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

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

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

چکیده

تحقیقات نشان داده است که نانوذرات اکسیدروی فعالیت ضدمیکروبی قوی برعلیه ریزاندامگان دارند. هم‌چنین اثرات ضدمیکروبی مناسبی از عصاره گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis*) گزارش شده است. در تحقیق حاضر اثرات عصاره زوفا و نانوذرات اکسیدروی به‌صورت منفرد و هم در حالت ترکیب عصاره با نانوذرات بر روی سلول‌های مخمرهای تک سلولی *Saccharomyces cerevisiae* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا عصاره گیاه زوفا استخراج و سپس ترکیب آن با نانو ذرات اکسید روی صورت گرفت. نتایج نشان داد که عصاره گیاه زوفا در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای غلظت موثر است و به‌تدریج با افزایش غلظت موجب کاهش تعداد سلول‌های مخمر شد ($p<0/05$). نانوذرات اکسید روی در غلظت ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای غلظت موثر بوده و به‌تدریج موجب کاهش تعداد سلول‌های مخمر شد. این تحقیق نشان داد که نانوذرات اکسید روی در غلظت‌های ۰/۰۴ و ۰/۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث تحریک رشد در سلول‌های مخمری شد ($p<0/05$). نانوذرات در غلظت ۰/۰۰۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و نانوذرات اکسیدروی با ۰/۰۰۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گیاه زوفا به‌تدریج موجب کاهش تعداد سلول‌های مخمر شد. هم‌چنین تحریک رشد سلول‌های مخمر در غلظت‌های ۰/۰۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسیدروی با ۰/۰۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گیاه زوفا مشاهده شد ($p<0/05$).

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

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Hemitriza@gmail.com

مقدمه

اثرات ضدمیکروبی گیاهان دارویی در دهه اخیر به‌صورت جامع مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است که اغلب عصاره‌ها و اسانس‌های استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضدقارچی، ضدانگل، ضدباکتری و ضدویروس می‌باشند (Kordali و همکاران، ۲۰۰۵؛ Tepe و همکاران، ۲۰۰۴). با توجه به این اثرات اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در زمینه‌های فارموکولوژیکی، داروشناسی گیاهی، میکروبیولوژی پزشکی و کلینیکی، آسیب‌شناسی گیاهی و نگه‌داری مواد غذایی، میوه‌ها و سبزی‌ها شدیداً غربالگری شده و مورد استفاده قرارگرفته‌اند (Mahdavi Maymand و Mirtajodin، ۲۰۱۰). زوفا با نام علمی *H.officinalis* یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای به‌شمار می‌رود. روغن زوفا دارای اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی است. مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد روغن زوفا دارای اثرات ضدمیکروبی برعلیه میکروب‌هایی چون *Streptococcus pyogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Candida albicans* است (Ghasemi Pirbalouti و همکاران، ۲۰۱۳).

اثبات شده است که نانوذرات نیز می‌توانند اثرات ضدباکتریایی خوبی داشته باشند (Jin و همکاران، ۲۰۰۹). در سال‌های گذشته نانو ذرات غیرآلی که از نظر فیزیکی، شیمیایی و خصوصیات زیستی ساختار ویژه‌ای دارند، بسیار مورد توجه زیست‌شناسان قرار گرفته‌اند (Baker، ۲۰۰۱). هم‌چنین خصوصیات مفید نانو مواد، کاربرد آن‌ها در انجام فرآیندهای متنوع و حساس به‌ویژه در زیست‌شناسی و کاربردهای داروسازی را سبب شده است. گزارش‌هایی از اثرات ضدمیکروبی نانو مواد وجود دارد. چرا که نانو مواد از جمله اکسید فلزات سنگین، تمایل بالایی به میانکنش با مولکول‌های زیستی دارند و سبب غیرفعال شدن آن‌ها می‌گردند و در نهایت میکروب را از بین می‌برند (Burda و همکاران، ۲۰۰۵). نانوذرات اکسیدروی ترکیباتی غیرسمی، زیست سازگار و پایدار نسبت به شرایط پردازش هستند. گزارشات حاکی از آن است که این ذرات، سمیت انتخابی بر میکروب‌ها دارند اما حداقل اثرات جانبی را بر روی سلول‌های انسانی و حیوانی نشان داده‌اند. مکانیسم ضدمیکروبی نانوذرات اکسیدروی از طریق تولید فوتوکاتالیستی هیدروژن پراکسید، آزادسازی یون‌های روی، تخریب پروتئین‌ها و لیپیدهای غشای سلول‌های میکروبی و سرانجام تراوش محتویات درون سلول به بیرون و مرگ سلول میکروبی می‌باشد (Huh و Kwon، ۲۰۱۱؛ Li و همکاران، ۲۰۰۸).

به‌دلیل آثار تخریبی شدید نانو ذرات بر روی ارگانیسم‌های زنده اخیرا اهمیت ساخت و استفاده از نانو ذرات ارگانیک مورد توجه قرار است. نانوذرات ارگانیک به‌دلیل دارا بودن ویژگی‌های خاص و بیولوژیکی پایه می‌توانند اثرات خاصی داشته باشد. تمایل به تهیه ذرات با ابعاد نانو مبتنی بر اصول شیمی سبز و بررسی کاربرد آن‌ها روز به روز در حال افزایش است و بدین منظور انواع گوناگونی از ساختارهای زیستی از جمله گیاهان، جلبک‌ها و ریزاندامگانی از قبیل باکتری‌ها، کپک‌های رشته‌ای و مخمرها جهت تهیه نانوذرات استفاده می‌شوند (Mandal و همکاران، ۲۰۰۶). در سال‌های اخیر نیاز به بیوسنتز نانوذرات هم‌زمان با افزایش بهای فرآیندهای فیزیکی و شیمیایی برای تولید این دسته از مواد افزایش یافته است. بنابراین محققان در جستجوی مسیرهای ارزانتری برای سنتز نانوذرات، استفاده از ریزاندامگان و پس از آن عصاره‌های گیاهان را به‌عنوان روش‌های جدید سنتز این دسته از مواد مطرح کرده‌اند (Mohanpuria و همکاران، ۲۰۰۷). اغلب روش‌های سنتز شیمیایی منجر به حضور برخی ازگونه‌های سمی مواد شیمیایی با عوارض جانبی در برنامه‌های کاربردی پزشکی می‌شوند. لذا تولید نانوذرات زیستی سازگار با محیط زیست جزو برنامه‌های کاربردی تحقیقات دارویی هستند. در مقابل اثرات بسیار مخرب اغلب نانوذرات، نانوذرات ارگانیک اثرات متفاوت‌تر و مفیدتری را در ارگانیسم‌های زنده دارند. پایداری نانوذرات متصل به پلیمرهای زیستی آن‌ها در مایعات بیولوژیک درطول ذخیره‌سازی موجب شده است که به‌عنوان یک سیستم بالقوه در تحویل مواد داروئی به‌کار روند (Parashar و همکاران، ۲۰۰۹). بر این اساس ساخت نانوذارت فلزی ارگانیک بر پایه عصاره‌های گیاهی یکی از روش‌های ساده و موثر ساخت این دسته از مولکول‌ها می‌باشد (Ahmed و همکاران، ۲۰۱۶).

با توجه آثار مخرب زیست محیطی نانوذرات فلزی بر روی سلول‌های زنده و کاهش این آثار در صورت استفاده از نانو ذرات ارگانیک و هم‌چنین امکان تولید نانوذرات ارگانیک با ساده‌ترین و کاربردی‌ترین روش آن یعنی استفاده از عصاره‌های گیاهی، در تحقیق حاضر تاثیر نانوذرات اکسید روی و عصاره گیاه زوفا به‌صورت منفردو ترکیبی بر روی مخمرهای تک سلولی به‌عنوان یکی از مدل‌های آزمایشگاهی یوکاریوتی مورد تحقیق قرار گرفت. به‌منظور بررسی غلظت موثر و نحوه تاثیرگذاری مواد فوق بر روی سلول‌های یوکاریوت نیز از یک مدل تحقیقاتی یوکاروتی تک سلولی به نام مخمر *cerevisiae*.که مدل ایده‌آلی برای مطالعات سلولی و مولکولی است استفاده شد (Wang و Chen، ۲۰۰۶).

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری گیاه زوفا: گیاه زوفا از عطاری تهیه و پس از خشک کردن، توسط آسیاب دستی کوچک پودر شد. مقدار ۳۵ گرم از پودر

گیاهی توزین و با ۵۰ میلی‌لیتر الکل ۹۶ درصد ترکیب و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت نمونه از انکوباتور خارج شد و مایع رویی آن با کاغذ واتمن جدا گردید و مجدداً ۵۰ میلی‌لیتر الکل ۹۶ درجه به رسوب حاصل برای عصاره‌گیری بیش‌تر اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت دوم محلول به‌دست آمده دوباره با کاغذ واتمن جدا و نمونه به پتری‌دیش شیشه‌ای منتقل شد و در انکوباتور ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا الکل موجود تبخیر شده و عصاره خالص به‌دست آید. پس از ۴۸ ساعت یک عصاره غلیظ فاقد الکل به‌دست آمد تا جهت بررسی تاثیر این عصاره بر روی مخمر مورد استفاده قرار گیرد. هرگرم از عصاره گیاهی حاصل در ۱۰ میلی لیتر DMSO حل گردید. اضافه کردن این ماده ضروریست زیرا این ماده یک حلال آلی قطبی بی‌ضرر برای ترکیب نمودن مواد مختلف در معرض میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (مشرقی و همکاران، ۱۳۸۶).

آماده‌سازی نانوذرات اکسید روی: جهت تهیه استوک اصلی نانوذرات، مقدار ۵۰ میلی‌گرم از نانوذرات اکسید روی در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و به‌مدت ۶۰ دقیقه در سونیکاتور قرار داده شد تا نانوذرات به‌طور کامل از یکدیگر جدا شوند. به‌منظور ایجاد سوسپانسیونی از نانوذرات که ذرات آن از هم کاملاً جدا شده‌اند غیر از سونیکاسیون، از ماده BSA در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر محیط کشت مخمر نیز استفاده شد (Wang و همکاران، ۲۰۰۸).

ساخت نانوذرات ارگانیک توسط عصاره گیاه زوفا: ساخت نانوذرات ارگانیک به‌روش ارائه شده توسط Ahmed و همکاران (۲۰۱۶) صورت گرفت. بدین ترتیب ابتدا مقدار ۴ میلی‌گرم از نانوذرات اکسید روی توزین و با ۵ میلی‌لیتر از عصاره گیاه زوفا ترکیب شد. محلول به‌مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۴۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در مدت یک ساعت هر ۱۰دقیقه یک‌بار شدیداً ورتکس شده و در طی این مدت در درون بن ماری (دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شد. پس از طی یک ساعت نمونه به‌مدت ۲۴ ساعت در شیکر با دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت و محلول برای انتقال به محیط‌های کشت آماده شد. آماده سازی محیط کشت مانند مراحل قبل انجام شد و محیط کشت به‌میزان مساوی ۵ میلی‌لیتر به لوله‌های آزمایش منتقل گردید.

مرحله کشت مخمر و بررسی تاثیر عصاره بر سلول‌های مخمر *S.cerevisiae*: ابتدا لازم بود که مخمرهای تک سلولی در محیط کشت مناسب کشت داده شوند. برای این کار از ترکیب ۵درصد گلوکز به‌همراه ۲ درصد عصاره مخمر به‌همراه ۱درصد دی پتاسیم فسفات به اضافه آب مقطر استفاده شد که با تنظیم pH بر روی ۶، محیط کشت آماده شده به‌مقدار مساوی ۵ میلی‌لیتر به‌درون لوله‌های آزمایش منتقل و لوله‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. جهت کشت مخمر ابتدا باید آن‌را فعال کرد. برای این منظور مقدار۰/۲گرم مخمر در ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک حل شد و به‌مدت ۱۵دقیقه در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خروج لوله‌ها از اتوکلاو و سرد شدن کامل آن‌ها به‌داخل هر یک از لوله‌ها مقدار مساوی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول مخمر اضافه گردید (Aoki و همکاران، ۲۰۰۲). ابتدا آزمایش با غلظت‌های مختلف برای تعیین محدوده غلظت‌های بهینه انجام شد. بدین منظور برای تیمار شاهد و هر غلظت از عصاره زوفا ۳ لوله آزمایش (۳ تکرار) در نظر گرفته شد. پس از کشت مخمر و اضافه کردن غلظت‌های گوناگون عصاره گیاهی محیط های کشت جهت رشد مخمر به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از طی این مدت نمونه‌ها جهت شمارش مخمرها مورد بررسی قرار گرفتند. برای این امر رقیق سازی به نسبت ۱ به ۱۰ انجام شد تا شمارش به سهولت انجام شود. غلظت‌های بهینه تعیین شده برای تاثیر عصاره گیاه زوفا به‌شرح جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۱: غلظت‌های بهینه استفاده شده از عصاره گیاه زوفا

میکرولیتر از عصاره زوفا حل شده در DMSO	غلظت (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)
۱۰۰	۰/۰۲
۲۰۰	۰/۰۴
۳۰۰	۰/۰۶
۴۰۰	۰/۰۸

بررسی تاثیر نانوذرات اکسید روی بر سلول‌های مخمر *S.cerevisiae*: محیط کشت به لوله‌های آزمایش منتقل گردید و داخل هرکدام طبق روش پیشین ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت اضافه گردید. داخل هر لوله آزمایش نیز ۵۰ میکرولیتر از BSA اضافه گردید. مراحل کشت مخمر و آماده‌سازی آن مانند مرحله قبل انجام شد. برای تیمار شاهد و هر غلظت ۳ لوله آزمایش (۳ تکرار) در نظر گرفته شد. پس از کشت مخمر و اضافه کردن غلظت‌های گوناگون نانوذرات اکسیدروی، محیط‌های کشت جهت رشد مخمر به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از طی این مدت نمونه‌ها جهت شمارش مخمرها مورد بررسی قرار گرفتند تا غلظت‌های بهینه مطابق جدول ۲ حاصل شوند.

جدول ۲: غلظت‌های بهینه استفاده شده از نانوذرات اکسید روی

میزان مورد استفاده از استوک (میکرولیتر)	غلظت در محیط (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)
۱۲/۵	۰/۰۰۵
۲۵	۰/۰۱
۵۰	۰/۰۲
۱۰۰	۰/۰۴
۱۵۰	۰/۰۶
۲۰۰	۰/۰۸
۳۰۰	۰/۱۲
۴۰۰	۰/۱۶
۵۰۰	۰/۲

بررسی تاثیر ترکیبی نانوذرات اکسید روی به‌همراه عصاره گیاه زوفا بر سلول‌های مخمر *S. cerevisiae*: مراحل کشت مخمر نیز همانند مرحله قبل انجام شد. این مرحله نیز مانند مراحل قبلی چندبار تکرار گردید تا غلظت‌های بهینه تعیین شوند. ۳ لوله آزمایش به‌عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. برای هر غلظت نیز ۳ لوله آزمایش (۳ تکرار) در نظر گرفته شد. پس از کشت مخمر و اضافه کردن غلظت‌های گوناگون عصاره گیاهی + نانوذرات اکسیدروی، محیط‌های کشت جهت رشد مخمر به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی این مدت نمونه‌ها جهت شمارش مخمرها مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های بهینه تعیین شده مطابق جدول ۳ می‌باشد.

جدول ۳: غلظت‌های بهینه استفاده شده از نانوذرات اکسیدروی بهمراه عصاره اتانولی گیاه زوفا

(میکرولیتر از مخلوط نانوذرات اکسید روی+عصاره گیاهی)	غلظت نانوذرات اکسید روی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) + عصاره اتانولی گیاه زوفا (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)
۲	۰/۰۰۱۲ + ۰/۰۰۱۶
۵	۰/۰۰۳ + ۰/۰۰۴
۱۰	۰/۰۰۶ + ۰/۰۰۸
۲۵	۰/۰۱۵ + ۰/۰۲
۵۰	۰/۰۳ + ۰/۰۴
۱۰۰	۰/۰۶ + ۰/۰۸
۲۰۰	۰/۱۲ + ۰/۱۶

آنالیز آماری: نرمال بودن داده توسط آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی شد. میانگین‌ها توسط آنالیز آماری Oneway ANOVA از تست DUNCAN آنالیز و مقایسه شدند. برای بررسی معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح ۹۵ درصد از بسته نرم‌افزاری SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد.

نتایج

نتایج شمارش مخمرهای استرس یافته با عصاره گیاه زوفا: جدول ۴ تاثیر و غلظت موثر عصاره گیاه زوفا را بر روی سلول‌های مخمر نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که عصاره گیاه زوفا در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای غلظت موثر بوده و به‌تدریج با افزایش غلظت موجب کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های مخمر شده است ($p<۰/۰۵$).

جدول ۴: میزان موثر عصاره اتانولی گیاه زوفا بر تعداد سلول‌های مخمر در مدت ۴۸ ساعت (تعداد به درصد از نمونه شاهد)

غلظت نانوذرات اکسید روی + عصاره اتانولی گیاه زوفا (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	انحراف معیار± میانگین
شاهد پس از ۴۸ ساعت	۱۰۰ ± ۰/۰^{a}
۰/۰۰۱۲ + ۰/۰۰۱۶	۹۵/۸۰ ± ۴/۹۱^{a}
۰/۰۰۳ + ۰/۰۰۴	۷۹/۰۰ ± ۴/۳۴^{b}
۰/۰۰۶ + ۰/۰۰۸	۵۹/۷۳ ± ۴/۶۰^{c}
۰/۰۱۵ + ۰/۰۲	۷۲/۲۰ ± ۷/۰۷^{b}
۰/۰۳۰۰ + ۰/۰۴	۷۵/۲۸ ± ۳/۶۰^{b}
۰/۰۶ + ۰/۰۸	۴۱/۵۸ ± ۲/۹۸^{d}
۰/۱۲ + ۰/۱۶	۳۰/۰۷ ± ۰/۵۳^{e}

اعداد در هر ردیف با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری می‌باشند ($p>۰/۰۵$).

نتایج شمارش مخمرهای استرس یافته با نانوذرات اکسید روی: جدول ۵ تاثیر و غلظت موثر نانوذرات اکسیدروی را بر روی سلول‌های مخمر نشان می‌دهد. این بررسی نشان می‌دهد که این نانوذرات در غلظت ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای غلظت موثر بوده و به‌تدریج موجب کاهش تعداد سلول‌های مخمر شده است. هم‌چنین تحقیق نشان داد که نانوذرات فوق در غلظت‌های میانه ۰/۰۴ و ۰/۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مجدداً باعث تحریک رشد در سلول‌های مخمری شده است. به‌طوری‌که این کاهش در تیمارهای اول جبران شده و مجدداً روند افزایشی در تعداد سلول‌های مخمر دیده می‌شود ($p<۰/۰۵$).

جدول ۵ : میزان تاثیر نانوذرات اکسید روی بر تعداد سلول‌های مخمر در مدت ۴۸ ساعت (تعداد به درصد از نمونه شاهد)

غلظت‌های مختلف عصاره (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	۰/۰۸	۰/۰۶	۰/۰۴	۰/۰۲	شاهد
درصد بقاء (میانگین±انحراف معیار)	۳۶/۳۱± ۲/۰۶^{e}	۶۶/۳۹± ۱/۱۷^{d}	۷۱/۵۴± ۱/۲۷^{c}	۹۱/۰۵± ۰/۸۳^{b}	۱۰۰/۰۰± ۰/۰۰^{a}

اعداد در هر ردیف با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری می‌باشند (p>۰/۰۵).

نتایج شمارش مخمرهای کشت داده شده تحت تاثیر نانوذرات ارگانیک اکسید روی: جدول ۶ نشان‌دهنده تاثیر نانوذرات اکسیدروی+عصاره گیاه زوفا بر روی سلول‌های مخمر می‌باشند. این بررسی نشان می‌دهد که این نانوذرات در غلظت ۰/۰۰۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسیدروی + ۰/۰۰۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گیاه زوفا دارای غلظت موثر بوده و به‌تدریج موجب کاهش تعداد سلول‌های مخمر شده است. اما این تحقیق نشان داد که نانوذرات فوق در غلظت های ۰/۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی با ۰/۰۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گیاه زوفا و ۰/۰۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی با ۰/۰۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره گیاه زوفا مجدداً باعث تحریک رشد در سلول‌های مخمری شده است (p<۰/۰۵).

جدول ۶: میزان موثر نانوذرات اکسیدروی به‌همراه عصاره اتانولی گیاه زوفا بر تعداد سلول‌های‌مخمر در مدت ۴۸ ساعت (تعداد به درصد از نمونه شاهد)

غلظت نانوذرات اکسید روی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	میانگین ± انحراف معیار
شاهد پس از ۴۸ ساعت	۱۰۰ ± ۰^{a}
۰/۰۰۵	۹۵/۲۴ ± ۲/۲۶^{ab}
۰/۰۱	۷۹/۲۱ ± ۳/۷۶^{e}
۰/۰۲	۸۵/۴۸ ± ۴/۸۹^{cde}
۰/۰۴	۹۳/۰۰ ± ۴/۰۸^{abc}
۰/۰۶	۹۴/۹۹ ± ۴/۸۳^{ab}
۰/۰۸	۸۵/۷۲ ± ۴/۴۴^{cde}
۰/۱۲	۸۲/۴۸ ± ۶/۹۶^{de}
۰/۱۶	۷۸/۲۲ ± ۵/۵۱^{e}
۰/۲	۸۸/۷۴ ± ۴/۴۸^{bcd}

اعداد در هر ردیف با حروف لاتین یکسان فاقد اختلاف آماری می‌باشند (p>۰/۰۵).

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه زوفا دارای خواص کشندگی در سلول‌های یوکاریوت می‌باشد. در این تحقیق غلظت ۰/۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره توانست نزدیک به ۳۳ درصد رشد سلول‌های مخمر را در محیط کشت غنی کاهش دهد (p<۰/۰۵). هم‌چنین نانو ذرات اکسید روی در غلظت ۰/۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از محیط کشت غنی مخمر توانست حدود ۲۲ درصد رشد سلول‌های مخمر را کاهش دهد. البته در غلظت‌های میانه ۰/۰۴ و ۰/۰۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسید روی موجب تشدید رشد سلول‌های مخمر شدند درحالی‌که در غلظت‌های کم و بیش موجب کاهش تراکم سلول‌های مخمر شده بودند. مهار رشد سلول‌های یوکاریوت و پروکاریوت خصوصاً باکتری‌های بیماری‌زا ازجمله مشکلات قرن اخیر می‌باشد. اخیراً استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های قدیمی و مرسوم نگرانی‌هایی را ایجاد نموده‌اند. براساس مشاهدات سال‌های اخیر آنتی‌بیوتیک‌ها دیگر قادر نیستند سویه‌های مختلف باکتری‌ها را تخریب نمایند. لذا براساس درخواست سازمان بهداشت جهانی و مجامع علمی لازم است گزینه‌های جدیدی برای از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زا تحقیق و معرفی شوند. براساس اسناد و مدارک موجود حذف باکترهای بیماری‌زا توسط عصاره‌های گیاهی سابقه چندین صد ساله دارد. البته عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی با مکانیسم‌هایی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌ها را حذف می‌کنند که این مسئله در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی از نظر بالینی حائز اهمیت است. با توجه به رویکرد دوباره برای مصرف داروها و فرآورده‌های گیاهی، بررسی خواص دارویی گیاهان بومی هر منطقه از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (Eloff، ۱۹۹۹). Dehghanzadeh و همکاران (۲۰۱۲) خاصیت ضدمیکروبی اسانس گیاه زوفای برداشت شده از کوه‌های سپیدان در جنوب‌غربی ایران را بررسی نمودند و نشان دادند که اسانس زوفا دارای اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی است. Kizil و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی ترکیبات شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضدباکتریایی گیاه زوفا برداشت شده از جنوب شرقی آناتولی پرداختند. Marino و همکاران (۲۰۱۲) اثر سه ترکیب اصلی اسانس زوفارا بر ۶ گونه باکتری گرم مثبت و ۹ گونه باکتری گرم منفی بررسی کردند. از جمله مواد موثره گیاهی که تاثیر زیادی بر میکروارگانیسم‌ها دارد ترکیبات فنولی و مهم‌ترین آن‌ها کارواکرول و تیمول می‌باشد (Burt، ۲۰۰۴). براساس تحقیق Dehghanzadeh و همکاران (۲۰۱۲)

اسانس گیاه زوفا دارای میزان زیادی کارواکرول (۷/۳۷ ٪) و تیمول (۱۸/۹۵٪) می‌باشد.

تاثیرات ضدمیکروبی نانوذرات نیز بسیار پذیرفته شده می‌باشد. در تکنولوژی جدید فناوری نانو، از فلزات در ابعاد نانو جهت مصارف ضدمیکروبی به‌میزان زیادی استفاده می‌شود (Singh و همکاران، ۲۰۰۹). Kim و همکاران (۲۰۰۷) اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره علیه مخمر، *E.coli* و *S. aureus* را مورد بررسی قرار دادند. براساس این تحقیقات رشد مخمر و باکتری *E.coli* در غلظت‌های پایینی از نانو ذرات نقره متوقف شدند، درحالی‌که اثرات مهار رشدی روی *S. aureus* خفیف بود. نتایج تحقیقات هم‌چنین نشان دادند که نانوذرات نقره ممکن است با ایجاد گسستگی در ساختار غشای سلولی، اثر ضدقارچی خود را اعمال کند. نانوذرات نقره اثر ضدمیکروبی قوی روی *C. Albicans* که مشابه اثر ضدقارچی آمفوتریسین B (به‌عنوان شاهد) بود (Kim و همکاران، ۲۰۰۹). در مطالعه Brown و همکاران (۲۰۱۲) مشخص شد نانوذرات نقره به تنهایی روی ایزوله‌های مقاوم *Pseudomonas aeruginosa* و *Enterobacter aerogenes* اثر داشته و هنگام ترکیب با آمپی‌سیلین قدرت بیشتری خواهد داشت. درصورتی که نانوذرات طلا تنها در فرم کونژوگه با آمپی‌سیلین، توانایی تأثیر بر روی ایزوله‌های مقاوم را دارد. مطالعات متعدد در زمینه بررسی تأثیر فرم کونژوگه نانوذرات مختلف به تنهایی و در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌ها بر روی بیوفیلم باکتریایی انجام شده است، از جمله این‌که Ansari و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی اثر نانوذرات نقره بر روی بیوفیلم *E.coli* و *Klebsiella pneumoniae* مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف طی گزارشی از موفقیت خود در زمینه حذف بیوفیلم خبر دادند. پیش از این تاثیرات ضدمیکروبی نانوذرات اکسیدروی نیز گزارش شده بود. این نانوذرات فعالیت ضدمیکروبی قوی برعلیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به‌ویژه عوامل بیماریزای غذایی مهم مثل *E.coli*، *Listeria monocytogenes*، *S. aureus* و *Salmonella* دارد (Jin و همکاران، ۲۰۰۹). بررسی‌ها نشان داده که ذرات نانو نسبت به یون‌های فلزی سمیت سلولی بالاتری دارند. زیرا امکان نفوذ آن‌ها به درون غشای سلولی و رهاسازی یون‌های فلزی در درون سلول بیش‌تر است (Wu و همکاران، ۲۰۱۰). Scheckel و همکاران گزارش کردند که آزاد شدن یون روی از نانو ذرات اکسیدروی به فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات اکسیدروی کمک می‌کند (Scheckel و همکاران، ۲۰۱۰). هم‌چنین، Dimpka و همکاران (۲۰۱۱) نقش بیولوژیکی رها شدن یون‌ها از ذرات نانو را نشان دادند به گونه‌ای که سمیت این ذرات هنگام استفاده از کلاته‌کننده‌های اختصاصی یون‌ها از بین رفت. مکانیسم عمل اکسید روی نیز شبیه سایر نانوذرات است ولی بیش‌تر از طریق تخریب دیواره باکتری عمل می‌کند (Reeves و همکاران، ۲۰۰۸). لذا به‌نظر می‌رسد تولید نانوذرات ارگانیک هم می‌تواند موجب کاهش اثرات سمی آزاد شدن نانو ذرات در محیط شود و هم این‌که اثرات مهاری آن‌ها را تشدید کند. براساس مطالعات به‌عمل آمده آثار مخرب نانوذرات در صورت استفاده در غلظت‌های مختلف و هم‌چنین نوع و نحوه استفاده از نانو ذرات متفاوت می باشد. در تحقیق حاضر نیز مشاهده شده با افزایش غلظت نانوذرات در محیط متراکم مخمرهای تک سلولی، رشد در تیمارها افزایش یافته است یعنی در برخی غلظت‌ها این ماده اثرات تشدید کنندگی نیز بر رشد ارگانیسم‌های زنده داشته‌اند. درخصوص تشدید اثرات نانوذرات ساخته شده در سیستم ارگانیک، نتایج تحقیقات علمی ثابت کرده است که نانوذرات اکسیدروی زمانی‌که به‌صورت سبز سنتز شوند در مقایسه با نانوذرات اکسیدروی ساخته شده در حالت شیمیایی، فعالیت ضدباکتریایی و ضد قارچی بیش‌تری نشان می‌دهند. از نتایج به‌دست آمده چنین استدلال می‌شود که می‌توان از چنین نانوذراتی به‌صورت موثر در برنامه‌های کاربردی کشاورزی و ایمنی مواد غذایی استفاده نمود (Gunalan و همکاران، ۲۰۱۲). تحقیقات نشان داده‌اند نانوذرات سلنیوم، روی و منگنز غیرارگانیک نیز تاثیر ضعیف‌تری نسبت به حالت ارگانیک آنان در افزایش وزن لاروها و معدنی شدن مواد در استخوان‌ها داشته‌اند (Izquierdo و همکاران، ۲۰۱۶). با توجه به اثرات مثبت نانوذرات سنتز شده با عصاره‌های گیاهی، اخیراً نانوذرات طلا با استفاده از عصاره ماگنولیا و عصاره برگ کاکی سنتز شدند (Song و همکاران، ۲۰۰۹). Naghsh و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند که مناسب‌ترین زمان اثر مهارکنندگی رشد باکتری *E.coli* شش روز بعد از تیمار با ترکیب توأم نانوذرات نقره در غلظت ppm ۲۵ با عصاره ۱۰۰ درصد اتانولی گیاه اکالیپتوس است. با توجه به استفاده از روش‌های نوین درمان و هم‌چنین کاربردهای شناخته شده گیاهان دارویی کاربرد این ترکیبات با روش‌های نوین درمانی مانند نانوتکنولوژی ضروری به‌نظر می‌رسد. بنابراین، ابتدا بایستی فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات را سنجید و سپس در صورت امکان برای مصارف دارویی از آن استفاده کرد. در تحقیق حاضر نانوذرات اکسیدروی درغلظت ۰/۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر توانست رشد مخمر را نسبت به تیمار شاهد ۲۲ درصد کاهش دهد اما در همان غلظت و در حالت ترکیبی موجب کاهش ۷۰٪ در تراکم سلول‌های مخمر در مقایسه با تیمار شاهد شد ($p<0/05$). با توجه به این‌که عصاره‌های گیاهی از مواد زیست تخریب‌پذیر هستند لذا استفاده از مقادیر کم‌تر نانوذرات برای حذف ریزاندامگان توجیه علمی و اقتصادی دارد.

دلیل موثر بودن نانوذرات ارگانیک در مقایسه با نانوذرات شیمیایی ارائه نشده است ولی به‌نظر می‌رسد در این حالت

مولکول‌های عصاره و نانوذرات می‌توانند اثرات همدیگر را تشدید نمایند (Kuppusamy و همکاران، ۲۰۱۴؛ Naqvi و همکاران، ۲۰۱۳). یا این‌که احتمالا نانوذرات متصل شده به بیومولکول‌ها قادر به نفوذ بهتر از غشای سلول‌های زنده می‌باشند که بایستی مورد مطالعه قرار گیرند. از نتایج ارزشمند این تحقیق امکان ساخت نانوذرات ارگانیک با استفاده از عصاره گیاهی می‌باشد (Ahmed و همکاران، ۲۰۱۶). مطالعات نشان داده است که در حالی‌که قارچها و باکتری نیازمند زمان انکوباسیون نسبتاً طولانی‌تری برای احیاء یون‌های فلزی و ساخت نانوذرات ارگانیک هستند، مواد شیمیایی گیاهی محلول در آب، آن را در یک زمان بسیار کم‌تر به نتیجه می‌رسانند. با جمع‌بندی نتایج تحقیق حاضر و با استناد به گزارش‌های پیشین (Song و همکاران، ۲۰۰۹؛ Gunalan و همکاران، ۲۰۱۲؛ Izquierdo و همکاران، ۲۰۱۶) می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که عصاره‌های گیاهی و نیز برخی نانوذرات فلزی بر رشد ریزاندامگان تاثیرگذار می‌باشند خصوصاً اگر از این مواد به‌صورت ذرات ارگانیک و حالت ترکیبی استفاده شوند. نتایج این تحقیق ضمن تائید یافته‌های پیشین مبنی بر اثرات کشندگی مواد فوق بر روی سلول‌های یوکاریوت، نشان داد که در صورت بهینه نمودن شرایط و غلظت مورد استفاده می‌توان رشد سلول‌های مخمر و شاید اغلب سلول‌های یوکاریوت را نیز تحریک نمود.

منابع

۱. **مشرقی، م.؛ ملائی، ص .؛ غلامی، ز. و تولایی، ش.، ۱۳۸۶.** بررسی اثرات عصاره الکلی برگ و میوه سه گیاه داروئی بومی خراسان بر مدل رشد باکتری *E.coli* 0157 به روش اسپکتروفتومتری. مجله علمی دانشگاه پزشکی سمنان. سال ۸، شماره ۳.

۲. **Ahmed, S.; Ahmad, M.; Swami, B.L. and Ikram, S., 2016.** A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications. A Green Expertise. Vol. 7, pp: 17-28.

۳. **Ansari, M.A.; Khan, H.M.; Khan, A.A.; Cameotra, S.S. and Ruchita, P., ۲۰۱۴**. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles against biofilm of extended spectrum β-lactamase isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae.* Appl Nanosci. Vol. 4, pp: 859-868.

۴. .**Aoki, H.; Miyamoto, N.; Furuya, Y.; Mankura, M.; Endo, Y. and Fujimoto, K., 2002.** Incorporation and Accumulation of Docosahexaenoic Acid from the Medium by Pichia methanolica HA-32. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. Vol. 66, pp: 2632-2638.

۵. **Brown, A.N.; Smith, K.; Samuels, T.A.; Lu, J.; Obare, S.O. and Scott, M.E., 2012.** Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Appl Environ Microbiol. Vol.78, pp: 2768-2774.

۶. **Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R. and El-Sayed, M.A., 2005.** Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. Chemical reviews. Vol.105. pp: 1025-1102.

۷. **Dehghanzadeh, N.; Ketabchi, S. and Alizadeh, A., 2012.** Essential oil composition and antibacterial activity of *Hyssopus Officinalis L.* grown in Iran. Asian J. Exp. Vol. 3, pp: 767-771.

۸. **Dimkpa, C.O.; Alyssa, C.; Britt, D.W.; McLean, J.E. and Anderson, A.J., 2011.** Responses of a soil bacterium, *Pseudomonas chlororaphis O6* to commercial metal oxide nanoparticles compared with responses to metal ions. Environmental Pollution. Vol. 159, pp: 1749- 1756.

۹. **Eloff, J.N., 1999**. It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. J Ethnopharmacol. Vol. 67, pp: 355-360.

۱۰. **Ghasemi-Pirbalouti, A.; Gorgij, A.; Rahimmalek, M. and Hamedi, B., 2013.** Phytochemical response of hyssop *(Hyssopus officinalis* L.*)* to foliar application of jasmonic acid. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs). Vol. 4, pp: 7-14.

۱۱. **Gunalan, S.; Sivaraj, R. and Rajendran, V., 2012.** Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. Progress in Natural Science: Materials International, Vol. 22, pp: 693-700.

۱۲. **Huh, A.J. and Kwon, Y.J., 2011.** Nanoantibiotics: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. Journal of Controlled Release. Vol. 156, pp: 128-145.

۱۳. **Izquierdo, M.S.; Ghrab, W.; Roo, J.; Hamre, K.; Hernández-Cruz, C.M.; Bernardini, G.; Terova, G. and Saleh, R., 2016.** Organic, inorganic and nanoparticles of Se, Zn and Mn in early weaning diets for gilthead seabream (*Sparus aurata;* Linnaeus, 1758). Aquaculture Research, Vol. 47, pp: 318-328.

۱۴. **Jin, T.; Sun, D.; Su, J.Y.; Zhang, H. and Sue, H.J., 2009.** Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes, Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli O157:H7.* Journal of Food Science. Vol. 74, pp: 46-52.

۱۵. **Kim, J.S.; Kuk, E.; Yu, K.N.; Kim, J.H.; Park, S.J.; Lee, H.J. and Kim, Y.K., 2007.** Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. Vol. 3, pp: 95-101.

۱۶. **Kim, K.J.; Sung, W.S.; Suh, B.K.; Moon, S.K.; Choi, J.S.; Kim, J.G. and Lee, D.G., 2009.** Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. Biometals, Vol. 22, pp: 235-242.

۱۷. **Kizil, S.; Hasimi, N.; Tolam, V.; Kilinc, E. and Karatas, H., 2010.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Hyssopus officinalis L.* essential oil. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj. Vol. 38, pp: 99-103.

۱۸. **Kordali, S.; Cakir, A.; Mavi, A.; Kilic, H. and Yildirim, A., 2005.** Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish Artemisia species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 53, pp: 1408-1416.

۱۹. **Kuppusamy, P.; Yusoff, M.M.; Maniam, G.P. and Govindan, N., 2014.** Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in

pharmacological applications–An updated report. Saudi Pharmaceutical Journal. Vol. 24, pp: 473-484.

۲۰. **Kurtzman, C.P. and Piškur, J., 2006.** Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts (in Comparative Genomics: Using Fungi as Models. Berlin: Springer. pp: 29-46.

۲۱. **Li, Q.; Mahendra, S.; Lyon, D.Y.; Brunet, L.; Liga, M.V.; Li, D. and Alvarez, P.J., 2008.** Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. Water Research. Vol. 42, pp: 4602-4591.

۲۲. **Mahdavi-Maymand, Z. and Mirtajodin, M., 2010.** The collection and identification of the some plant species of Kerman province. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs). Vol. 1, pp: 1-24.

۲۳. **Marino, M.; Bersani, C. and Comi, G., 2001.** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae.* International Journal of Food Microbiology. Vol. 67, pp: 187-195.

۲۴. **Naghsh, N.; Soleymani, S. and Torkan, S., 2013.** Inhibitory effect of alcoholic eucalyptus extract with nanosilver particles on *E.coli* growth. J Gorgan Uni Med Sci. Vol. 15, pp: 60-64.

۲۵. **Naqvi, S.Z.H.; Kiran, U.; Ali, M.I.; Jamal, A.; Hameed, A.; Ahmed, S. and Ali, N., 2013.** Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. International Journal of Nanomedicine. Vol. 8, pp: 3187-3۱۹۵.

۲۶. **Reeves, J.F.; Davies, S.J. and Dodd, N., 2008.** Hydroxyl radicals (OH and H_2O_2) are associated with titanium dioxide (TiO_2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Vol. 640, pp: 113-1۲۲.

۲۷. **Scheckel, K.G.; Luxton, T.P.; El-Badawy, A.M.; Impellitteri, C.A. and Tolaymat, T.M., 2010.** Synchrotron speciation of silver and zinc oxide nanoparticles aged in a kaolin suspension. Environmental Science and Technology. Vol. 44, pp: 1307-1312.

۲۸. **Singh, N.; Manshian, B.; Jenkins, G.J.; Griffiths, S.M.; Williams, P.M; Maffeis, T.G. and Doak, S.H., 2009.** Nano genotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials. Vol. 30, pp: 3891-3914.

۲۹. **Tepe, B.; Donmez, E.; Unlu, M.; Candan, F.; Daferera, D. and Vardar-Unlu, G., 2004.** Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (montbret et aucher ex benth.) and *Salvia multicaulis* (vahl). Food Chemistry. Vol. 84, pp: 519-525.

۳۰. **Wang, G.; Siggers, K.; Zhang, S.; Jiang, H.; Xu, Z,.; Zernicke, R.F.; Matyas, J. and Uludağ, H., 2008.** Preparation of BMP-2 containing bovine serum albumin (BSA) nanoparticles stabilized by polymer coating. Pharm Res. Vol. 25, pp: 2896-2909.

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

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