BHI استفاده گردید. پائین ترین غلظتی که از رشد باکتری جلوگیری کند به عنوان MIC ماده ضد میکروبی در نظر گرفته شد که بر حسب میلی گرم در میلی لیتر، میکروگرم در میلی لیتر، میکرولیتر در میلی لیتر و یا به صورت واحد بین المللی در میلی لیتر بود[63].

3-3-6-1 روش علمی تعیین MIC

برای تعیین MIC ابتدا به هر یک از گوده های پلیت 96 خانه به وسیله سمپلر هشت کاناله به میزان 100 میکرولیتر از محیط BHI اضافه شد، سپس از نانواسانس های درمنه، اسطوخودوس، مورد، دارچین (هر کدام

به طور جداگانه) رقت های سریالی در 12 رقت در میکروپلیت های مسطح 96 خانه ای به میزان 100 میکرولیتر برای هر چاهک تهیه شد، بدین صورت که به گوده اول از سمت چپ اضافه و به خوبی با محیط مخلوط شد، در ادامه از گوده اول به میزان 100 میکرولیتر برداشت و به گوده دوم منتقل و به همین ترتیب رقت $^1/_2$ ازنانو اسانس در هر گوده تهیه و در نهایت از گوده دوازدهم 100 میکرولیتر نانواسانس خارج شد. در این روش، چاهک اول حاوی بیشترین غلظت و چاهک دهم حاوی کمترین غلظت است. بعد به هر یک از گوده ها به میزان ثابت 100 میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد شده اضافه نموده تا حجم نهایی محلول برابر 200 میکرولیتر شد که با غلظت های نانواسانس آن متفاوت است. به عنوان شاهد مثبت و منفی از دو گوده در میکروپلیت استفاده کردیم که کنترل مثبت[1] حاوی 100 میکرولیتر محیط و 100 میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی بود و کنترل منفی[2] حاوی100 میکرولیتر محیط و100 میکرولیتر نانواسانس بود. این آزمون برای هر باکتری و هر نانواسانس در ردیف افقی مجزا و به صورت دو بار تکرار انجام شد.

جهت مقایسه تأثیر نانواسانس ها با اسانس های مذکور، MIC اسانس ها نیز به همین روش تعیین شد. لازم به ذکر است که به دلیل داشتن پایه چربی، اسانس های مذکور به نسبت 1 به 10 با محلول DMSO 10[3] درصد رقیق شدند.

در این آزمون بیشترین غلظت در گوده اول معادل 50 و کمترین غلظت در گوده دوازدهم برابر با 0/024 میکروگرم در هر میلی لیتر بود.

این پلیت ها در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 48 ساعت انکوبه شدند. بعد از گذشت این زمان میکروپلیت ها از انکوباتور خارج و هم به صورت چشمی و هم توسط دستگاه الایزا ریدر[4] در طول موج 540 نانومتر قرائت شد. گوده ای که مانع رشد باکتری گردیده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

در روش چشمی مطابق یک قاعده کلی برای نشان دادن میزان رشد طبق راهنما از 5 امتیاز یعنی امتیاز صفر (عدم رشد واضح)، امتیاز یک (25 درصد رشد)، امتیاز دو (50 درصد رشد)، امتیاز سه (75 درصد رشد)، امتیاز چهار (100 درصد رشد)، در مقایسه با چاهک کنترل، که رشد 100 درصد دارد، استفاده شد. در این آزمون رقتی که در آن 100 درصد رشد باکتری مهار شده بود به عنوان MIC_{90} در نظر گرفته شد. در روش استفاده از دستگاه الایزا ریدر کمترین غلظتی که برابر با MIC_{90} باشد جواب آزمون بود.

[1] Growth control (GC)
[2] Sterility control (SC)
[3] Dimethyl Sulfoxide
[4] Elisa Reader

لازم به ذکر است که در تمام زمان انجام آزمایش از دست زدن و ایجاد کدورت در کف میکروپلیت 96 خانه جداً اجتناب شود.

7-3-3 تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری یا MBC[1]

MBC بنا به تعریف کمترین غلظتی از فعالیت باکتری است که در آن غلظت 9/99 درصد از میکروارگانیسم ها از بین رفته باشند. برای تعیین MBC، با استفاده از سمپلر، از گوده MIC و گوده بعد از MIC که رشد داشت و گوده های قبل از MIC به میزان بالاتر اسانس مقدار 50 میکرولیتر برداشت و به روی محیط های بلاد آگار(محیط انتخابی باکتری های *استرپتوکوک پنومونیه* و *استرپتوکوک پیوژن*) و برروی محیط مولر هینتون آگار (باکتری *استافیلوکوک اورئوس* و *پسودوموناس آئروژینوزا*) برده و بعد از کشت به مدت یک هفته انکوبه کردیم. بعد از گذشت این زمان هر رقتی که در پلیت مانع رشد کامل باکتری شده باشد یا کمتر از 3 کلنی (تقریبا معادل 99/5-99 درصد فعالیت کشندگی) وجود داشته باشد به عنوان MBC در نظر گرفته شد. هر رقتی که مانع رشد کامل باکتری شد و در صورتی که اختلاف مقدار MBC و MIC زیاد بود، باکتری مورد نظر نسبت به عمل کشندگی مقاوم در نظر گرفته شد و اگر اختلاف مقدار این دو کم بود نشان از حساس بودن این سوش به نانواسانس و یا اسانس مربوطه داشت و طبیعتا برای از بین بردن آن نیاز به تجویز بیشتر ماده ضد میکروبی نمی باشد[63].

8-3-3 روش انتشار در آگار (دیسک کاغذی)

ابتدا هر نانواسانس را در 12 میکروتیوپ رقت سازی کردیم. رقت سازی به این ترتیب صورت گرفت که در هر میکروتیوپ 100 میکرولیتر محیط کشت BHI براث ریخته وسپس 100 میکرولیتر از نانواسانس مورد نظر برداشته و در میکروتیوپ اول با محیط کشت مخلوط کردیم. در ادامه از اولین میکروتیوپ به میزان 100 میکرولیتر برداشته و به میکروتیوپ بعدی منتقل و به همین ترتیب رقت $^1/_2$ از نانواسانس در هر میکروتیوپ تهیه و در نهایت از دوازدهمین میکروتیوپ 100 میکرولیتر نانواسانس خارج کردیم.

سپس دیسک های کاغذی در ظروف استریل قرار داده و با میزان 15 میکرولیتر از نانواسانس های مذکور با غلظت های 0/024 تا 50 میکروگرم در میلی لیتر آغشته کردیم. این دیسک ها منابع ذخیره کننده نانواسانس

[1] Minimum Bactericidal Concentration

ها گیاهی است و اساس کار آن ها بر مبنای انتشار ماده آنتی باکتریال در محیط کشت حاوی باکتری های مورد نظر می باشد.

سپس توسط سوآب استریل مقداری از سوسپانسیون میکروبی مورد نظر که دارای کدورتی به اندازه کدورت 0/5 مک فارلند است در شرایط کاملا آسپتیک برداشته و از سه جهت افقی، مورب و عمودی روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار جهت باکتری های استافیلوکوک اورئوس و پسودوموناس آئروژینوزا و بلاد آگار جهت باکتری های استرپتوکوک پنومونیه و استرپتوکوک پیوژن که از قبل در پلیت های 10 سانتی به ارتفاع 5 میلی متر آماده شده بود کشیدیم. بعد کمی صبر کردیم تا سطح آن خشک شود، سپس دیسک های حاوی غلظت های مختلف هر نانواسانس را در فواصل معینی با پنس استریل روی سطح آن قرار داده و به عنوان شاهد منفی از یک دیسک بلانک که آغشته به آب مقطر است استفاده کردیم. سپس پلیت ها را برای مدت 24 ساعت در انکوباتوری با دمای 37 درجه قرار دادیم. لازم به ذکر است که پنومونیه در انکوباتور CO_2 دار قرار دادیم و بعد در صورت وجود، قطر هاله های تشکیل شده را توسط کولیس اندازه گیری کردیم[57].

1-8-3-3 دیسک های آنتی بیوتیک مورد آزمایش (شاهد مثبت)

برای تهیه دیسک های شاهد مثبت، دیسک های آنتی بیوتیک استاندارد را توسط پنس استریل ودر کنار شعله برداشته و به محیط کشت مولر هینتون آگار و بلاد آگار حاوی باکتری های مورد نظر منتقل کردیم. دیسک های آنتی بیوتیک را می توان با توجه به علامت اختصاری که روی هر یک از آن ها حک شده است شناسایی کرد. پس از قرار دادن دیسک های آنتی بیوتیک در سطح پلیت، آن ها را به انکوباتور 37 درجه منتقل کردیم. و بعد از 24 ساعت هاله شفاف اطراف دیسک های حاوی نانواسانس گیاهان مورد نظر با قطر هاله های ایجاد شده در اطراف دیسک های آنتی بیوتیک هر باکتری مقایسه شد.

9-3-3 روش انتشار در آگار (چاهک)

- ✓ لازم به ذکر است که به دلیل این که نانواسانس های مذکور اثر ضد میکروبی خود را بر روی باکتری های نام برده در روش دیسک دیفیوژن نشان ندادند بر آن شدیم بار دیگر این آزمون را توسط روش چاهک گذاری انجام دهیم.

در این روش ابتدا باید چاهک هایی به قطر 6 mm را در سطح پلیت های 10 cm حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار و بلاد آگار ضخامت آن حدوداً 6-8 cm است ایجاد کردیم و پس از خالی کردن چاهک ها از محیط کشت مربوطه، ته چاهک ها را با ریختن 10-20 میکرولیتر از محیط کشت مذاب ته بندی کردیم تا از انتشار نانواسانس ها به اطراف چاهک ها از انتهای پلیت جلوگیری شود. در این مرحله بعد از فرو بردن سوآب استریل در لوله های حاوی سوسپانسیون هر باکتری که دارای کدورتی به اندازه کدورت 0/5 مک فارلند بود و فشار دادن سوآپ به کناره لوله سوسپانسیون میکروبی اضافی را گرفته سپس در سطح پلیت سه بار در حالت زاویه 60 درجه نسبت به هم حرکت دادیم. بعد کمی صبر کردیم تا سطح آن خشک شود. در این مرحله درون هر چاهک میزان 200-250 میکرولیتر از نانواسانس ها با غلظت های 0/024-50 میکروگرم در میلی لیتر که قبلا در 12 میکروتیوپ رقت سازی شده بود ریختیم.

رقت سازی به این ترتیب صورت گرفت که در هر میکروتیوپ 100 میکرولیتر محیط کشت BHI براث ریخته وسپس 100 میکرولیتر از نانواسانس مورد نظر برداشته و در میکروتیوپ اول با محیط کشت مخلوط کردیم. در ادامه از اولین میکروتیوپ به میزان 100 میکرولیتر برداشته و به میکروتیوپ بعدی منتقل و به همین ترتیب رقت $1/2$ از نانواسانس در هر میکروتیوپ تهیه و در نهایت از دوازدهمین میکروتیوپ 100 میکرولیتر نانواسانس خارج کردیم.

به عنوان شاهد منفی در یکی از چاهک ها آب مقطر ریخته و سپس میکروپلیت ها را به مدت 24 ساعت انکوبه کردیم. برای انکوبه کردن استرپتوکوک پنومونیه از انکوباتور CO_2 دار 37 درجه سانتی گراد و سایر باکتری ها از انکوباتور معمولی استفاده کردیم.

به عنوان شاهد مثبت در این آزمون از اسانس هر نانواسانس مذکور که در منابع مختلف اثر ضد میکروبی آن ها به اثبات رسیده است استفاده کرده و میزان 200-250 میکرولیتر از هر اسانس را در چاهک های ایجاد شده در محیط کشت های حاوی باکتری های ذکر شده ریختیم[63].

فصل چهارم

نتایج

منابع پارس پژوهه

1-4 شرح مختصری از مطالعه

در این پژوهش به طریق برون تنی [1]تأثیر نانواسانس های گیاه درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین بر علیه باکتری های درگیر در سینوزیت از جمله *استرپتوکوک پنومونیه*، *استرپتوکوک پیوژن*، *استافیلوکوک اورئوس* و پسودوموناس *ائروژینوزا* به روش میکرودایلوشن برای تعیین MIC و MBC و انتشار در آگار (دیسک و چاهک) مورد بررسی قرار گرفت.

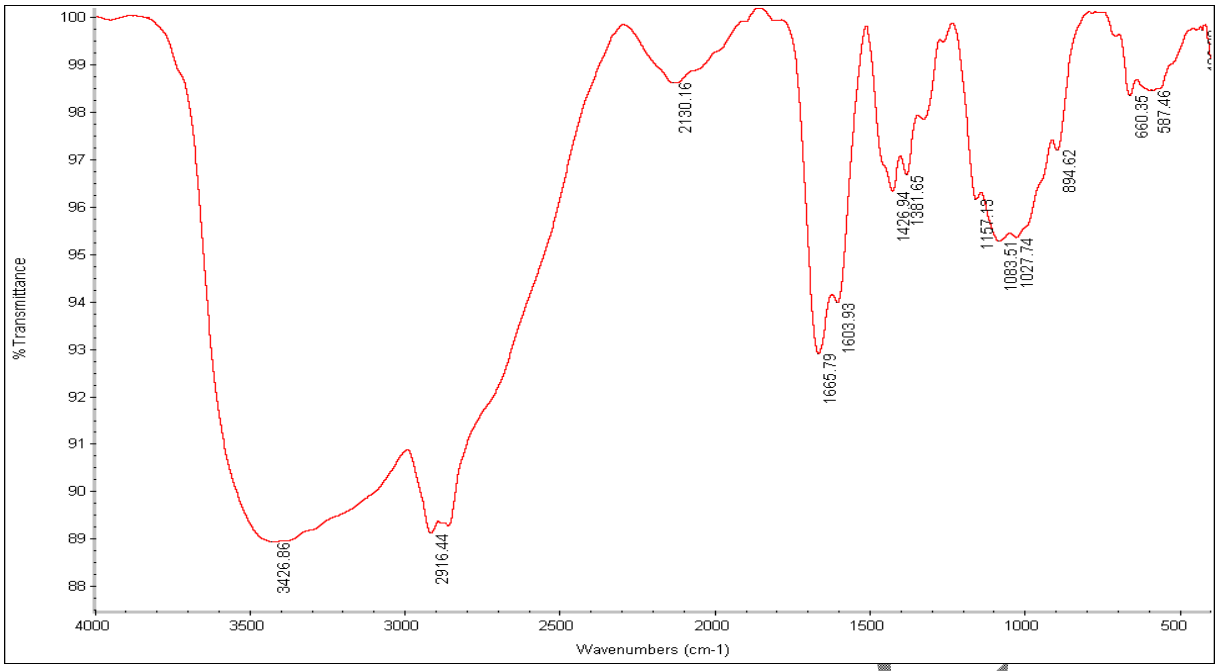
2-4 نتایج FTIR ترکیبات نانواسانس ها

طیف سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریر (*Fourier transform infrared* (*FTIR*) ابزاری قدرتمند برای مطالعات بیولوژیک است. از جمله مزیت های طیف سنجی مادون قرمز امکان استفاده از آن برای انواع نمونه ها در حالت های مختلف فیزیکی است. تاکنون ویژگی های سیستم های سازنده بیولوژیک از جمله پروتئین ها، لیپیدها، غشاءهای بیولوژیک، کربوهیدرات ها، داروها و. . . بوسیله طیف سنجی مادون قرمز مورد مطالعه و شناسایی قرار گرفته است[67].

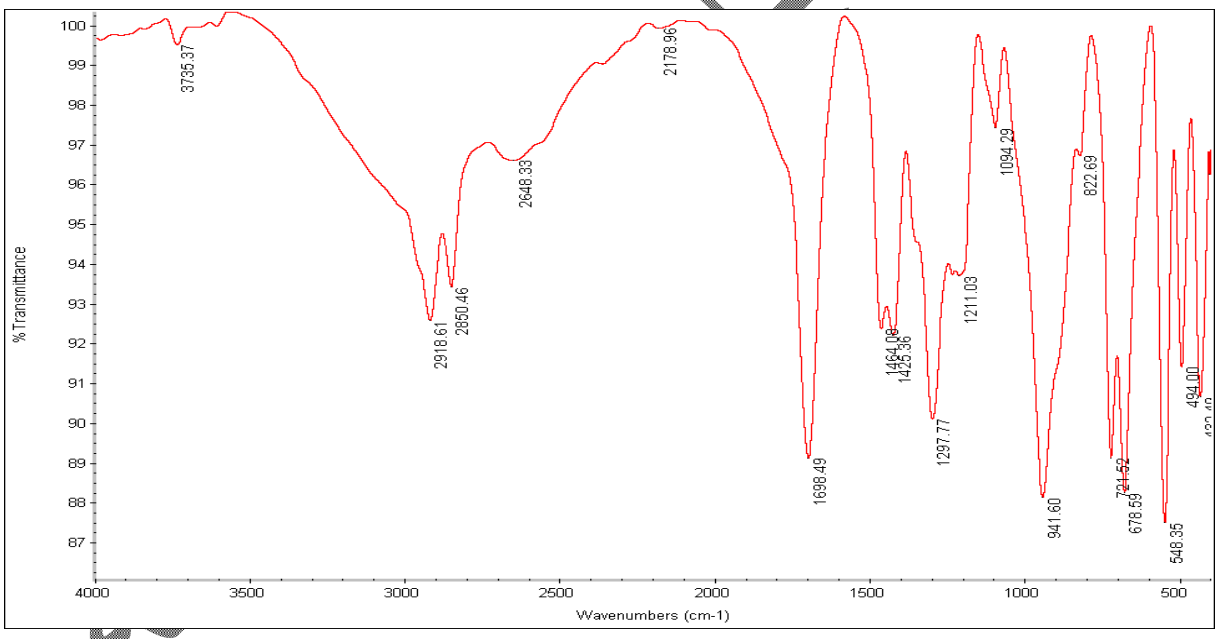
همچنین استفاده از طیف سنجی مادون قرمز برای شناسایی اثرات درمانی و یا سمیت داروها در سلول ها را معرفی نموده است. پیک های نشانگر مورد بحث از انجام یکسری معادلات ریاضی بر روی طیف FTIR به منظور کسب منحنی دوز – پاسخ حاصل شده و با روشی سریع و ساده اطلاعات فارماکولوژیک و توکسیکولوژی کمی را فراهم آورده است[67].

شکل 4-1 الی 4-3 نتایج طیف سنجی مادون قرمز اجزای اصلی سازنده نانو ژل را نشان می دهد. این اشکال گویای افزایش طیف اثر فارماکولوژیکی و توکسیکولوژیکی هر یک از اجزا با فرموله کردن و در کنار هم قرار دادن این ترکیبات می باشد.

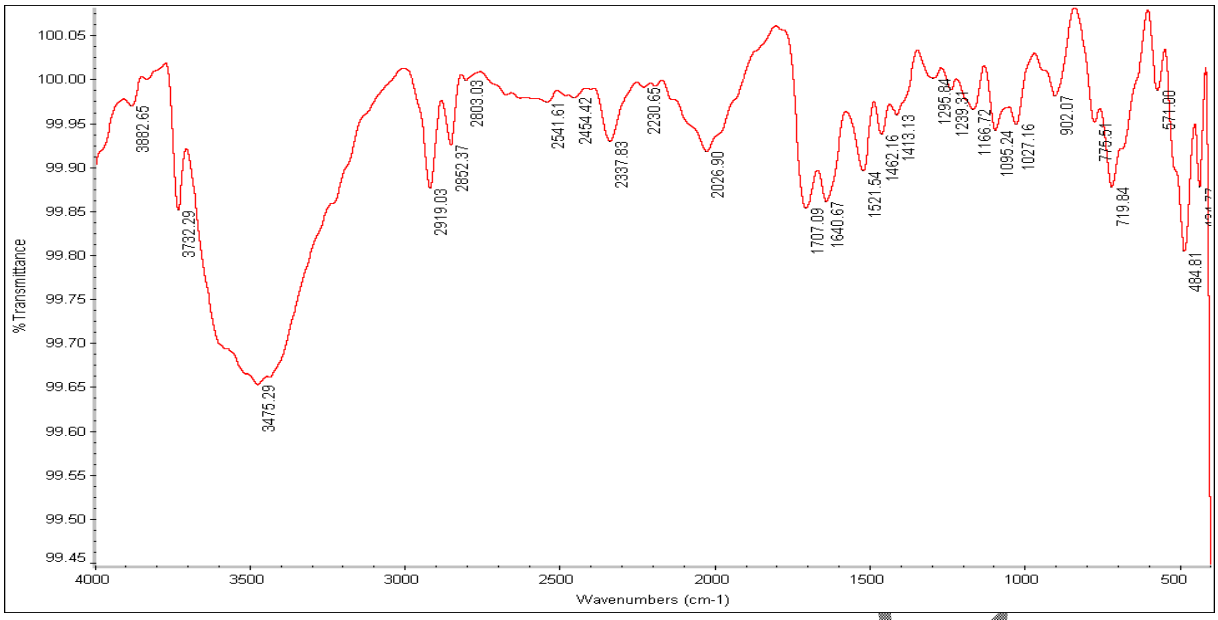
[1] Invitro



شکل 4-1 نتایج طیف سنجی مادون قرمز حاصل از ترکیب بیوپلی ساکاریدی کیتوزان



شکل 4-2 نتایج طیف سنجی مادون قرمز حاصل از ترکیب اسید میرستیک



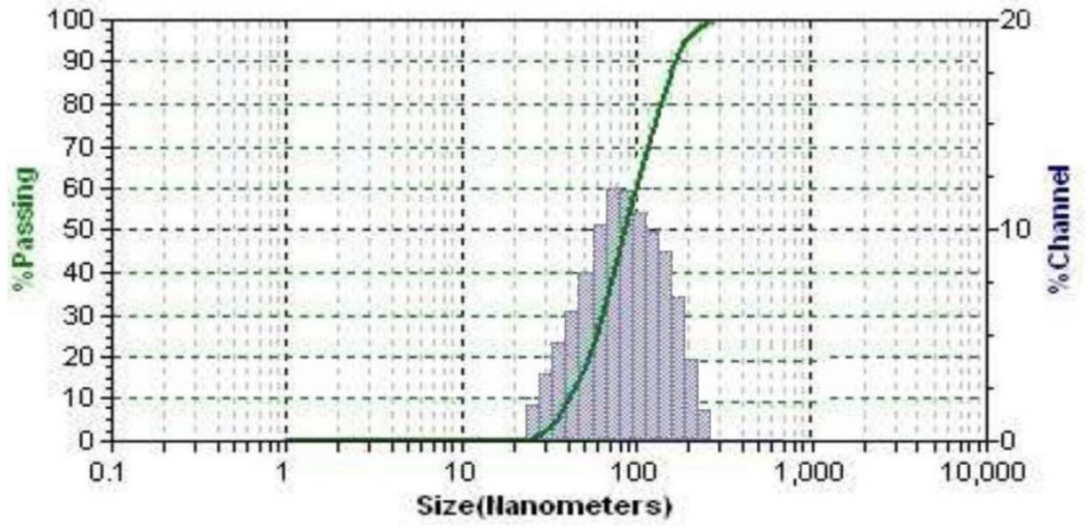
شکل 4-3 نتایج حاصل از طیف سنجی مادون قرمز دو ترکیب کیتوزان و اسید میرستیک در کنار هم

3-4 نتایج حاصل از پراکندگی نور دینامیکی برای مطالعه اندازه نانوذرات

پراکندگی نور دینامیکی روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول ها و سوسپانسیون استفاده می شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده ی چند نانومتر تا میکرون به کار می رود. در فناوری های اخیر، ذراتی با قطر کمتر از نانومتر نیز با این روش قابل اندازه گیری هستند. این روش به برهمکنش نور با ذره بستگی دارد. نور پراکنده شده بوسیله نانوذرات موجود در سوسپانسیون با زمان تغییر می کند که می تواند به قطر ذره ارتباط داده شود. نانوتکنولوژی و کاربردهای آن در زمینه های مختلف، چالش هایی را در درک و تشخیص رفتار مواد در مقیاس نانو ایجاد می کند. دانستن اندازه و توزیع اندازه ذرات، از اطلاعات پیش نیاز برای تولید و ساخت محصولات مختلف است. از آنجایی که اندازه و توزیع اندازه ذرات، تاثیر زیادی بر روی استحکام مکانیکی، دانسیته و خواص نوری و حرارتی محصول نهایی دارد، تعیین این اندازه ها بسیار ضروری اند. امروزه ابزارهایی وجود دارند که امکان تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات با استفاده از آنها امکان پذیر است. در میان این ابزارها، دستگاه هایی هستند که می توانند آنالیز پودرها را به صورت پخش شده در یک سوسپانسیون انجام دهند [72].

نکته حائز اهمیت این است که بدانیم دستگاههای متفاوت، بر مبنای مدل های فیزیکی متفاوتی پایه گذاری شده اند، و بنابراین تفاوت هایی در ساختار اندازه گیری ابزار مختلف

وجود دارد. روش تفرق دینامیک نور(DLS= Dynamic light scattering) ، که طیف سنجی ارتباط فوتونی (PCS=Photon correlation spectroscopy) نیز نامیده می شود، برای اندازه گیری اندازه ذرات در حیط مایع مورد استفاده قرار می گیرد، شکل 4-4 توزیع اندازه نانوذرات اسانس نانوکپسول شده را نشان می دهد[72].

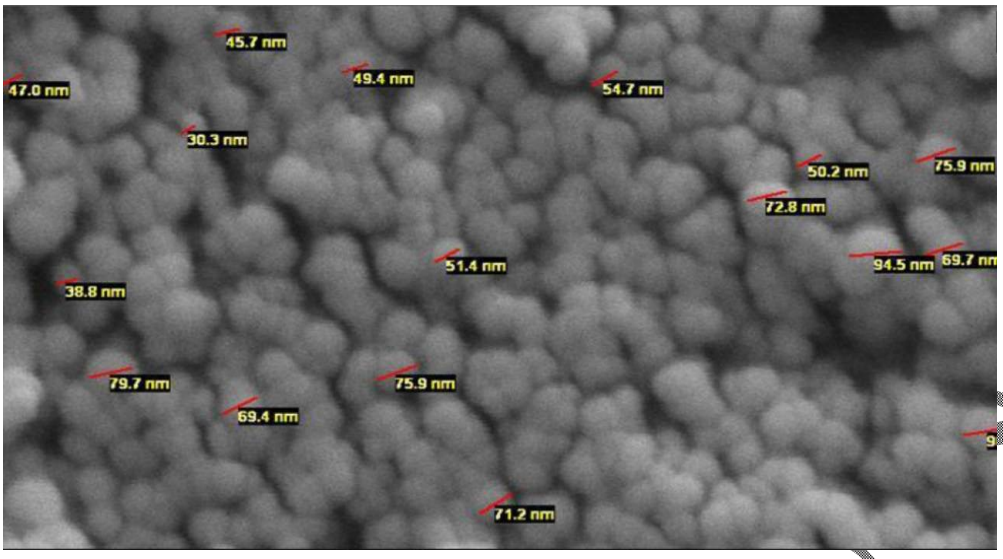


شکل 4-4 توزیع اندازه نانوذرات ترکیبات اسانس نانوکپسول شده با استفاده از دستگاه DLS

4-4 نتایج microscope Scanning electron مربوط به اسانس های نانوکپسول شده

در این تصویر اسانس نانو کپسول شده به طور میانگین در مقیاس های 30 الی 150 نانومتر به شکل ذرات کروی مجتمع مشهود است. اسانس ها درون کپسول های کروی با مقیاس نانو به دام افتاده و به مرور زمان در محیط آزاد می گردد(شکل 4-5).

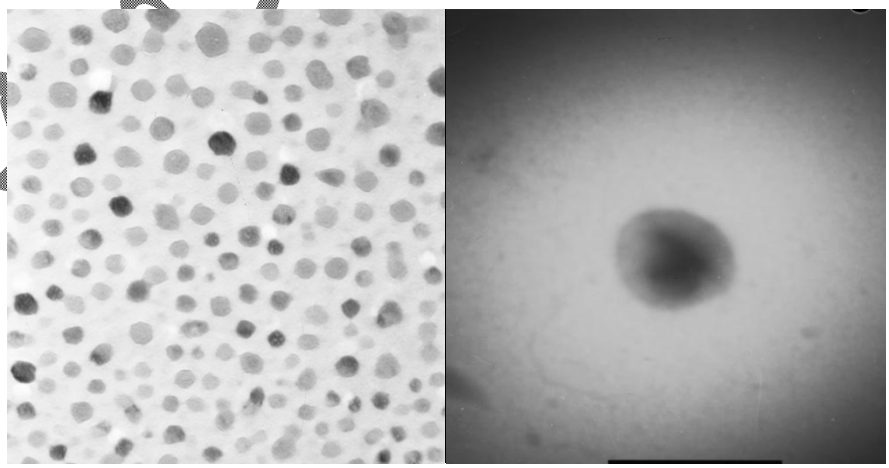
برزوهه



شکل 4-5 تصویر ساختار نانوکپسول های کیتوزان حاوی اسانس توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Tescan, Vegall)

4-5 نتایج Transmission electron microscope مربوط به اسانس های نانو کپسول شده

به منظور مشاهده سطح و شکل شناسی دیواره نانوکپسول ها از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری با ولتاژ 120 کیلو وات استفاده شد. و به منظور آماده سازی نمونه، مقدار 5 میلی لیتر از فرمولاسیون تهیه شده با 2 برابر حجم آن با آب مقطر رقیق شد و در دستگاه اولتراسونیک به مدت 15 دقیقه با توان 40 وات گذاشته شد. اسانس های نام برده به عنوان هسته درون دیواره ای از کیتوزان و میرستیک اسید به دام می افتد و همین امر سبب رهایش کنترل شده ترکیبات موثره اسانس و طولانی تر شدن اثرات آن می گردد (شکل 4-6) [51].

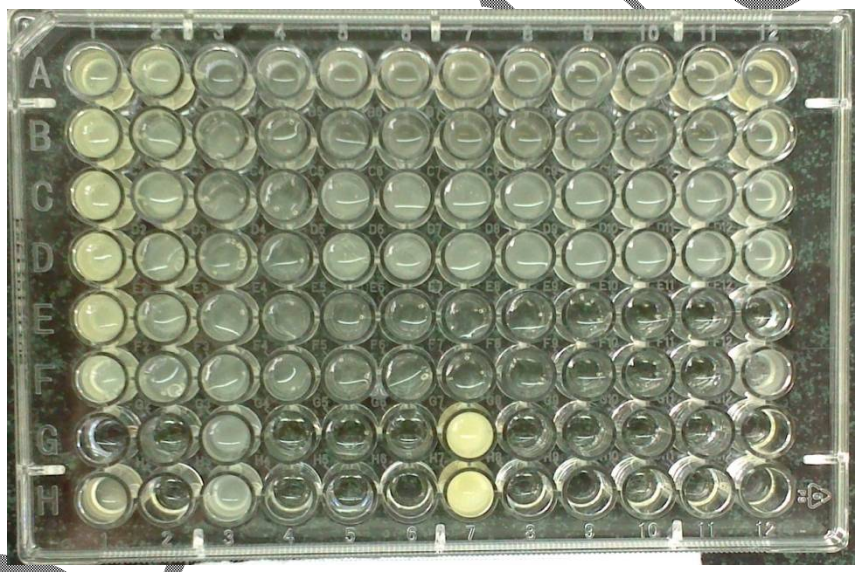


شکل 4-6 تصویر ساختار نانوکپسول کیتوزان حاوی اسانس توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM , Philips, EM 208)

6-4 نتایج آزمون تعیین حساسیت

1-6-4 نتایج MIC و MBC

MIC سوش باکتری ها به روش میکرودایلوشن تعیین شد. برای سنجش اثرات ضد میکروبی نانواسانس و همچنین اسانس های درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین از محیط کشت BHI براث استفاده شد. به این صورت که پس از رقت سازی نانواسانس ها و اسانس ها در چاهک های میکروپلیت 96 خانه ته صاف استریل و اضافه کردن سوسپانسیون میکروبی به مقدار تعیین شده به هر چاهک در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت انکوبه شدند. برای هر یک از میکروارگانیسم ها یک گوده شاهد مثبت (GC) و منفی (SC) در نظر گرفته شد. سپس برای تعیین MBC از گوده های مورد نظر کشت صورت گرفت. میکروپلیت های موجود در تصاویر 4-7 و 4-8 چگونگی تأثیر نانواسانس و اسانس های درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین بر روی سوش های باکتری های مورد نظر نشان می دهد.



شکل 4-7 میکروپلیت بعد از انجام آزمایش MICگوده اول تا دوازدهم نمونه مورد آزمایش، گوده های H_1 و H_3 و H_5 کنترل مثبت سوش های استافیلوکوک اورئوس، پسودوموناس آئروژینوزا، استرپتوکوک پیوژن و گوده H_7 کنترل منفی حاوی محیط کشت و نانواسانس اسطوخودوس

شکل 4-8 میکروپلیت بعد از انجام آزمایش MICگوده اول تا دوازدهم نمونه مورد آزمایش، گوده هایH_1 و H_3 و H_5 کنترل مثبت سوش های استافیلوکوک اورئوس، پسودوموناس آئروژینوزا، استرپتوکوک پیوژن و گوده H_7 کنترل منفی حاوی محیط کشت و نانواسانس درمنه

جدول 4-1 و 4-2 نتایج آزمایش MIC و MBC نانواسانس و اسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد، دارچین را نشان می دهد.

جدول 4-1 نتایج آزمایش MIC و MBC نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین برحسب میکروگرم بر میلی لیتر $\mu g/ml$

نانواسانس ها	نوع میکروارگانیسم / نوع آزمون	استرپتوکوکوس پنومونیه	استرپتوکوکوس پیوژنز	استافیلوکوکوس اورئوس	پسودوموناس آئروژینوزا
اسطوخودوس	MIC	0/097	0/097	6/25	3/125
	MBC	0/195	0/195	6/25	6/25
درمنه	MIC	0/195	0/097	1/562	3/125
	MBC	0/195	0/195	3/125	3/125
مورد	MIC	3/125	6/25	6/25	25
	MBC	3/125	6/25	12/5	50
دارچین	MIC	0/195	6/25	6/25	6/25
	MBC	0/390	12/5	12/5	12/5

جدول 4-2 نتایج آزمایش MIC و MBC اسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد، دارچین بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر µg/ml

اسانس ها	نوع میکروارگانیسم / نوع آزمون	استرپتوکوکوس پنومونیه	استرپتوکوکوس پیوژنز	استافیلوکوکوس اورئوس	پسودوموناس آئروژینوزا
اسطوخودوس	MIC	0/048	0/097	1/562	0/097
	MBC	0/097	0/195	1/562	0/195
درمنه	MIC	0/097	0/048	6/25	0/39
	MBC	0/195	0/097	6/25	0/39
مورد	MIC	1/562	3/125	3/125	12/5
	MBC	1/562	6/25	6/25	25
دارچین	MIC	0/195	0/39	0/048	0/048
	MBC	0/390	0/781	0/097	0/097

4-6-1-1 نتایج MIC نانواسانس ها

نتایج آزمایش‌های MIC نانواسانس ها نشان از تأثیر بالای نانواسانس درمنه، اسطوخودودوس، مورد و دارچین بر روی *استرپتوکوک پنومونیه* و *پیوژن* در مقایسه با *استافیلوکوک اورئوس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* است. البته این نانواسانس ها اثر خوبی بر سایر باکتری های مورد آزمایش نیز نشان دادند. لازم به ذکر است که تمامی آزمایشات MIC و MBC به صورت دوبار تکرار انجام شد که تأثیرات این نانواسانس ها در هر دوبار آزمون نتایج مشابهی داشت.

4-6-1-2 نتایج MIC اسانس ها

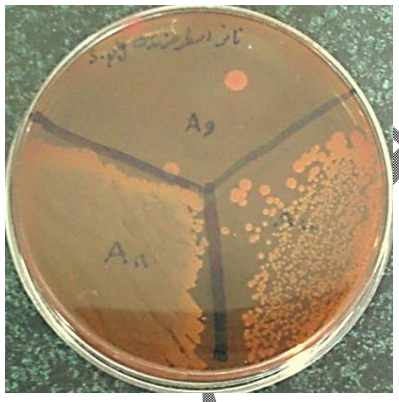
نتایج آزمایش های MIC اسانس ها نشان دهنده تأثیر بالای اسانس دارچین، اسطوخودوس و درمنه بر روی تمامی باکتری های مورد آزمایش است. همچنین اسانس مورد نیز تأثیر خوبی بر روی باکتری های مورد آزمایش داشت. نکته قابل ذکر در این پژوهش، محلول بودن اسانس ها در چربی بوده و نیاز به حلالی مانند دی متیل سولفوکساید (DMSO) داشت. همچنین تمامی آزمایشات به صورت دوبار تکرار انجام شد، و مشخص شد که تأثیرات این اسانس ها در هر دوبار آزمون نتایج مشابهی دارد.

منابع پایان نامه و مقاله

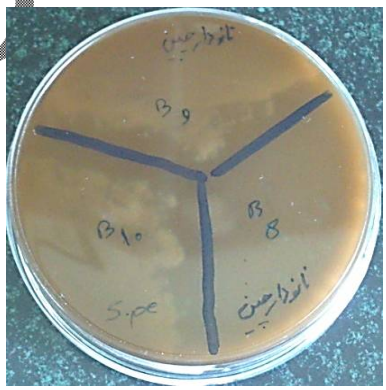
در مطالعه حاضر بر طبق داده های بدست آمده می توان نتیجه گرفت که در کل تأثیر اسانس های طبیعی از نانواسانس ها بیشتر می باشد.

3-1-6-4 نتایجMBC اسانس ها و نانواسانس ها

برای تعیین MBC، بعد از تعیین MIC(آخرین چاهک شفاف)، رقت های قبل و بعد از آن به روی محیط های مولر هینتون آگار و بلاد آگار منتقل و کشت داده شد. بعد از زمان انکوباسیون اولین رقتی که در پلیت آگار رشدی نداشته باشند به عنوان MBCگزارش می شوند که در هر دو بار تکرار نتایج مشابه مشاهده شد. تصاویر 4-9 الی 4-12 پلیت های کشت داده شده برای تعیین MBC را نشان می دهد.

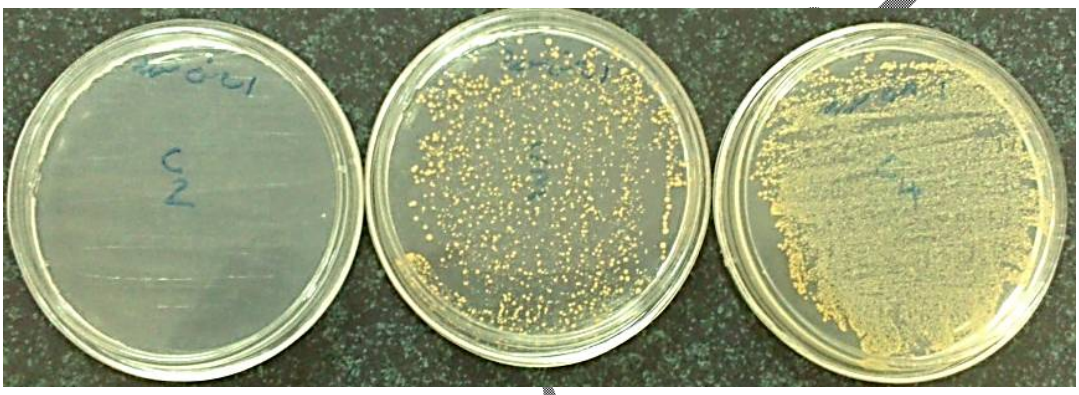


شکل 4-9 پلیت کشت داده شده مربوط به تأثیر نانواسانس اسطوخودوس بر روی *استرپتوکوک پیوژن* بعد از آزمایش MIC بر روی محیط کشت بلاد آگار برای تعیین MBC، رقت شماره 10 رقت MIC (رشد مثبت)، رقت شماره 9(رشد منفی) برابر با MBC است.



شکل 4-10 پلیت کشت داده شده مربوط به تأثیر نانواسانس دارچین بر روی *استرپتوکوک پنومونیه* بعد از آزمایش MIC بر روی محیط کشت بلاد آگار برای تعیین MBC، رقت شماره 9 (رشد مثبت) برابر با رقت MIC، رقت شماره 8(رشد منفی) برابر با رقتMBC است.

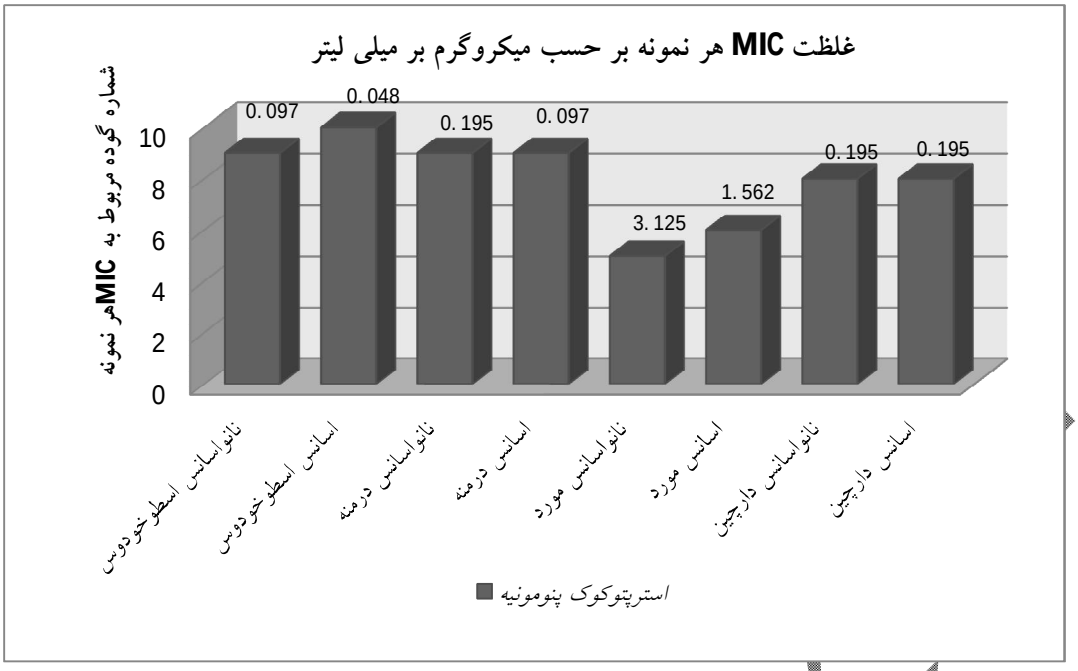
شکل 4-11 پلیت های کشت شده مربوط به تأثیر اسانس اسطوخودوس بر روی استافیلوکوک اورئوس بر روی محیط آگار برای تعیین MBC، پلیت رقت شماره6 رقتMIC(رشد منفی)، پلیت رقت 6 (رشد منفی)اولین پلیت بدون رشد برابر با .MBC(MIC وMBC با هم برابرند).



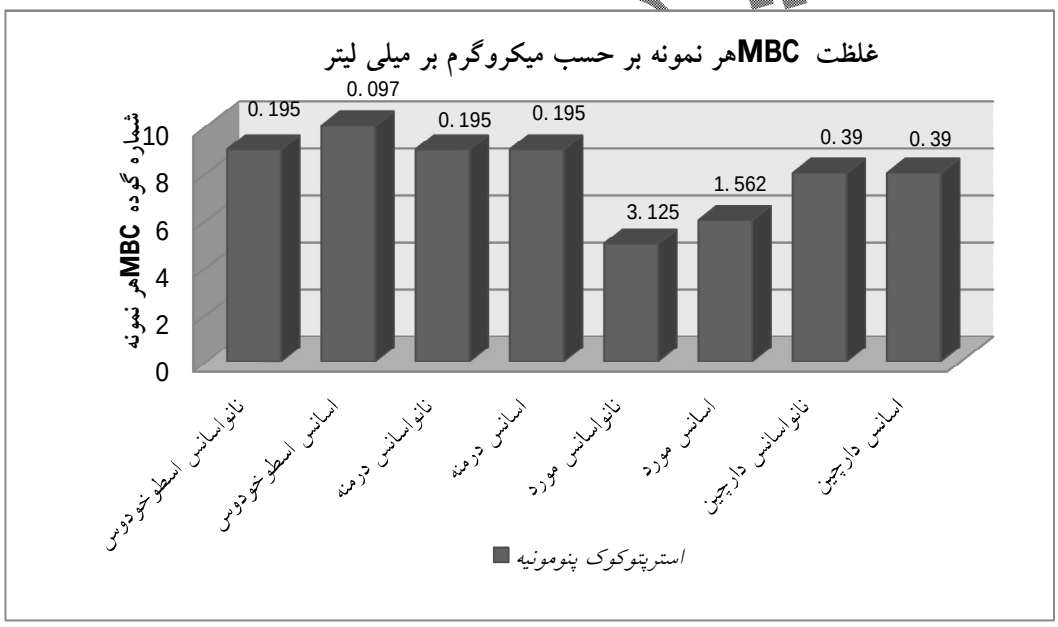
شکل 4-12 پلیت های کشت داده شده مربوط به تأثیر اسانس مورد بر روی *پسودوموناس آئروژینوزا* بر روی محیط آگار برای تعیین MBC، رقت شماره 3 رقت MIC (رشد مثبت)، پلیت رقت 2 (رشد منفی) برابر با MBC است.

نمودارهای 4-1 تا 4-8 MIC و MBC اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین را در برابر باکتری های *استرپتوکوک پنومونیه*، *استرپتوکوک پیوژن*، *استافیلوکوک اورئوس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* نشان می دهد. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی هر نمونه در بالای ستون های مربوطه آورده شده است.

نمودار 4-1 و 4-2 چگونگی اثر اسانس ها و نانواسانس ها را در برابر استرپتوکوک پنومونیه نشان می دهد. از میان نمونه ها، اسانس و نانواسانس اسطوخودوس به ترتیب با غلظت MIC 0/048 و 0/097 میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین اثر و اسانس و نانواسانس مورد با غلظت MIC 1/562 و 3/125 میکروگرم بر میلی لیتر کمترین را بر روی پنومونیه نشان می دهد.

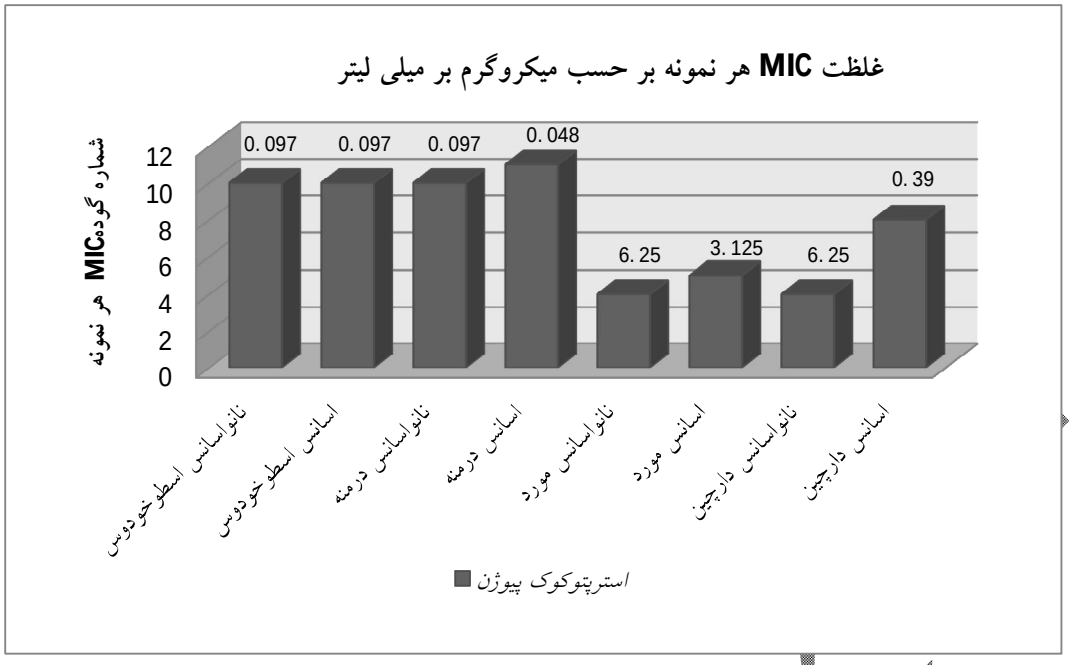


نمودار 4-1 نمودار حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر استرپتوکوک پنومونیه

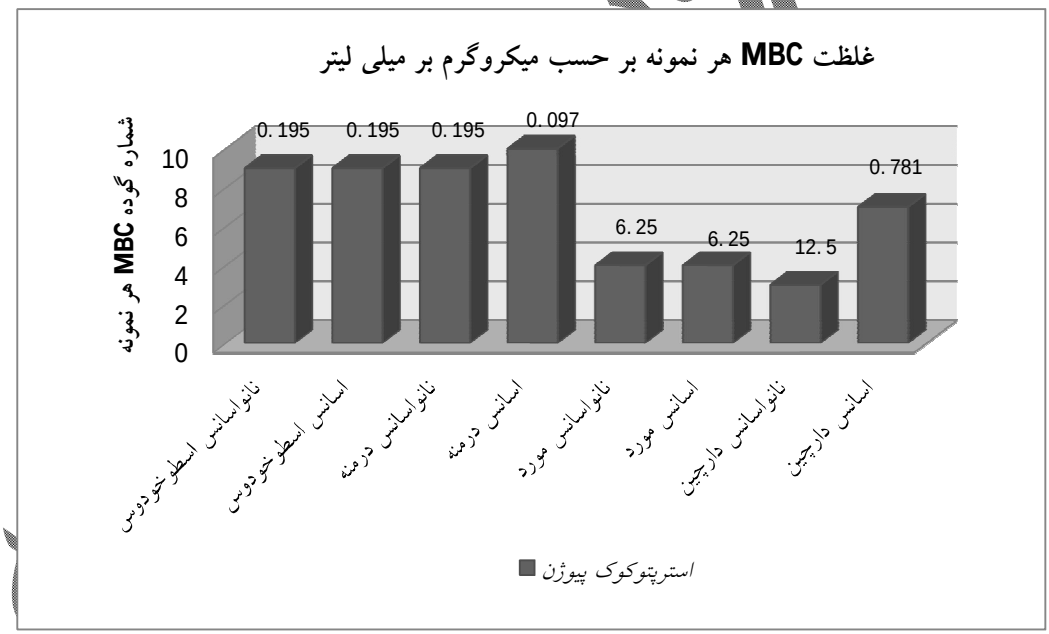


نمودار 4-2 نمودار حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر استرپتوکوک پنومونیه

نمودار 4-3 و 4-4 چگونگی اثر اسانس ها و نانواسانس ها را در برابر *استرپتوکوک پیوژن* نشان می دهد. از میان نمونه ها، اسانس و نانواسانس درمنه و همچنین اسطوخودوس بیشترین اثر و اسانس و نانواسانس مورد با غلظت MIC 3/125 و 6/25 میکروگرم بر میلی لیتر کمترین را بر روی پیوژن نشان می دهد.



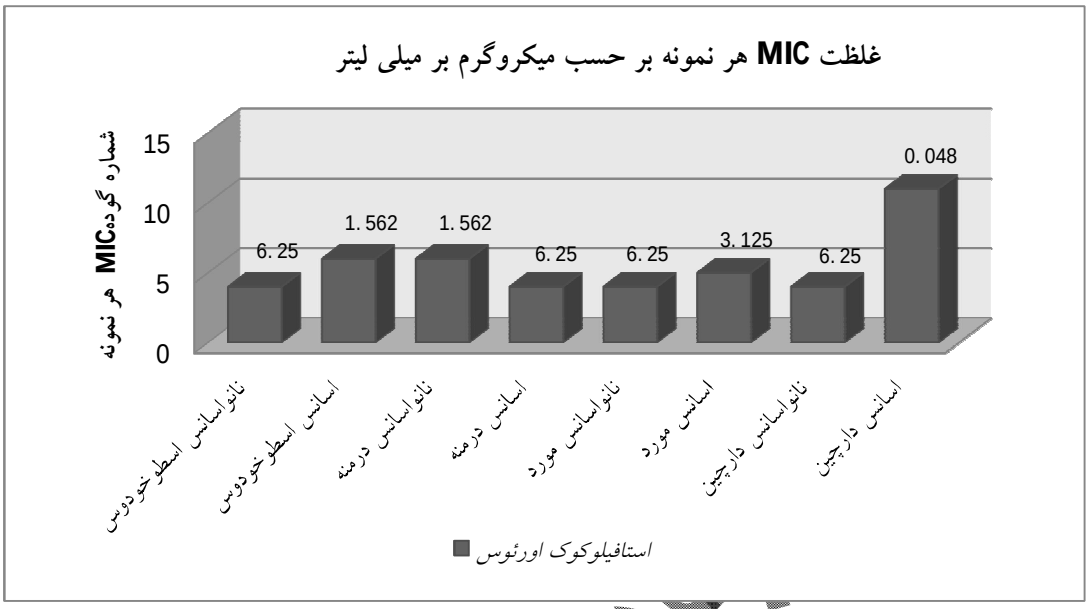
نمودار 4-3 نمودارحداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر استرپتوکوک پیوژن



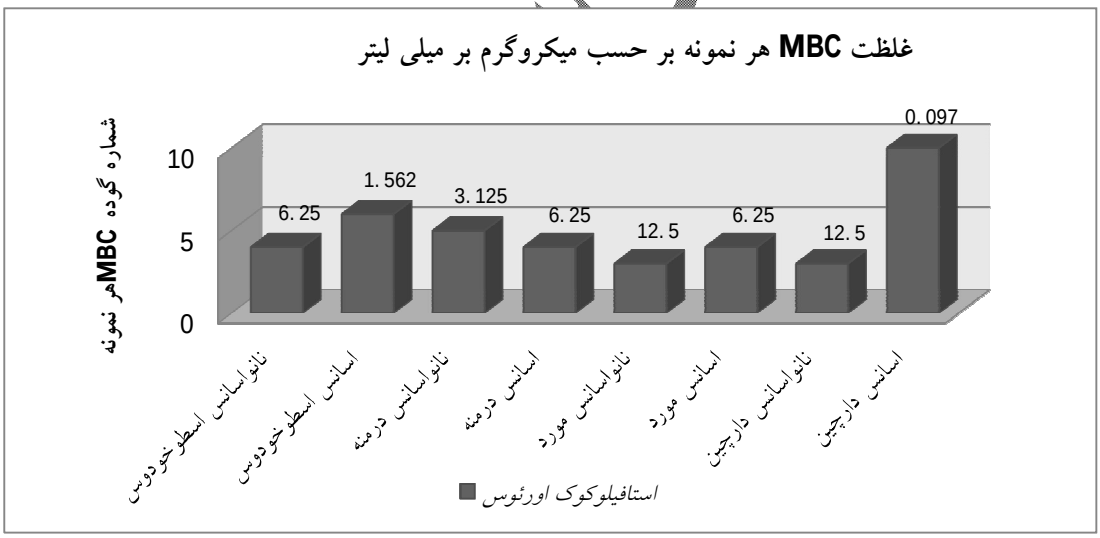
نمودار 4-4 نمودارحداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر استرپتوکوک پیوژن

نمودار 4-5 و 4-6 چگونگی اثر اسانس ها و نانواسانس ها را در برابر *استافیلوکوک اورئوس* نشان می دهد. از میان نمونه ها، اسانس دارچین با غلظت MIC 0/048 میکروگرم بر میلی لیتر و نانواسانس درمنه با غلظت

MIC 1/562 میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین اثر و سایر نمونه ها اثر برابری را بر روی *استافیلوکوک اورئوس* نشان می دهد.



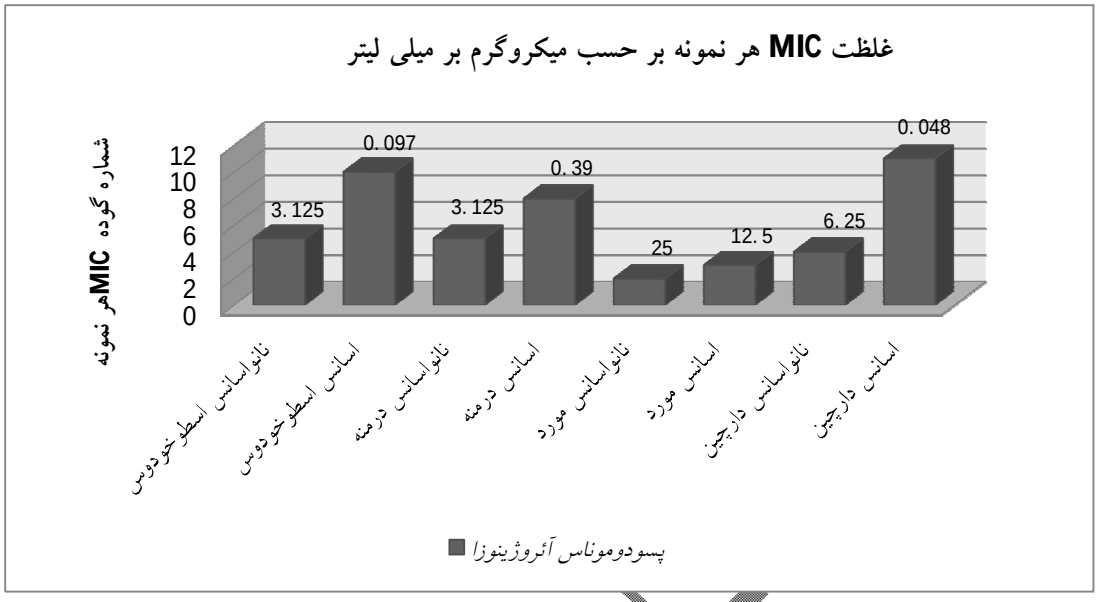
نمودار 4-5 نمودارحداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر *استافیلوکوک اورئوس*



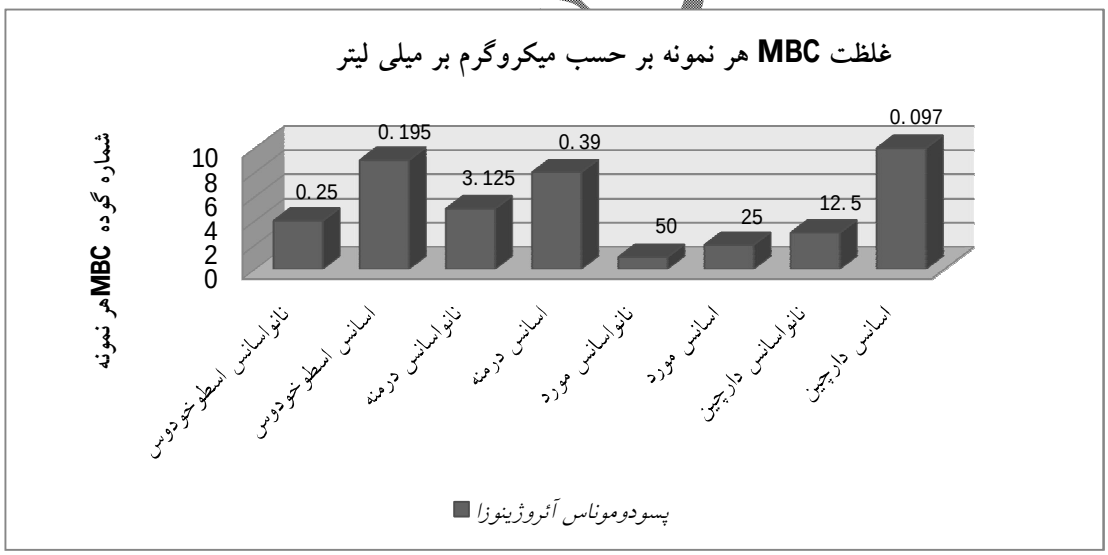
نمودار 4-6 نمودارحداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر *استافیلوکوک اورئوس*

نمودار 4-7 و4-8 چگونگی اثر اسانس ها و نانواسانس ها را در برابر *پسودوموناس آئروژینوزا* نشان می دهد. از میان نمونه ها، اسانس دارچین با غلظت MIC 0/048 میکروگرم بر میلی لیتر و نانواسانس درمنه و اسطوخودوس با غلظت MIC 3/125 میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین اثر و اسانس و نانو اسانس درمنه به

ترتیب با غلظت MIC 12/5 و 25 میکروگرم بر میلی لیتر کمترین اثر را بر روی *پسودوموناس آئروژینوزا* نشان می دهد.



نمودار 4-7 نمودارحداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر *پسودوموناس آئروژینوزا*



نمودار 4-8 نمودارحداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس ها و نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین در برابر *پسودوموناس آئروژینوزا*

همچنین در این مطالعه نتایج میکروپلیت های MIC هم به صورت چشمی و هم با دستگاه قرائت الایزا انجام شد و با مقایسه این دو روش، اختلاف قابل ملاحظه ای در نتایج مشاهده نشد. همچنین نتایج قرائت میکروپلیت ها در زمان های 48 ساعت و 72 ساعت بعد از انکوباسیون ثبت شد. نتایج ثبت شده نشان از

مشابه بودن اطلاعات به دست آمده در زمان های ذکر شده دارد. هیچ اختلاف معنی داری بین زمان های 48 ساعت و 72 ساعت وجود نداشت.

با مقایسه بین مدت زمان انکوباسیون 48 ساعت و 72 ساعت میکروپلیت ها در انکوباتور و مشاهده عدم اختلاف بین این دو زمان مؤید این موضوع می تواند باشد که مواد مؤثره نانواسانس های مورد مطالعه در همان ساعت های ابتدایی در محیط آزاد و تأثیر خود را بر جا گذاشته و افزایش مدت زمان انکوباسیون تأثیری بر روند ضد میکروبی بیشتر نانواسانس ها ندارد.

2-6-4 نتایج اثرات ضد میکروبی نانواسانس ها به روش انتشار دیسک و مقایسه با چند آنتی بیوتیک رایج

این آزمایش به منظور برسی خواص میکروبی نانواسانس و اسانس گیاه فوق انجام شد و با آنتی بیوتیک های رایج مقایسه گردید. اساس روش دیسک به این صورت است که ابتدا باکتری مورد نظر روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار و بلاد آگار به طور یکنواخت تلقیح و کشت داده می شود و سپس دیسک های کاغذی که حاوی 15 میکرولیتر از غلظت های مختلف نانواسانس می باشد که از قبل در 12 میکروتیوپ رقت سازی شده است روی محیط کشت باکتری در پلیت ها قرار داده می شود. بعد از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی گراد اگر نانواسانس مؤثر باشد دایره ممانعت تشکیل می شود که این دایره بیانگر از بین رفتن باکتری ها می باشد و در نتیجه باکتری به نانواسانس مذکور موجود در دیسک حساس است. در تمامی مراحل این پروژه قطر هاله های ایجاد شده توسط دیسک شاهد منفی که شامل 15 میکرولیتر آب مقطر است صفر می باشد. آنتی بیوتیک ها به صورت دیسک آنتی بیوتیک بر روی محیط کشت به عنوان شاهد مثبت قرار داده می شوند و تشکیل یا عدم تشکیل هاله برسی می شود. در این آزمایش برای نتیجه گیری بهتر از دو بار تکرار استفاده شده است. با مشاهده پلیت های این نتیجه حاصل شده است که نانواسانس های درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین روی هیچ کدام از باکتری ها ی مورد آزمایش در این آزمون اثر نداشته و هیچگونه هاله ای به وجود نیاورده است و تنها دیسک های مربوط به آنتی بیوتیک های خالص خاص هر باکتری تولید هاله کرده است.

تصاویر 4-13 و 4-14چگونگی تأثیر نانواسانس ها بر روی باکتری های مورد آزمایش نشان می دهد.

شکل 4-13 پلیت های تلقیح شده با باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* حاوی دیسک های کاغذی آغشته به غلظت های مختلف نانواسانس اسطوخودوس. هیچگونه هاله ای به وجود نیاورده است.

شکل 4-14 پلیت های تلقیح شده با باکتری *استافیلوکوک اورئوس* حاوی دیسک های کاغذی آغشته با غلظت های مختلف نانواسانس دارچین. هیچگونه هاله ای به وجود نیاورده است.

جدول 4-3 قطر هاله عدم رشد سویه های میکروبی مورد آزمایش را در برابر تعدادی از دیسک های آنتی بیوتیکی نشان می دهد.

تصاویر 4-15 تا 4-17 چگونگی تأثیر دیسک های آنتی بیوتیکی را بر روی باکتری های مورد آزمایش نشان می دهد.

جدول 4-3 قطر هاله عدم رشد سویه های میکروبی مورد آزمایش در برابر تعدادی از دیسک های آنتی بیوتیکی متداول در آزمایش دیسک دیفیوژن

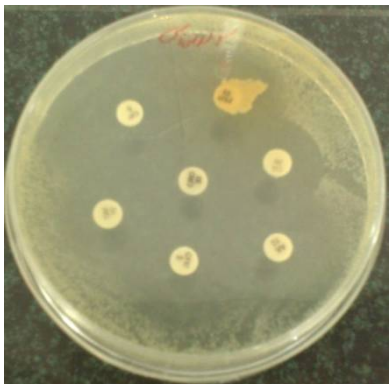
نام باکتری	قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی لیتر) در آنتی بیوتیک های مورد آزمایش												
	CN	GM	CFM	AM	P	D	AMX	MET	V	FEP	AK	CIP	CRO
استرپتوکوک پنومونیه	38	10	39	41	44	34	_*	_	_	_	_	_	_
استرپتوکوک پیوژن	30	14	38	39	40	44	_	_	_	_	_	_	_
استافیلوکوک اورئوس	38	_	_	38	32	40	29	28	27	_	_	_	_
سودوموناس آئروژینوزا	19	16	30	_	_	_	_	_	_	12	24	38	22

P: Penicillin G(10µg), CRO: Cefteriaxone(30µg), GM: Gentamicin(10µg), AK: Amikacin(10µg), CN: Cephalexin(30µg), VA: Vancomycin(30µg), CIP: Ciprofloxacin(5µg) , CFM: Cefixime(5µg), FEP: Cefepime(30µg), D: Doxycyclin(30µg), AM: Ampicillin(10µg), MET: Methicillin(10µg), AMX: Amoxycillin(25µg)

*علامت تیره به معنای تست نشده است.

پژوهه

شکل 4-15 پلیت تلقیح شده با باکتری *استافیلوکوک اورئوس* حاوی دیسک های آنتی بیوتیکی CN ،V 30μg ،30μg ،D 30μg ،P 10μg ،AM 10μg ،MET 10μg و AMX 25μg. هاله عدم رشد خوبی اطراف دیسک ها دیده می شود.



شکل 4-16 پلیت تلقیح شده با پسودوموناس *آئروژینوزا* حاوی دیسک های آنتی بیوتیکی CRO 30μg، CIP 5μg، GM 10μg، CFM 5μg، AK 10$g\mu$، CN 30μg و FEP 30μg. هاله عدم رشد در اطراف دیسک ها قابل مشاهده است.

شکل 4-17 پلیت تلقیح شده با باکتری *استرپتوکوک پیوژن* حاوی دیسک های آنتی بیوتیکی GM 10μg، P 10μg، CFM 5μg، Am 10μg، D 30μg، CN 30μg. هاله عدم رشد در اطراف دیسک ها قابل مشاهده است.

4-6-3 نتایج آزمایش انتشار در آگار(چاهک)

- ✓ لازم به ذکر است که به دلیل این که نانواسانس های مذکور اثر ضد میکروبی خود را بر روی باکتری های مورد نظرمان در روش دیسک دیفیوژن نشان ندادند بر آن شدیم بار دیگر این آزمون را توسط روش چاهک گذاری انجام دهیم.

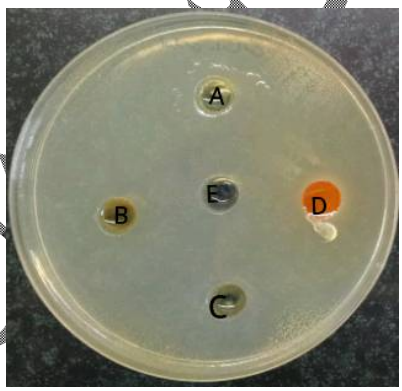
اساس روش چاهک به این صورت است که ابتدا باکتری مورد نظر روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار و بلاد آگار که از قبل چاهک هایی به قطر 6 سانتی متر درون آن ایجاد کرده بودیم به طور یکنواخت تلقیح و کشت داده شد و سپس درون چاهک ها به میزان 200 میکرولیتر از غلظت های مختلف هر نانواسانس ریخته شد. بعد از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی گراد اگر نانواسانس مؤثر باشد دایره ممانعت تشکیل می شود که این دایره بیانگر از بین رفتن باکتری ها می باشد و در نتیجه باکتری

به نانواسانس مذکور موجود در چاهک حساس است. در تمامی مراحل این پروژه قطر هاله های ایجاد شده توسط چاهک شاهد منفی که شامل 15 میکرولیتر آب مقطر است صفر می باشد.

از طرفی به عنوان شاهد این بار از اسانس طبیعی(بدون رقیق سازی) هر نانواسانس مذکور که در منابع مختلف اثر ضد میکروبی آن ها گزارش شده استفاده شد و تشکیل یا عدم تشکیل هاله گزارش شد.

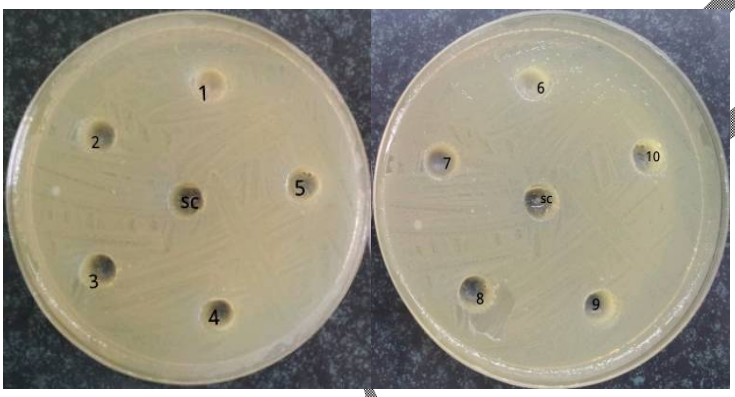
با مشاهده پلیت ها این نتایج حاصل شده که نانواسانس های درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین روی هیچکدام از باکتری ها اثر نداشته و هیچکدام هاله ای به وجود نیاورده و تنها چاهک های مربوط به اسانس های خاص هر نانواسانس تولید هاله کرده بودند.

تصاویر4-18و4-19 چگونگی تأثیر اسانس های درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین بر روی استافیلوکوک اورئوس و پسودوموناس آئروژینوزا را نشان می دهد که به عنوان شاهد مثبت در آزمون چاهک مورد بررسی قرار گرفت و تصاویر 4-20 و 4-21 نیز دو تصویر انتخابی از این آزمون هستند که چگونگی تأثیر غلظت های مختلف نانواسانس های مذکور را بر روی باکتری های مورد آزمایش نشان می دهد.

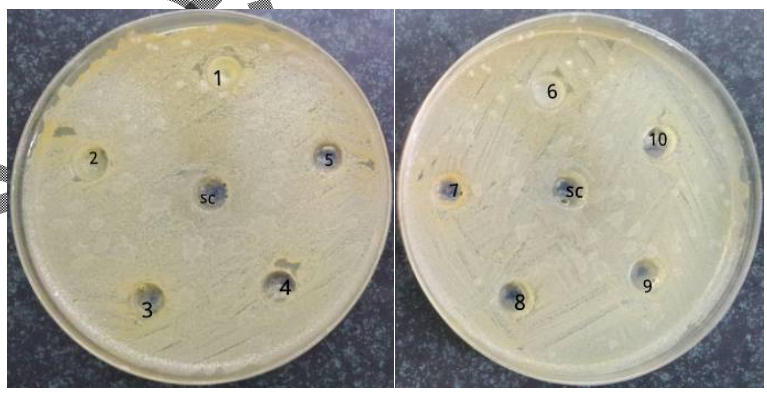


شکل 4-18 پلیت تلقیح شده با استافیلوکوک اورئوس. قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها به خوبی قابل مشاهده است. (A. اسانس اسطوخودوس، B. اسانس درمنه، C. اسانس مورد، D. اسانس دارچین، E. آب مقطر به عنوان شاهد منفی)

شکل 4-19 پلیت تلقیح شده با پسودوموناس آئروژینوزا. قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها به خوبی قابل مشاهده است. (A. اسانس اسطوخودوس، B. اسانس درمنه، C. اسانس مورد، D. اسانس دارچین، E. آب مقطر به عنوان شاهد منفی)



شکل 4-20 پلیت تلقیح شده با *پسودوموناس آئروژینوزا* با غلظت های مختلفی از نانواسانس درمنه درون چاهک های1 تا 10 است. (sc. شاهد منفی). هیچ قطر هاله عدم رشدی در اطراف چاهک ها دیده نمی شود.



شکل 4-21 پلیت تلقیح شده با *استافیلوکوک اورئوس* با غلظت های مختلفی از نانواسانس مورد درون چاهک های1 تا 10 است. (sc. شاهد منفی). هیچ قطر هاله عدم رشدی در اطراف چاهک ها دیده نمی شود.

نتایج تکنیک های دیسک دیفیوژن و چاهک مربوط به نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین نشان از بی اثر بودن این نانواسانس ها بر روی باکتری های *استرپتوکوک پنومونیه*، *استرپتوکوک*

پیوژن، استافیلوکوک اورئوس و پسودوموناس آئروژینوزا دارد و تنها دیسک های مربوط به آنتی بیوتیک های خالص خاص هر باکتری تولید هاله عدم رشد بر علیه این باکتری ها نموده است. ولی از آن جایی که آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) در پلیت های 96 خانه نشان دهنده تأثیر خوب نانواسانس بوده در رقت های مختلف بوده می توان این نتایج را به دقت بالای و مزیت های روش میکرودایلوشن براث در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن و چاهک نسبت داد. چنانچه معمولا در مراکز بیمارستانی و در بیماران خاص مبتلا به عفونت های بسیار مقاوم جهت تعیین دوز دقیق دارو درخواست تعیین MIC (حداقل غلظتی از دارو که باعث مهار رشد باکتری می شود) داده می شود و جهت بیماران سر پایی ضرورتی ندارد. از مزیت ها این روش می توان به محلول بودن تمامی اجزا از جمله محیط کشت، سوسپانسیون باکتری و نانواسانس اشاره کرد که این خود سبب ایجاد سطح تماس بیشتر و ضریب چسبندگی بالاتر نمونه نانواسانس با سوسپانسیون باکتری و تأثیر بیشتر نانواسانس می گردد. از طرفی این امکان نیز وجود دارد که دیسک های کاغذی مورد استفاده در روش دیسک دیفیوژن خود مانعی برای رهایش ترکیبات مؤثره اسانس ها از نانوژل به محیط جامد اطراف و اثر بر روی میکروارگانیسم ها باشد.

مرکز تحقیقات پارس پژوهه

فصل پنجم

بحث و پیشنهادات

منابع پارس پژوهه

1-5 بحث

باکتری ها به طور طبیعی در مجاری تنفسی فوقانی به سر می برند اما زمانی که سیستم ایمنی بدن ضعیف شود و یا تخلیه سینوس های اطراف بینی و صورت به دلیل عوامل مستعد کننده از جمله بیماری ها، محرک ها، عوامل آناتومیک، داروها و تروما و غیره به درستی انجام نگیرد، باکتری های محبوس شده داخل سینوس ها تکثیر می یابند و عفونت ایجاد می کنند و عدم درمان سبب عارضه دار شدن آن می گردد که برای سلامت هر فرد تهدید جدی محسوب می شود[65,25]. امروزه درمان آنتی بیوتیکی این عفونت ها با مشکلات عدیده ای روبروست که همین امر استفاده از آنتی بیوتیک های رایج را با محدودیت مواجه می کند. از این رو گرایش ها به سمت استفاده از منابع گیاهی معطوف شده که هم عوارض کمتری دارد و هم در مواردی اثر گذاری بیشتری. بررسی مطالعات صورت گرفته در ایران و سایر نقاط حکایت از تأثیر ضد میکروبی اسانس ها گیاهی دارد[10].

خاصیت فرار بودن، قابلیت حلالیت پایین در آب و اکسید شدن آن ها باعث می شود که قبل از کاربرد اسانس ها در کنترل برخی از بیماری های انسان و یا حیوان به فکر یافتن تکنیک جدیدی بود تا کارایی ضد میکروبی اسانس ها را افزایش داد. یکی از مهم ترین راه ها، فرمولاسیون و تغییراتی است که می تواند با بهره وری از علم نانو روی اسانس ها اعمال شود تا کیفیت و میزان تأثیر و فعالیت بیولوژیکی آن طولانی تر گردد[54].

تاکنون مطالعات بسیار محدودی در زمینه خواص نانواسانس های درمنه، اسطوخودوس، مورد و دارچین انجام شده است؛ بنابراین در این پژوهش اثر ضد میکروبی نانو اسانس های مذکور را در مقایسه با اسانس های طبیعی آن ها مورد مطالعه قرار داده و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) آن ها را با تکنیک میکرودایلوشن براث و دیسک دیفیوژن مورد ارزیابی قرار گرفت.

نگهبان و همکاران در سال 2013 در طی مطالعه ای کارایی اسانس نانو کپسول شده گیاه درمنه *Artemisia sieberi Besser* را بر شاخص های تغذیه شب پره پشت الماسی *Plutella xylostella* در مقایسه با اسانس های معمولی مورد بررسی قرار دادند و نتایج امر نشان داد که استفاده از فناوری نانو کپسول در آفت کش ها موجب افزایش کارایی، سازگاری بیشتر با محیط زیست، بهبود کیفیت و رهایش کنترل شده این مواد می گردد بنابراین نانو کپسول اسانس گیاه درمنه را به عنوان یک حشره کش در کنترل این حشره با قابلیت بالا معرفی کردند که نیاز به مطالعات تکمیلی در این زمینه داشت[51].

سفیدکن و همکارانش درسال 2013 در پژوهشی اثر ضد سرطانی نانو کپسول عصاره گیاه علف چشمه *Nasturtium officinalis* Br. R (L) مورد بررسی قرار دادند و نتایج حاکی از آن است که نانوکپسول عصاره گیاه چشمه نسبت به عصاره تام در غلظت ثابت و در مدت زمان مشابه تعداد بیشتری از سلول های سرطانی را از بین می برند[13].

با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر ما که مؤید تأثیر خوب نانواسانس ها بر روی میکروب های بیماری زا می باشد و بررسی گزارش نگهبان و همکاران در سال 2013 مبنی بر تأثیر خوب نانواسانس درمنه بر آفت های کشاورزی وبررسی گزارش سفیدکن و همکاران در سال 2013 مبنی بر اثر ضد سرطانی نانو کپسول عصاره علف چشمه می توان به استفاده از فناوری نانو با منشأ گیاهی در زمینه های پزشکی و کشاورزی امیدوار بود.

عنایتی در سال 2013 در پایان نامه دکترای خود MIC و MFC نانواسانس های درمنه، مرزه و زیره را بر روی گونه های آسپرژیلوس جدا شده از پودر ماهی کارخانجات استان مازندران به روش میکرودایلوشن براث بررسی کرد و به نتایج قابل ملاحظه ای رسیده است. طبق بررسی های آزمایشگاهی و داده های آماری در این پژوهش MIC و MFC نانواسانس درمنه بر روی 12 گونه آسپرژیلوس به طور میانگین و به ترتیب برابر با 10/416 و 20/833 میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است[16].

ایشان همچنین در پایان نامه خود به بیشتربودن اثر ضد قارچی اسانس های طبیعی در مقایسه با نانواسانس های مورد مطالعه خود اشاره کرد. در مطالعه حاضر ما نیز نتایج حاکی از تاثیر بیشتر اسانس های طبیعی در مقایسه با نانواسانس ها مورد آزمایش می باشد.

Inouye و همکارانش در سال 2001 فعالیت آنتی باکتریال تعدادی از اسانس های گیاهی از جمله دارچین و اسطوخودوس را در برابر تعدادی از پاتوژن های دستگاه تنفسی مورد بررسی قرار دادندکه نتایج نشان دهنده

تاثیر خوب این دو اسانس گیاهی بر علیه *استرپتوکوک پنومونیه* و *استرپتوکوک پیوژن* و سپس *استافیلوکوک اورئوس* دارد که گونه نتیجه گیری با مطالعه حاضر هم خوانی دارد. [41.] اما تفاوت موجود در داده ها ی مطالعه حاضر ما با این پژوهش را می توان به روش کار، سوش های منتخب و غلظت های اسانس نسبت داد.

یزدی و همکارانش در سال 2008 اثر ضد میکروبی سه نوع اسانس گیاهی را بر روی میکرو ارگانیسم های *استرپتوکوک پنومونیه*، *هموفیلوس آنفولانزا* و *موراکسلا کاتارهالیس* که از عوامل سینوزیت و برونشیت می باشد مورد بررسی قرار دادند و نتایج حاصل از تست کمی حداقل غلظت مهارکننده رشد که به روش رقت سازی در لوله انجام گرفت؛ نشان داد که MIC اسانس مورد در برابر *استرپتوکوک پنومونیه* 157/32 میکروگرم بر میلی لیتر و قطر هاله عدم رشد در همین غلظت 20 میلی لیتر بوده است. نتایج حاصله در پژوهش ایشان از تأثیر کمتر این اسانس نسبت به دو اسانس دیگر (آویشن و اکالیپتوس) خبر می دهد. چنان چه در پژوهش حاضر نیز اثر اسانس مورد نسبت به سایر اسانس ها کمتر است[58].

با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر در مقایسه با گزارش یزدی و همکاران در سال 2008 علت تفاوت نتایج بدست آمده در داده های این دو مطالعه را می توان به روش انجام آزمایش، سویه منتخب و غلظت های اسانس نسبت داد.

میرآزادی و همکارانش در سال 2011 در پژوهشی ترکیبات شیمیایی اسانس درختچه مورد را ارزیابی کردند. در این بررسی 21 ترکیب در اسانس این گیاه شناسایی گردید که بیشترین در صدهای مواد مؤثره اسانس به ترتیب مربوط به لیمونن (18/5 درصد)، آلفاپینن (13/32 درصد) و 1و8 سینئول (10/58) می باشد. این در صورتی است که درصد های مواد مؤثره اسانس مورد که در پژوهش حاضر اثر ضد میکروبی آن را مورد مطالعه قرار دادیم به ترتیب شامل آلفاپینن (13/ 36 درصد)، بتاپینن (0/47 درصد)، سابینن (0/05 درصد)، لیمونن (11/47 درصد) و 1و8 سینئول (19/55 درصد) می باشد[17]. تفاوت های کمی و کیفی در ترکیبات این اسانس در منطقه مورد مطالعه با منابع می تواند ناشی از تفاوت ویژگی های اکولوژیک مناطق مانند رطوبت، ارتفاع از سطح دریا و یا سایر عوامل خاکی و جغرافیایی باشد.

شهیدی و همکارانش در سال 2004 در مطالعه ای اثر ضد باکتریایی عصاره مورد را به روش انتشار دیسک در چاهک انجام دادند. نتایج حاصل از این بررسی که از غلظت نسبتا زیاد عصاره (20 میلی گرم در میلی لیتر) همراه با DMSO استفاده شده بود نشان می دهد که عصاره برگ های این گیاه با قطرهای مهاری رشد

11 و 16 میلی متر و حداقل غلظت مهاری رشد 7/50 و 1/87 میلی گرم در میلی لیتر به ترتیب بر روی گونه های *پسودوموناس آئروژینوزا* و *پسودوموناس فلورسانس* اثر مهاری داشته است[29].

محبوبی و همکارانش در سال 2009 در مطالعه ای فعالیت ضد میکروبی اسانس درمنه بر روی میکروارگانیسم های مختلف نظیر باکتری های گرم مثبت، گرم منفی و مخمر و قارچ با استفاده از تکنیک دیسک دیفیوژن و روش میکرو دایلوشن براث مورد ارزیابی قرار دادند و نتایج حاکی از آن است که اسانس درمنه با اجزای اصلی آلفاتوجون، بتاتوجون و کامفر در مقابل میکروارگانیسم های مختلف فعالیت ضد میکروبی بسته به تیپ پاتوژن نشان می دهد و باکتری های گرم مثبت و قارچ ها نسبت به انواع گرم منفی به اسانس درمنه حساس تر می باشند[46].

مقایسه نتایج محبوبی با نتایج این پژوهش موید این مطلب می باشد که MIC اسانس درمنه با ترکیبات مؤثره ای همچون آلفاتوجون و بتاتوجون بر روی انواع گرم مثبت همخوانی دارد.

Rotstein و همکارانش در سال 1974 در مطالعه ای اثرات ضد باکتریال عصاره گیاه مورد را به ویژه در باکتری های گرم مثبت مربوط به میرتوکومولون A دانسته و قطر هاله عدم رشد در خصوص *استافیلوکوک اورئوس* را 35 میلی متر نشان دادند[60].

در مطالعهKilani و همکارانش در سال 2005 در بررسی تأثیر عصاره 10 درصد گیاه مورد، قطر هاله عدم رشد بر روی *استافیلوکوک اورئوس* 35 میلی متر و بر روی *پسودوموناس آئروژینوزا* 18 میلی متر بوده است[44].

سعیدی و همکارانش فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره گیاه مورد را علیه 17سویه از *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک های انتخابی که از نواحی حلق و بینی جدا و خالص سازی شده بود مورد بررسی قرار دادند. و از میان آنتی بیوتیک های مورد استفاده دو آنتی بیوتیک پنی سیلین و سفکسیتین کمترین میزان بازدارندگی از رشد و آنتی بیوتیک وانکومایسین و آمیکاسین بیشترین میزان بازدارندگی از رشد بسیاری از سویه های استافیلوکوک اورئوس را داشت. در این تحقیق MIC 82/35 درصد از سویه ها اورئوس نسبت به اسانس گیاه مورد برابر با 5 میلی گرم در میلی لیتر و MBC 88/23 درصد از سویه ها برابر با 10 میلی گرم در میلی لیتر می باشد[61].

در بررسی و مقایسه سایر نتایج با نتیجه میزان MIC و MBC پژوهش اخیر ما، نتایج نشان دهنده این مطلب است، که بین کمترین رقت های جلوگیری از رشد و رقت های کشندگی فاصله کمی وجود دارد.

در مطالعه حاضر نتایج میکروپلیت های MIC هم به صورت چشمی و هم با دستگاه قرائت و با مقایسه نتایج این دو روش اختلاف قابل ملاحظه ای مشاهده نشد ($P \leq 0/05$). همچنین مقایسه زمان های 48 ساعت و 72 ساعت انکوباسیون نشان از مشابه بودن اطلاعات به دست آمده در زمان های ذکر شده دارد و هیچ اختلاف معنی داری بین زمان های 48 ساعت و 72 ساعت وجود نداشت ($P \leq 0/05$).

همچنین مقایسه بین مدت زمان انکوباسیون 48 ساعت و 72 ساعت میکروپلیت ها در انکوباتور و مشاهده عدم اختلاف بین این دو زمان، مؤید این موضوع می تواند باشد که مواد مؤثره این اسانس ها و نانواسانس ها در همان ساعت های ابتدایی در محیط آزاد و تأثیر خود را بر جا گذاشته و افزایش مدت انکوباسیون تأثیری بر روند ضد میکروبی بیشتر اسانس و نانواسانس ندارد.

اجاق و همکارانش در سال 2012 اثر ضدباکتریایی اسانس پوست دارچین را در شرایط آزمایشگاهی در برابر 5 باکتری عامل فساد غذایی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه سینامالدهید (60/41 درصد) بیشترین مقدار ترکیبات موجود در دارچین را به خود اختصاص داد و حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس دارچین در مقابل پنج باکتری بیماری زا و فساد زا در مواد غذایی (*لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیاکلی*، *پسودوموناس فلوئورسانس* و *لاکتوباسیلوس ساکئی*) ارزیابی شد[53].

با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر و مقایسه با گزارش اجاق و همکاران می توان اسانس دارچین را در دسته مهار کننده های قوی دسته بندی نمود.

طاهانژاد و همکارانش در سال2010 در پژوهشی فعالیت ضد اکسایشی اسانس اسطوخودوس را در سامانه روغن خام سویا مورد مطالعه قرار دادند که نتایج آنالیز اسانس در این بررسی شامل لینالول (27/89درصد)، کامفور (10/82 درصد)، 1و8سینئول (9/05درصد)، لینالول استات (8/86 درصد)، بورن اُل(7/29 درصد) و آلفا تریپن اُل (5/04 درصد) بود[15].

Saimary و همکارانش در سال 2002 در یک مطالعه اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه مورد را بر روی *استافیلوکوک اورئوس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* بررسی نموده و قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوک اورئوس* را 8 میلی متر و *پسودوموناس آئروژینوزا* را در حدود 16 میلی متر گزارش کرده است[19].

Montoro و همکارانش در سال 2005 اثرات ضد میکروبی عصاره مورد را مربوط به ترکیبی بنام پلی فنولیک بیان کرده که اغلب ضد باکتری بوده و 2 ماده مهم بنام میرتوکومولون A و B از آن جدا کرده که دارای اثرات ضد میکروبی به خصوص بر روی باکتری های گرم مثبت می باشند[49].

در پژوهش انجام شده توسط رسولی و رضایی در سال 2000 تأثیر ضد میکروبی اسانس های اسطوخودوس و مریم گلی با تکنیک دیسک پلیت در رقت های 1، 1/2، 1/4، 1/8 و 1/16 و در چهار مرحله زمانی صفر(روغن تازه)، یک، دو، سه ماه پس از اسانس گیری مطالعه شد. در این بین ترکیبات اصلی اسانس اسطوخودوس لینالول، 1و8 سینئول و بتا اُرنئول گزارش شد. و حداقل غلظت مهارکننده رشد این اسانس را در برابر *استافیلوکوک اورئوس* در رقت 1 و با قطر هاله عدم رشد 20 میلی متر و همچنین حداقل غلظت مهارکننده رشد را در برابر اشرشیاکلی در رقت 1 و با قطر هاله عدم رشد 16 میلی متر گزارش کردند. و همچنین گذشت زمان را به دلیل اختلاف اسانس ها در اندازه قطر هاله های ممانعت بر روی میکروارگانیسم های مورد مطالعه به عنوان عاملی که تأثیر ضد میکروبی اسانس ها را کاهش می دهد بیان کردند[7].

در تحقیق انجام شده در سال 2011 هاشمی و همکارانش اثر ضد میکروبی عصاره متانولی گیاهان آویشن شیرازی، مورد و اسپند را بر روی سوش های استاندارد و ایزوله های بالینی *پسودوموناس آئروژینوزا* حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع توسط تست فنوتیپی تأییدی، Double disk synergy test و نوار های E-test مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی عصاره متانولی مورد نشان داد که MIC مربوط به سوش استاندار PAO1، 8821M و ATCC27853 به ترتیب برابر با 0/4، 0/05 و 0/05 میلی گرم بر میلی لیتر می باشد[37].

هوشمند و همکارانش در سال 2010 اثر ضد باکتریال غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد را بر برخی از باکتری های حفره دهانی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. و قطر هاله عدم رشد برای باکتری های *استافیلوکوک اورئوس و پسودوموناس آئروژینوزا* در غلظت 2/5 درصد از عصاره مورد برابر با 8 و 16 میلی متر بود[39].

محبوبی و قاضیان بید گلی در سال 2009 در مطالعه ای پس از شناسایی اجزای اسانس درمنه با استفاده از GC/MS وجود 54 ترکیب را که 98 درصد از کل اسانس درمنه را تشکیل می دهند به این نتیجه رسیدند که مهمترین اجزای آن ژرانیل استات، آلفا سیترال، لینالول، ژرانیول و Z سیترال می باشد. و اثر ضد میکروبی اسانس درمنه کوهی با افزایش غلظت، افزایش می یابد و همچنین اثر ضد باکتریایی آن بیشتر است و باکتری های گرم منفی نسبت به باکتری های گرم مثبت مقاوم تر بوده و متوسط میانگین قطر هاله عدم رشد اسانس درمنه بر باکتری های گرم مثبت و قارچ ها به ترتیب از اثر ونکومایسین و آمفوتریپسینB بیشتر بوده و این اثر در باکتری های گرم منفی از جنتامایسین کمتر بوده است. در این بررسی همچنین MIC اسانس درمنه بر

روی *استافیلوکوک اورئوس*، *استرپتوکوک پنومونیه* و *پسودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب برابر با 0/5، 1 و 32 <میکروگرم بر میلی لیتر بیان نمودند[47].

تفاوت موجود در نتایج گزارش محبوبی و قاضیان بیدگلی را با پژوهش حاضر می توان به نوع ترکیبات اصلی و درصد آن ها در اسانس و همچنین سویه های منتخب باکتری نسبت داد.

2-5 نتیجه گیری

با انجام این پژوهش مشخص شد که در آزمون MIC وMBC، نانواسانس های اسطوخودوس، درمنه، مورد و دارچین قوی ترین اثر را در وحله اول بر روی *استرپتوکوک پنومونیه* و *استرپتوکوک پیوژن* و بعد از آن بر روی *استافیلوکوک اورئوس* و *پسودوموناس آئروژینوزا* که از باکتری های درگیر در عفونت سینوزیت می باشند؛ داشته است و همچنین تأثیر نانواسانس ها در مقایسه با اسانس های طبیعی هر گیاه کمتر است.

3-5 پیشنهادات

با توجه به اینکه در زمینه استفاده از نانواسانس ها فعالیت های بسیار محدودی انجام گرفته است تحقیق در این زمینه بسیار مفید و کاربردی خواهد بود. با توجه به اثرات جانبی کم نانواسانس ها در مقایسه با ترکیبات شیمیایی موارد زیر پیشنهاد می گردد:

1. بررسی اثرات ضد میکروبی نانواسانس های تولید شده از اسانس های گیاهی
2. مقایسه همزمان اثر ضد میکروبی اسانس و نانواسانس با یکدیگر
3. استفاده از نانواسانس ها به منظور کاربرد در امور پزشکی، داروسازی، دامپزشکی و صنایع غذایی به صورت عنصر ضد باکتریایی
4. ارزیابی خواص درمانی نانواسانس ها بر روی حیوانات آزمایشگاهی و نهایتا بیماران
5. استفاده از نانواسانس ها به عنوان نگهدارنده های مواد غذایی، غلات و حبوبات برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم های مختلف

منابع

منابع پارس پژوهه

منابع

[۱] اجاق، م.، [و همکاران] . ، 1391، ***اثر پوشش های آنتی میکروبی در افزایش ماندگاری ماهی قزل آلای رنگین کمان***، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره 34، دوره 9.

[۲] بوداقپور، س. ، باقری، ح. ، 1390، ***کاربرد کیتوزان در حذف فلزات سنگین از آب و فاضلاب***، ششمین کنگره ملی مهندسی عمران، دانشگاه سمنان.

[۳] بیدریغ، س. ، خوش خلق، م. ر. ، مسیحا، ع. ر. ، عیسی زاده، خ. ، فائزی قاسمی، م. ، 1387، ***مقایسه حداقل غلظت مهاری عصاره گیاه مورد و نیستاتین برروی سویه های کلینیکی و استاندارد Candida albicans در شرایط آزمایشگاهی***، مجله علوم زیستی واحد لاهیجان، شماره 4، دوره 2، ص. 27 تا 34.

[٤] پارچه باف بیدگلی، م. ، 1391، ***اصول تشخیص و درمان بیماری های شایع***، ویرایش سوم. چاپ هشتم. تهران: انتشارات جهان آدیب، سینا طب، ص. 159-352.

[٥] جعفرنیا، س. ، خسروشاهی، س. ، قاسمی، م. ، 1390، ***راهنمای جامع و مصور خواص و کاربرد گیاهان دارویی***، تهران: انتشارات سخن گستر.

[٦] رحیمی، م. ک. ، 1386، ***فشرده میکروبیولوژی پزشکی***، ویرایش دوم. چاپ سوم. تهران: انتشارات آییژ.

[۷] رسولی، ا. ، رضایی، م. ب. ، 1379، ***بررسی فعالیت ضد میکروبی و ترکیبات شیمیایی اسانس گل های اسطوخودوس و مریم گلی***، مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، شماره 4، دوره 7، ص. 181 تا 173.

[۸] زرگری، ع. ، 1390، ***گیاهان دارویی***، ویرایش دوم. چاپ هفتم. تهران: انتشارات دانشگاه تهران، جلد دوم، ص. 322 تا 326.

[۹] زرگری، ع. ، 1390، ***گیاهان دارویی***، ویرایش دوم. چاپ هفتم. تهران: انتشارات دانشگاه تهران، جلدسوم، ص. 110 تا 113.

[۱۰] زرگری، ع. ، 1390، ***گیاهان دارویی***، ویرایش دوم. چاپ هفتم. تهران: انتشارات دانشگاه تهران، جلد چهارم، صص. 31 تا 28 و 343 تا 348.

[۱۱] سعادتمند، م. م. ، [و همکاران]. ، 1389، ***بررسی اثر ضد باکتری نانوذرات کیتورزان روی باکتری اشرشیاکلی***، اولین کنفرانس علوم و فناوری نانو، دانشگاه پیام نور استان یزد.

[۱۲] سعادتمند، م. م. ، [و همکاران]. ، 1391، ***خاصیت ضد میکروبی نانو کامپوزیت کیتوزان Tio2 و به کار گیری آن روی گاز استریل بیمارستانی***، مجله علوم آزمایشگاهی، دوره 6، شماره 1.

[۱۳] سفیدکن، ف. ، ترابی سگوند، ب. ، نادری، م. ، گوشه گیر، ا. ، 1392، ***مقایسه اثر ضد سرطانی نانوکپسول عصاره گیاه علف چشمه، عصاره متانولی و فراکسیون های آن***، فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، شماره 6، دوره 59.

[۱٤] صالحی سورمقی، م. ح. ، 1389، ***گیاهان دارویی و گیاه درمانی***، تهران: انتشارات دنیای تغذیه، جلد سوم، ص. 190 تا 192.

دانشگاه یزد

[۱۵] طاها نژاد، م. ، برزگر، م. ، سحری، م.ع. ، نقدی بادی، ح.ع. ، 1390، ***ارزیابی فعالیت ضداکسایشی اسانس اسطوخودوس (Lavandula angustifolia) در سامانه روغن خام سویا***، فصلنامه گیاهان دارویی، شماره 8، دوره اول، ص. 127 تا 140.

[۱۶] عنایتی، م. ، 1392، ***بررسی میزان تأثیر نانواسانس های درمنه، زیره سبز و مرزه بر روی گونه های آسپرژیلوس جدا شده از پودر ماهی تولیدی کارخانجات استان مازندران***، پایان نامه دکترای حرفه ای (دامپزشکی)، دانشکده دامپزشکی واحد علوم تحقیقات تهران.

[۱۷] میرآزادی، ز. ، پیله ور، ب. ، مشکوة السادات، م. ه. ، کرمیان، ر. ، 1390، ***توصیف شرایط رویشگاهی و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس درختچه مورد***، مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، دوره 3، شماره2، ص. 71 تا 79.

[۱۸] نلسون، مترجم ثبوتی، ب. ، حسین زاده، ع. ، 1391، ***بیماری های عفونی باکتری و قارچ***، چاپ دوم. تهران: مؤسسه انتشاراتی آرتین طب.

منابع لاتین

[19] AL-saimary, I. E., Bakr, S. S., Jaffar, T., Al-Saimary, A. E., Salim, H., Al-Muosawi, R., 2002, ***Effects of some plant extracts and antibiotics on pseudomonas aeruginosa isolated from various burn cases***, Saudi Med J, Vol. 23, No. 7, P. 802-805.

[20] Ballenger, 1991, **Diseases of the nose, throat, ear, head & neck**, P. 1376.

[21] Baroody, F. M., 1994, ***Medical treatment of sinusitis***, J Med Liban, No. 42, P. 190-195.

[22] Bethesda, M. A., 1990, ***NIH Data Book*** , US Department of Health and Human Services, Table 44, P. 90-1261.

[23] Bhattacharyya, N., 2003, ***the economic burden and symptom manifestations of chronic rhinosinusitis***, Am J Rhinol, P. 17- 27.

[24] Bonjar, G. H., 2004, ***Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine***, Fitoterapia, Vol. 75, No. 2, P. 231-235.

[25] Brook, I., 2006, ***Sinusitis from microbiology to management***, New York: Taylor & Francis Group, P. 109.

[26] Burt, S., 2004, ***Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review***, Int. Food Microbiol, Vol. 4, No. 3, P. 233 -253.

[27] Chevallier, M. A., 1996, ***the encyclopedia of medicinal plants***, London: Dorling kindersley, P. 2360.

[28] Chow, J. M., 1995, ***the diagnosis and management of sinusitis***, Comp Ther, Vol. 21, P. 74-79.

[29] Cummings, C. N., [etal], 1998, ***Otolargngology head and neck surgery***, 3th ed. ST Louis, Mosby.

[30] Diaz, I., Bamberger, D. M., 1995, ***Acute sinusitis***, 10th ed. Semin Respir Infect, P. 14-20.

[31] Ferguson, B. J., 1995, ***Acute and chronic sinusitis: how to ease symptoms and locute the cause,*** Postgrad Med, vol. 97, P. 45-57.

[32] Fingold, S., Ellenjo, B., 1982, ***Diagnostic microbiology, Toronto, London***: Mosby Co, St. Lowis, P. 670-671.

[33] Ghahreman, A., 1994, ***Cormophytes of Iran (Plant systematic)***, Tehran: Tehran Center Univ Pup, p. 841.

[34] Gliklich, R. E., Metson, R., 1995, ***The health impact of chronic sinusitis in patients seeking otolaryngologic care***, Otolaryngol head, neck, surg, P. 104-113.

[35] Gholamhoseinian, A., Shakibaei, M., Jamali, Z., 2005, ***Mechanisem of antibacterial activity of methanolic extract of Myrtus communis L. on E. coli K12 HB101***, Journal of Rafsenjan University of Medical Sciences, Vol. 4, No. 4, P. 220-227.

[36] Hakimi Maybody, M. H., Afkhami Aghdai, M., Mirjalili, F., 2003, ***An investigation into biological activities of A. persica's essential oil,*** Pajouhesh & Sazandegi, No. 61, p. 2-5.

[37] Hashemi, A., Shams, S., Barati, M., Samedani, A., 2011, ***Antibacterial effects of methanolic extracts of Zataria multiflora, Myrtus communis and Peganum harmala on Pseudomonas aeruginosa producing ESBL,*** Arak Medical University Journal , Vol. 14, No. 57, P. 104-112.

[38] Heywood, V. H., Harborn, J. B., Turner, B. L., editors, 1997, ***The biology and chemistry of the composited***, London: Academic Press, P. 868.

[39] Houshmand, B., [etal]., 2011, ***In Vitro evaluation of antibacterial effect of Myrtus extract with different concentrations on some oral bacteria,*** J Mash Dent Sch , Vol. 35, No. 2, P. 123-30.

[40] Hugo, W. B., Russel, A. D., 1992, Pharmaceutical microbiology, 5th ed. London: Blackwell Scientific Publication, P. 231.

[41] Inouye, Sh., Takizawa, T., Yamaguhi, H., 2001, ***Antibacterial activity of essantial oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact***, Journal of Antimicrobial chemotherapy, No. 47, P. 565-573.

[42] Jawetz, E., [etal]., 2013, ***Medical microbiology***, 26th ed. The MC Graw-Hill companies, Inc, P. 199-245.

[43] Kays, S. J., 1991, ***Postharvest physiology of perishable plant products***, Copyright by Nostrand Reinhold.

[44] Kilani, S., Abdelwahed, A., Chraief, I., Ben Ammar, R., Hayder, N., Hammami, M., 2005, ***Chemical Composition, antibacterial and anti mutagenic activities of essential oil from (Tunisian) Cyperus rotundus. J Essent Oil Res,*** Vol. 17, No. 6, P. 695-700.

[45] Lai, F., Wissing, S. A., Muller, R. H. and Fodda, A. M., 2006, ***Artemisia arborescens L essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization***, American Association of Pharmaceutical Scientists Technology,Vol. 7, No. 1, P. 10-18.

[46] Mahboubi, M., Farzin, N., 2009, ***Antimicrobial activity of Artemisia sieberi essential oil from central of Iran***, Iranian journal of microbiology, Vol. 1, No. 2, P. 43-48.

[47] Mahboubi, M., Qazian Bidgoli, F., 2009***, Chemical composition and antimicrobial activity ofnArtemisia aucheri Boiss. essential oil***, Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, Vol. 25, No. 3, P. 429-440.

[48] Messaoud, C., Zaouali, Y., Ben Saleh, A., Khoudja, M. L., Boussaid, M., 2005, ***Myrtus communis in Tunisia variability of the essential oil composition in natural population***, Flavour and Fragrance Journal, Vol. 20, P. 577-582.

[49] Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., De Tommasi, N., 2005, ***Structure antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plants species***, Food Chemistry , No. 92, P. 349-55.

[50] Mozaffarian, V. A., 1996, ***Dictinary of Iranian plant names***, Tehran: Farhang moaser , P. 547.

[51] Negahban, M., Moharramipour, S., Zand, M., Hashemi, S. A., 2013, ***Repellent activity of nanoencapsulated essential oil of Artemisia sieberi Besser on Plutella xylostella L. larvae***, Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, Vol. 29, No. 4, P. 909-924.

[52] Nikaido, H. Vaara, M., 1985, ***Molecular basis of bacterial outer membrane permeability***. Microbiological Reviews, Vol. 49, P. 1-23.

[53] Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., Hosseini, S. M. H., 2012, ***Investigation of antibacterial activity cinnamon bark essential oil (Cinnamomum zeylanicum) in vitro antibacterial activity against five food spoilage bacteria,*** JFST ,Vol. 9, No. 35, P. 67-76.

[54] Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. -P., Be´gin, A., 1997, ***Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms***, International Journal of Food Microbiology, No. 37, P. 155 – 162.

[55] Ozcan, M., Erkmer, O., 2001. ***Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices***, Eur Food Res Technol, Vol. 212, No. 6, P. 658-660.

[56] Paparella, M. M., 1991, ***Otolaryngology infectious diseases of the paranasal sinuses***, P. 1843.

[57] ***Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, Nccls***, 2002, Vol. 22, No. 1.

[58] Pourmand, M. R., Yazdi, M. H., Bayat, M., Shahinjafari, A., 2008, ***In vitro*** **antimicrobial effects of** ***Zataria multiflora*** **Boiss.,** ***Myrtus communis*** **L. and** ***Eucalyptus officinalis*** **against** ***Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis*** **and** ***Haemophilus influenzae*** , Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, Vol. 23, No. 4, P. 477-483.

[59] Rasooli, I., Rezaei, M. B., 2000, ***A study on antimicrobial activity and chemical compositions of essential oils from flowers of Lavandula angutifolia and Salvia officinalis***, Journal of Kerman University of Medical Sciences, Vol. 7, No. 4, P. 173-181.

[60] Rotstein, A., Lifshitz, A., Kashman, Y., 1974, ***Isolation and antibacterial activity of acylphloroglucinols from Myrtus communis***, Antimicrob Agents Chemother, Vol. 6, No. 5, P. 539-42.

[61] Saeedi, S., Sabbagh, S. K., Sabori Robat, E., 2008, ***A Study of antibacterial activity of plant extract and essential oil of Myrtus communis against resistant strains of Staphyloccocus aureus bacteria to selective antibiotics,*** Zabol Medical University Journal ,Vol. 14, No. 57,104-112.

[62] Salehi Surmaghi, H., 2006, ***Medicinal plants and phytotherapy***, Tehran: Donyaee Taghazie,PP. 59 - 63, 359 - 366.

[63] Schwalbe, R.,[etal]., 2007,***Antimicrobial susceptibility testing protocols***, CRC Press, Taylor and Francis Group.

[64] Shahidi Bonjar, G. H., Nik, A., Aghighi, S., 2004, ***Antimicrobial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal medicine of south east regions of Iran***. journal of biological science, Vol. 13, P. 405-410.

[65] Snow, V., Mottur-Pilson, C., Hickner, J. M., 2001, ***Principles of appropriate antibiotic use for acute sinusitis in adults***, Ann Intern Med, Vol. 134, No. 6, P. 495-497.

[66] Trease, G. E., Evans, W. C., 1996, ***Pharmacognosy*.** London: Saunders, PP. 167, 262, 476.

[67] Vakili, N., Shirazi, F. H., Abdi, K., Molepo, M., Goel, R. 2003, ***Marker peaks for the assignment of cisplatin effectiveness on tumor cells using Fourier transformed Infra-red spectgroscopy***, New York: 9th ISPCC.

[68] Vijay, B., 2002, ***Artemisia persica oil***, India: Modern natural products.

[69] Wendakoon, C. N. Sakaguchi, M., 1995, ***Inhibition of amino acid decarboxylase activity of Enterobacter aerogenes by active components of spices***, Journal of Food Protection, Vol. 58, P. 280-283.

[70] Wichtl, M., 1994, ***Herbal drugs and phytopharmaceuticals***. Translated by: Bisset, N. G., Boca Raton: CRC Press, PP. 292 -294, 313 - 314.

[71] Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., Rasooli, I., 2006, ***Biochemical activities of Iranian Mentha piperita L. and Myrtus communis L. essential oils***, Elsevier Journal, Vol. 67,No. 13, P. 1249-1255.

[72] Y. XU., 2002, ***Particle Characterization: Light Scattering Methods***, Kluwer Academic Publishers.

مرجع پایان نامه

Abstract

Sinusitis is one of the most prevalent problems among those who visit doctor and it needs antibiotic indication. The main most bacteria in creating this disease are *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeroginosa*. Today according to dangerous side effects of chemical drugs on human body, using new formulation methods such as nano-encapsulating herbal essences is considered because of more functionality and its side effect reduction caused by direct consumption. In this study, with *in vitro* method, the antimicrobial effect of four herbal nano-essences including *Lavandula angustifolia* Mill, *Cinnamomum verum* J. S. Persl, *Artemisia sieberi* Besser and *Myrtus communis* L. on micro-organisms of *Streptococcus pneumonia* , *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeroginosa*, which are among the important factors of Sinusitis compared with natural essences has been examined. First, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) quantitative tests and then qualitative test (disk diffusion) have done.

The quantitative result in examined nano-essences was 0. 097 $^{\mu g}/_{ml}$ for *Streptococcus pneumonia* with Lavander nano essence, 0. 097 $^{\mu g}/_{ml}$, for *Streptococcus pyogenes* with Artemisia and Lavander nano essences, 1. 562 $^{\mu g}/_{ml}$ for *Staphylococcus aureus* with Artemisia nano-essence and 3. 215 $^{\mu g}/_{ml}$ for *Pseudomonas aeroginosa* with Artemisia and Lavander nano-essences. The results show less nano-essence effectiveness in comparison with natural essences. And the disk diffusion test shows that nano-essences don't have the ability to be released from paper disks and diffuse in solid environment.

The results show proper effects of these nan-essences on the four mentioned Sinusitis factor micro-organisms and we can hope for making effective drugs for destroying these micro-organisms with herbal resource and having less side effects.

Key Words: nano essence , Lavander, Artemisia, Myrtle, Cinnamon ,MIC, MBC

Islamic Azad University

Pharmaceutical Branch

Advanced Science & Technology Faculty

((M. Sc)) Thesis on Microbiology

Subject

The evaluation antimicrobial effects of *lavandula angustifolia* Mill, *Artemisia sieberi* Besser, *Cinnamomum verum* J. Presl and *Myrtus communis* L against prevalent micro organisms of sinusitis

Thesis Advisor

Dr.Mansor Bayat

Consulting Advisor

Dr.Setareh Haghighat

Dr.Afshin Mohsenifar

By

Susan Ghorbani Darabad

Winter 2014