DOI: 10.22092/vj.2017.109865 شماره ۱۱۶ پاییز ۱۳۹۶

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی اثرعصاره آبی آلوئه‌ورا لیتورالیس بر روی خواص بیوشیمیایی و ساختار سلولی اشرشیا کلی مقاوم به دارو (ESBL) با کمک میکروسکوپ الکترونی

• سمیرا تاج دولتی
دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامي، واحد اراک، اراک، ایران
• محمد ارجمندزادگان (نویسنده مسئول)
مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گروه میکروبشناسی ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک ، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۳-۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۶-۰۶
Email: arjomandzadegan@arakmu.ac.ir

چکیده

گیاهان دارویي و مشتقات حاصل از آن‌ها جهت مقابله با مقاومت دارویي به‌خوبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این تحقیق خواص بیوشیمیایی و ساختار سلولی *اشرشیا کلی* مقاوم به دارو (ESBL) پس از تاثیر عصاره آلوئه‌ورا روی آن به کمک میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرارگرفت. عصاره آبي آلوئه‌ورا با کمک روش تقطیر تهیه و با روش میکروپلیت دایلوشن، کمترین غلظت بازدارنده از رشد (MIC) روی *اشرشیا کلی* مقاوم به دارو تعیین گردید. اثر عصاره روی خواص بیوشیمیایی باکتری با استفاده از محیط کشت‌های مختلف و تست‌هاي بیوشیمیایی انجام شد. ارزیابی تغییرات ساختاری *اشرشیا کلی* مقاوم به دارو در قیاس با شاهد، درغلظت‌های متوالی عصاره با استفاده از میکروسکوپ نوری، غربال‌گری شد و اولین غلظت تغییر دهنده ساختار تعیین گردید. سپس در این غلظت، ساختار دقیق *اشرشیا کلی* مقاوم به دارو و سویه حساس در معرض عصاره در مقایسه با شاهد، با کمک میکروسکوپ الکترونی گذاره با روش‌های مقطع‌گیری و رنگ‌آمیزی منفی بررسی شد. MIC معادل ۰/۰۰۴ میکروگرم بر لیترعصاره آبی برای *اشرشیا کلی* مقاوم به دارو تعیین گردید. درغلظت کمتراز MIC، تا ۳۰ دقیقه پس ازترکیب عصاره با باکتری نتایج کلیه تست‌های بیوشیمیایی بدون تغییربود. پس از این زمان، واکنش باکتری درمعرض عصاره به آزمایشات بیوشیمیایی، تغییر یافته و تست‌های سیترات، اندول، حرکت و OF، منفی و محیط TSI بدون تولید گاز و قلیایی/قلیایی گردید. نتایج میکروسکوپ نوری نشان داد که عصاره باعث کاهش اندازه، کوکوباسیل شدن باکتری، تغییر در رنگ پذیري ونیز انهدام باکتری شده است. مقایسه سلول‌های مقاوم و حساس در معرض عصاره در رنگ‌آمیزی منفی میکروسکوپ الکترونی، تغییر در ابعاد، تجمعات وتقسیمات نامتقارن به فرم جوانه‌زنی را نشان داد. تصاویر حاصل از مقطع‌گیری، بیانگر تاثیر عصاره در ابعاد باکتری مقاوم به میزان حدود دو برابر حساس، ضخامت بیشتر دیواره باکتری مقاوم نسبت به حساس، اضمحلال دیواره و تغییر فرم سلول بود که در باکتری مقاوم شاهد (عدم مواجهه با عصاره) مشاهده نگردید. در این تحقیق نحوه تاثیرگذاری یک عصاره گیاهی روی باکتری‌های مقاوم به دارو درقیاس با شاهد تعیین گردید. عصاره آبي *آلوئه‌ورا لیتورالیس* باعث تغییرخواص بیوشیمیایی و ساختارسلولی *اشرشیا کلی* مقاوم به دارو درمقایسه با شاهد می‌گردد.

کلمات کلیدی: عصاره آلوئه‌ورا، *اشرشیا کلی*، خواص بیوشیمیایی، ساختار سلولی، میکروسکوپ الکترونی

● Veterinary Researches & Biological Products No 116 pp: 43-52

Study on Effects of *Aloe vera littoralis* Aqueous Extract on Biochemical Properties and Cellular Structure of ESBL *E. coli* by Transmission Electron Microscopy

By: Tajdolati, S., Department of Basic Sciences, Islamic Azad University, Arak, Iran. Arjomandzadegan, M., (Corresponding Author) Infectious Diseases Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Received: 2016-06-14 Accepted: 2016-08-27

Email: arjomandzadegan@arakmu.ac.ir

Due to inappropriate use of antibiotics, the bacterial species have become resistant to antimicrobial medicines and treatments to health problems. Medicinal plants and derivatives are a good source for treatment and are effective against drug resistance. In this study, the effect of *Aloe vera* on biochemical properties and cell structure of drug-resistant *E. coli* was studied by electron microscopy. *Aloe vera* aqueous extract was produced by distillation method and the minimum growth inhibitory concentration (MIC) was determined by diffusion disk method and dilution microplate for drug-resistant *E. coli*. The effect of extract on biochemical properties of bacterial cultures was analyzed using blood agar, eosin methylene blue (EMB), biochemical tests IMVIC, citrate test, SIM test and urease test. The possible change in cell structure compared with control, was assessed in consecutive extract concentrations using scanning optical microscopy, and the first concentration altering the structure was determined. At this concentration, the exact structure of drug-resistant and sensitive *E. coli* strains was studied using TEM, negative staining and section methods. Kirby-Bauer method results demonstrated that drug-resistant E. coli (ESBL) was resistant to the studied antibiotics. MIC of 4 mg of drug-resistant *E. coli* was determined. At this concentration, up to 30 minutes of combination of extract and bacteria, the results of all biochemical tests were unchanged. After this time, tests of citrate, indole, mobility and OF were negative and TSI was without gas production and alk/alk. Optical microscopy results showed that the extract can destroy, reduce size and assembly of bacteria, induce to form cocobacilli and change the staining. Comparison of stained-resistant isolates and negative control samples in electron microscopy indicated the visibility of the bacterial assembly and asymmetric divisions from the cell pole. The results of two different morphology in cross-section of Escherichia showed an ordinary and dull form that is larger and has a thickness of 2.3nm.. The aqueous extract prepared from the plant Aloe vera, had an equivalent effect to or a better effect than the commonly used antibiotics on bacteria isolated from patients with infectious matters. Therefore, appropriate drugs made of plants may be used to treat resistant infections..

Keywords: *Aloe vera* extract, *E. coli*, Biochemical Properties, Cell Structure, Electron Microscopy

مقدمه

ساخت داروهایی که از عفونت‌های میکروبی پیشگیری نموده یا آن‌ها را درمان می‌کنند، یکی از پیشرفت‌های اصلی در زمینه بهبود کمیت و کیفیت زندگی در سال‌های اخیر است. داروهای ضدمیکروبی از پر مصرف‌ترین انواع داروها هستند که در صورت استفاده صحیح از آن‌ها نجات بخش خواهند بود و در عین حال استفاده نادرست و نابجای آن‌ها باعث افزایش هزینه، عوارض و تداخلات دارویی بسیار، مقاومت دارویی و بی ارزش شدن این داروهای با ارزش می‌گردد. پدیده بروز "مقاومت دارویی" مدت‌ها است که توجه دانشمندان و محافل علمی را به خود جلب کرده است (۱).

گزارشات جدیدی مکررا از بروز مقاومت دارویی آنتی بیوتیک‌ها منتشر می‌گردد. علی‌رغم این که آنتی‌بیوتیک‌ها زندگی انسان‌ها و دام‌های بی‌شماری را تاکنون نجات داده‌اند (۲)، استفاده از گیاهان دارویی از قدیم مورد توجه بوده و با توجه به خالص شدن و تفکیک مواد موثره موجود در گیاه در عصاره حاصل از آن و تاثیر بیشتر نسبت به مواد خالص شده از گیاه، استفاده از آن مطلوب شده است (۳). ایران به دلیل داشتن شرایط آب و هوايي و طبیعت متنوع، داراي منابع غني و با ارزش گیاهان دارويي است. یکی از این گیاهان دارویی آلوئه‌ورا می‌باشد. گیاه آلوئه‌ورا (صبر زرد) (*Aloe vera littoralis*) از خانواده Liliaceae و بومي مناطق گرمسيري است (۴). اين گياه ژل داخلي بی رنگي در برگ‌هاي خود دارد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عصاره آبي و الكلي آلوئه‌ورا خاصیت ضد قارچي و ضد باكتريايي دارند. اثرات ضد باكتريايي آن بیشتر به ژل داخلي اين گياه مربوط مي‌شود (۵).

باكتري‌هاي مختلفي باعث عفونت در سيستم ادراري مي‌شوند. این ارگانیسم‌ها در روده، نواحي مقعد و پرينه ساكن هستند. *اشرشیا کولی*

(۸۰ درصد موارد)، پروتئوس، سودوموناس، کلبسیلا، *استافیلوکوک آرئوس*، هموفیلوس و استافیلوکوک کوآگولاز منفي از عوامل این عفونت‌ها محسوب مي‌گردند. این باکتري‌ها به سرعت نسبت به آنتي‌بیوتیک‌ها مقاوم شده و مي‌توانند به صورت هم‌زمان به چندین آنتي‌بیوتیک مقاومت داشته باشند (۶). هدف از این مطالعه، تعیین اثرعصاره گیاه آلوئه‌ورا بر روی باکتري اشرشیاکلی مقاوم به دارو (ESBL) و بررسی ساختار سلولی باکتری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری

گیاهان به صورت تازه از مزرعه گیاهان دارویی تهیه شده و چند بار با آب شستشو داده شدند. سپس در محلی تاریک طی چند روز خشک و وسیله دستگاه خردکن، آسیاب گردیدند. عصاره‌گیری از مقدار ۲۰۰ گرم از مواد آسیاب شده به همراه ۵۰۰ سي‌سي آب معمولي با دستگاه رفلاکس به مدت هشت ساعت در دمای جوش به روش تقطیر انجام شد (۷).

سویه مورد استفاده

سویه کلینیکی مقاوم به داروی *اشرشیا کلی* جدا شده از بیماران از بخش میکروبی مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک اخذ و به کمک روش‌هاي میکروسکوپی و بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند. بدین منظور از محیط‌هاي کشت بلادآگار، (EMB) ائوزین متیلن بلو، تست‌هاي بیوشیمیایی IMVIC، تست سیترات، تست SIM و تست اوره استفاده شد.

آنتی‌بیوگرام

الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در این سویه با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (کربی- بائر) مطابق با معیارهای موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI) تعیین گردید. دیسک‌ها محصول شرکت MAST (انگلستان) و شامل سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفوکسیتین، سفپیم، سفتریاکسون، آموکسی کلاو، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، تتراسایکلین، تری متوپریم-سولفامتوکسازول (کوتریموکسازول)، نیتروفورانتوئین، ایمیپنم و کلرامفنیکل بودند (۹).

روش دیسک دیفیوژن
(Disk Agar Diffusion)

حساسیت باکتري مورد مطالعه به عصاره‌هاي گیاهی با روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرارگرفت. سوسپانسیون باکتري معادل غلظت نیم مکفارلند استاندارد از کلنی‌هاي ۲۴ ساعته باکتري روي محیط بلاد آگار با استفاده از سرم فیزیولوژي استریل تهیه گردید. از سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مکفارلند،کشت به صورت سفره‌اي روي محیط مولر هینتون آگار انجام شده و ۲۰ میکرو لیتر عصاره گیاهی از هر کدام از غلظت‌های۴۰، ۸۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵ و ۰/۳۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دیسک‌های بلانک روی محیط کشت اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار داده شده و قطر هاله عدم رشد باکتري به میلی‌متر اندازه‌گیري گردید (۱۱).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی
MIC (Minimum Inhibitory Concentrateo)

حداقل غلظت مهارکنندگی با کمک روش میکرو براث دایلوشن (Micro Broth Dilution) در پلیت‌هاي ۹۶ خانه استریل تعیین شد. بدین منظور از محیط کشت مولر هینتون براث محتوی معادل نیم مک فارلند از باکتری مورد مطالعه، ۱۰۰ میکرولیتر داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر عصاره ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. بدین ترتیب غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. سپس از خانه دوم به سوم و به همین ترتیب تا خانه نهم رقت متوالی انجام شد. بعداز ۱۸ ساعت انکوباسیون در دماي ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میکروپلیت‌ها با کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شدند. وجود کدورت نشان‌دهنده رشد یا عدم رشد باکتري بود. غلظت موجود در یک چاهک قبل ازچاهک دارای تغییر جهشی کدورت، به عنوان MIC تعیین گردید (۹).

بررسي خواص بیوشیمیایی باکتري‌هاي تحت تاثیر عصاره

برای بررسی اثرات عصاره آلوئه‌ورا بر روی خواص بیوشیمیایی باکتری و مقایسه بین تعداد باکتری‌های مقاوم در معرض عصاره، در زمان‌های صفر، ۰/۵، یک ، دو، سه، چهار، پنج، هفت و ۲۴ ساعت بعد از اضافه کردن عصاره، باکتری در محیط‌های افتراقی سیمون سیترات، SIM ،TSI وOF بلادآگار، ائوزین متیلن بلو (EMB) و اوره کشت داده شد. باکتری شاهد به همین روش بدون عصاره در محیط‌های کشت ذکر شده کشت داده شد و بررسی مقایسه‌ای باکتری شاهد و توانایی رشد آن بر روی محیط‌های EMB و TSI، توانایی تولید گاز، توانایی تجزیه تریپتوفان، توانایی حرکت در محیط SIM و همچنین توانایی تولید اسید با باکتری‌های حساس و مقاوم در معرض عصاره انجام گردید (۱۰).

بررسی ساختار سلولی باکتری مقاوم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

بدین منظور در غلظت تعیین شده از باکتری و عصاره مجددا آزمایش تکرار شد و هفت ساعت پس از مجاور بودن باکتری با عصاره، نمونه با سرعت ۲۰۰۰ دور بر ثانیه به مدت چهار دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل از سانتریفوژ از محلول رویی آن جدا گردید و با استفاده از سرم فیزیولوژی و آب مقطر با نسبت مساوی۵۰:۵۰ سی سی شسته شد. مجددا نمونه سانتریفوژ و محلول رویی آن دور ریخته شد. رسوب حاصله در بافر تثبیت‌کننده گلوتر آلدئید ۲/۵ درصد و طی مدت زمان ۲۴ ساعت جهت آماده‌سازی (Sample Preparation) به مرکز تحقیقات بیوشیمی- بیوفیزیک دانشگاه تهران ارسال گردید (۱۲). سپس نمونه با بافرهای کاکودیلات سدیم و تتراکسیدآزمیوم مورد تثبیت مجدد قرار گرفت (آبگیری نمونه در الکل با درجات افزایشی ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ (در الکل خالص سه بار) انجام گردید). پس از آن نمونه در پروپیلن اکساید به عنوان حلال حد واسط بین الکل و رزین، سه بار و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. نمونه در مخلوط رزین و پروپیلن اکساید با نسبت‌های مختلف گذاشته شد که نسبت‌ها به صورت زیر است: ابتدا با نسبت یک به سه رزین و پروپیلن اکساید، سپس با نسبت یک به یک و در

نهایت نسبت سه به یک (هرکدام به مدت دو تا سه ساعت). نمونه جهت پلیمریزه شدن در آون ۶۰ درجه به مدت دو الی سه روز قالب‌گیری شد و با استفاده از دستگاه اولترامیکروتوم برش‌گیری شد. برش‌ها روی گرید مسی آغشته به فرم وار کربن جهت محافظت از آسیب‌های احتمالی نمونه مانند ضربه خوردن و شکسته شدن قرار داده شد. با استات یورانیل یک درصد و سیترات سرب جهت ایجاد کنتراست مطلوب رنگ‌آمیزی انجام شد و در آخر نمونه خشک گردید. در مرحله آماده‌سازي، نمونه برای دو منظور آماده شد:

۱- آماده‌سازي جهت رنگ‌آمیزی منفي که در آن ساختار سلولی کلي باکتري مشاهده شد.

۲- روش مقطع‌گيري: در این روش با کمک سایر بافرها مانند کاکودیلات سدیم فرایند تثبیت تکمیل شد. نمونه وارد رزین شد و بعد از محکم شدن مقطع‌گیری گردید. این کار با کمک اولترامیکروتوم انجام شد. نهایتا مقطع‌ها روی گرید قرارداده و با میکروسکوپ الکترونی گذاره TEM دیده شد (۷).

نتایج

نتایج آنتی‌بیوگرام

بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله اشرشیا کلی مربوط به آنتی بیوتیک‌های کوتریموکسازول (۸۸ درصد) دسفتریاکسون (۷۶ درصد)، آموکسی کلاو (۷۴ درصد)، سفتازیدیم (۷۲ درصد) و سفوتاکسیم (۷۲ درصد) بود. ایزوله اشرشیا کلی نسبت به ایمیپنم حساسیت نشان داد (۶).

نتایج دیسک دیفیوژن

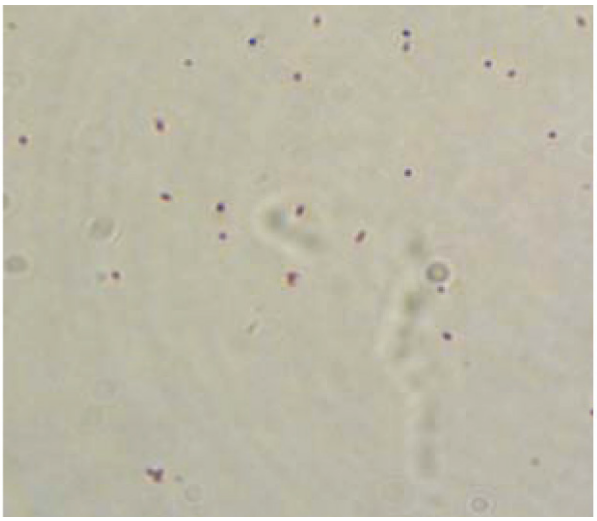
در باکتری *اشرشیا کلی* مقاوم به دارو هاله عدم رشد مشاهده نشد.

نتایج میکروپلیت دایلوشن

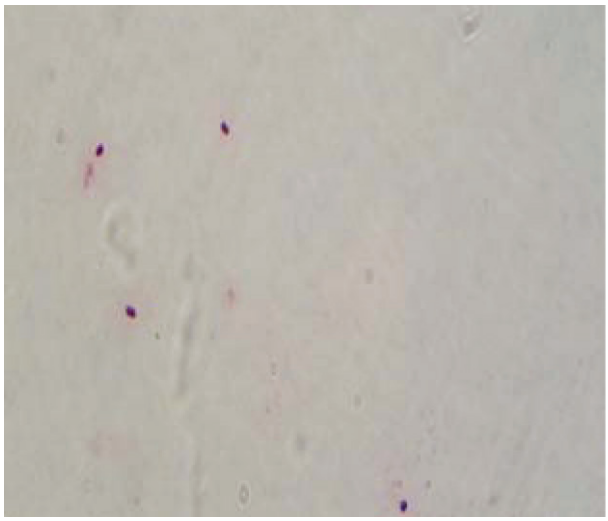
در روش میکروپلیت دایلوشن برای *اشرشیا کلی* مقاوم به دارو غلظت چهار میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان MIC تعیین شد.

بررسی ساختار سلولی

نتایج حاصل از کشت وتست‌های بیوشیمیایی باکتری *اشرشیا کلی*

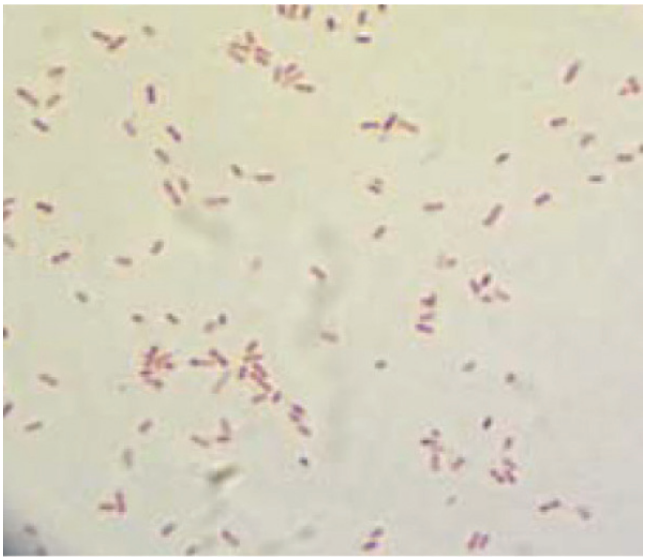


باکتری شاهد

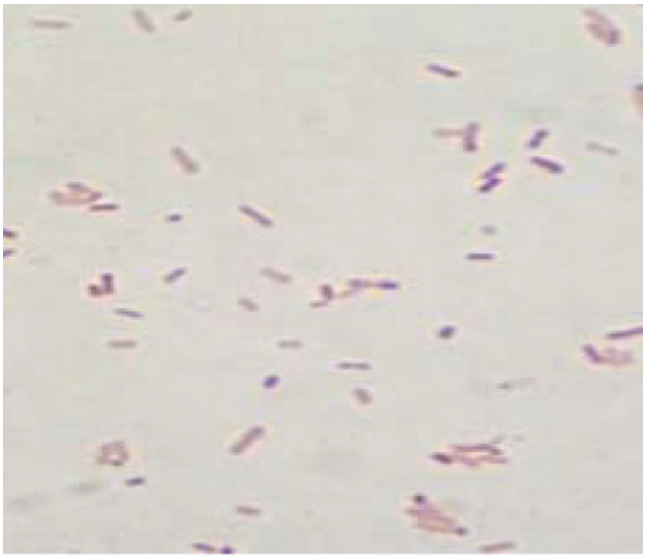


باکتری در معرض عصاره

شکل۱- نتایج حاصل از بررسی ساختار سلولی سلول باکتری مقاوم که در زمان اول (نیم ساعت) در معرض عصاره آلوئه ورا قرار گرفته و باکتری شاهد که حالت مقایسه ای دارد. عصاره موجب کاهش تجمع سلولهای باکتری شده است. (بزرگنمایی۱۰۰×)



باکتری شاهد



باکتری در معرض عصاره

شکل۲- نتایج حاصل از بررسی ساختار سلولی باکتری مقاوم که در معرض عصاره قرار گرفته و باکتری شاهد در مدت زمان آخر (۴۲ ساعت). عصاره *آلوئه ورا* موجب افزایش حالت کوکوباسیل، افزایش انهدام و تغییر در خصوصیات رنگ پذیری باکتری شده است (بزرگنمایی۱۰۰×).

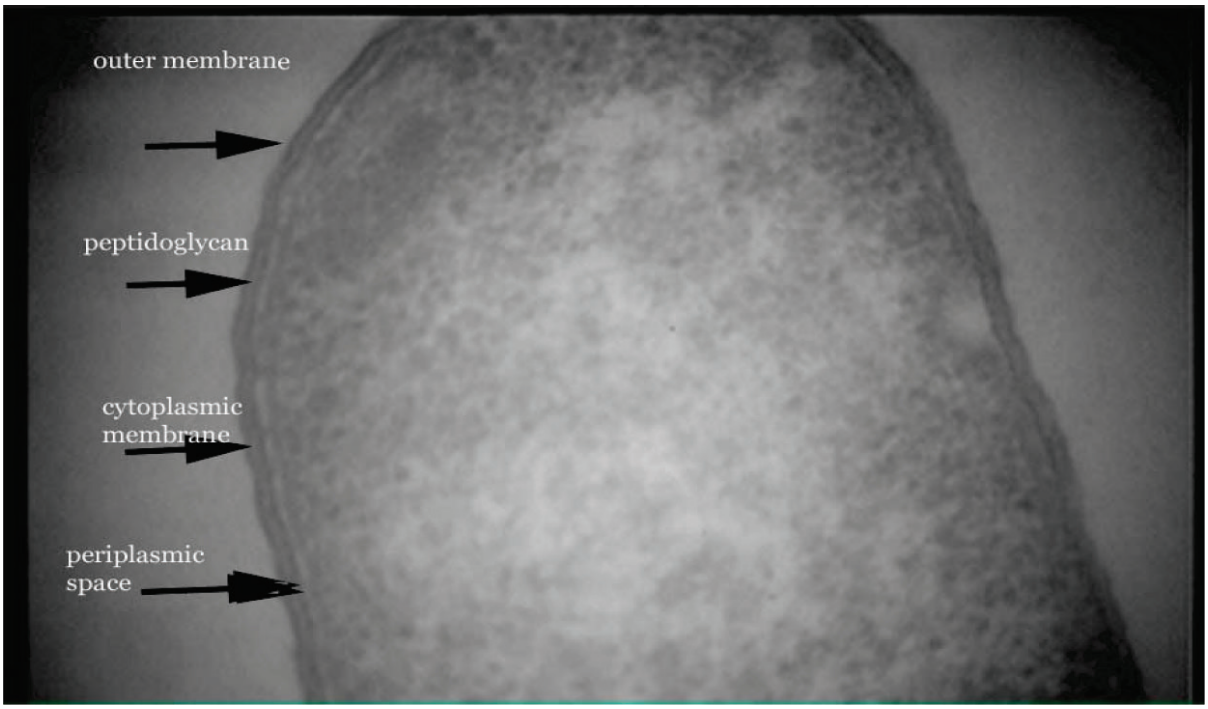
مقاوم به دارو *(ESBL)* اثبات نمود که تا ۳۰ دقیقه پس از ترکیب عصاره با باکتری، نتایج کلیه تست‌های بیوشیمیایی مثبت بوده ولی پس از این زمان کلیه تست‌های سیترات، TSI: قلیایی/قلیایی بدون تولید گاز، OF، اندول و تحرک منفی شدند (۵). نتایج حاصل از بررسی ساختار سلولی سلول باکتری در معرض عصاره قرار گرفته و شاهد در زمان‌های مختلف نشان داد که با افزایش زمان، عصاره موجب افزایش حالت کوکوباسیل، افزایش انهدام و تغییر در خصوصیات رنگ‌پذیری باکتری شد. اثر عصاره آبی آلوئه‌ورا روی ساختار سلولی باکتری *اشرشیا کلی* مقاوم در مقایسه با نمونه شاهد با کمک لام رنگ‌آمیزی شده گرم نیز همین نتیجه را اثبات نمود.

نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی

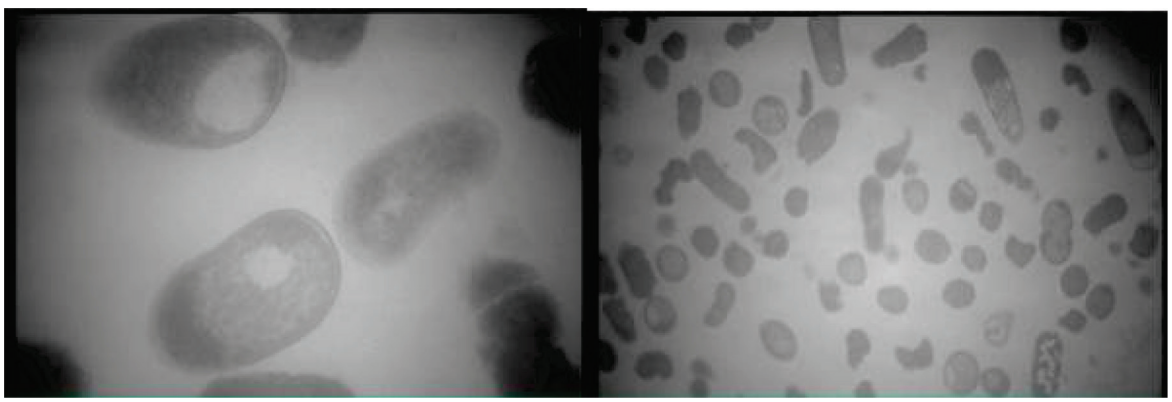
مشاهده مقطع‌گیری ESBL در معرض عصاره

باکتری تغییر ماهیت و تغییر ساختار سلولی داده و دیواره سلولی ضخیم شده بود. مواردی از انهدام و اضمحلال باکتری مشاهده گردید. DNA در سطح سلول پخش شده و پروتئین و اسید نوکلئیک باکتری در حال تقسیم بودند. ساختار مورئین در برخی موارد از حالت محکم و غیر قابل انعطاف به حالت مضرس و قابل انعطاف تبدیل شده بود. باکتری از حالت میله‌ای ساده به شکل‌های دمبلی (۱۰ درصد)، متورم (۳۰ درصد)، بسیار طویل (۲۰درصد)، بیضی شکل (۳۵ درصد) و اشکال دیگر تغییر کرده بود. ضخامت دیواره در مواردی که هنوز پپتیدوگلایکان سالم بود تغییری پیدا نکرده بود. لازم به ذکر است در مواردی پپتیدوگلایکان به حالت مضرس و قطعه‌قطعه درآمده و احتمالا ساختار تقسیم باکتری از حالت تشکیل سپتوم تغییر کرده بود. جدا شدن سلول دختری از مادری اولا به صورت نامتناسب (غیر هم اندازه) بود، ثانیا ساختار به گونه‌ای بین حالت جوانه‌زدن و تقسیم دوتایی معمولی بود. ضخامت دیواره در همه جا قابل مشاهده بود. انهدام باکتری بعد از حجیم شدن و نیز تغییر ساختار سلولی به کرات مشاهده شد. همان موادی که در سیتوپلاسم قبل از انهدام قابل مشاهده بود، بلافاصله بعد از انهدام بصورت آزاد مشاهده شد.

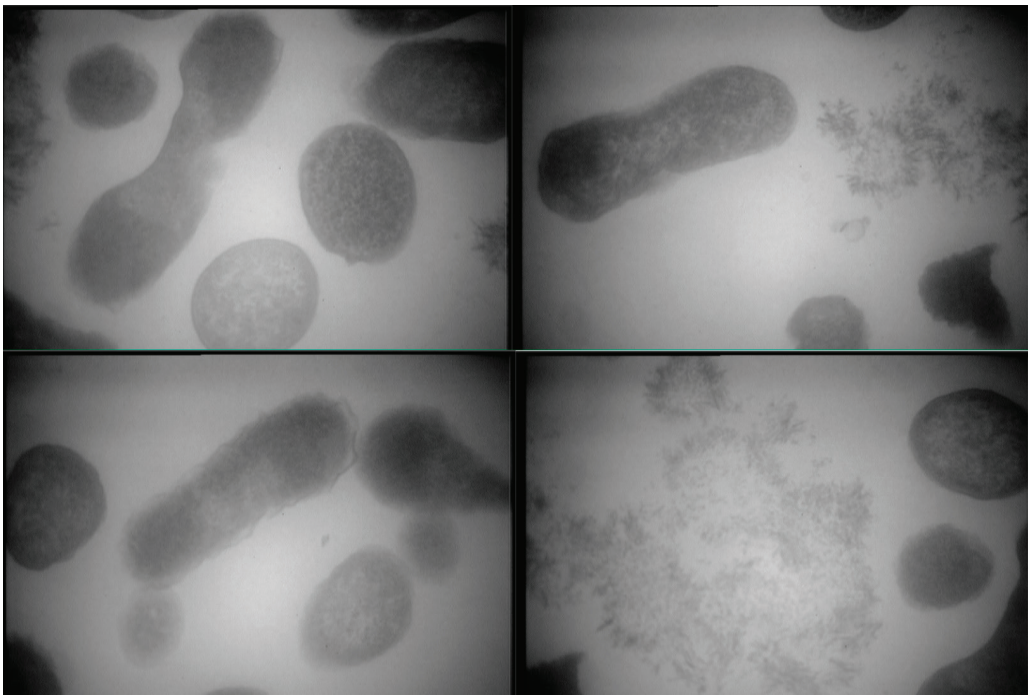
در باکتری مقاوم بدون عصاره تقسیم به‌صورت معمول صورت پذیرفت. اضمحلال یا کوچک شدن دیواره مشاهده نشد، اما مواردی از بزرگ‌شدن سلول تا حدودی قابل مشاهده بود (در حد پنج تا ۱۰ درصد). مقایسه ESBL بدون عصاره و به عنوان شاهد با ESBL در معرض عصاره قرار گرفته نشان داد که هیچ‌کدام از موارد فوق‌الذکر از جمله تقسیم‌های نامتناسب به فرم جوانه‌زنی، تورم بیش از حد باکتری، فرم تکثیری نامتناسب درون سیتوپلاسمی، ضخامت بیش از حد دیواره سلولی، ساختار سلولی تجزیه شده، باکتری بسیار طویل، باکتری منهدم شده و دیواره مضمحل شده مشاهده نشد. نحوه تخریب یا به‌صورت انفجاری است یا اضمحلالی که در عکس‌ها با بزرگنمایی کم قابل مشاهده است. پوشش باکتری در ESBL شاهد که در معرض عصاره قرار نگرفته



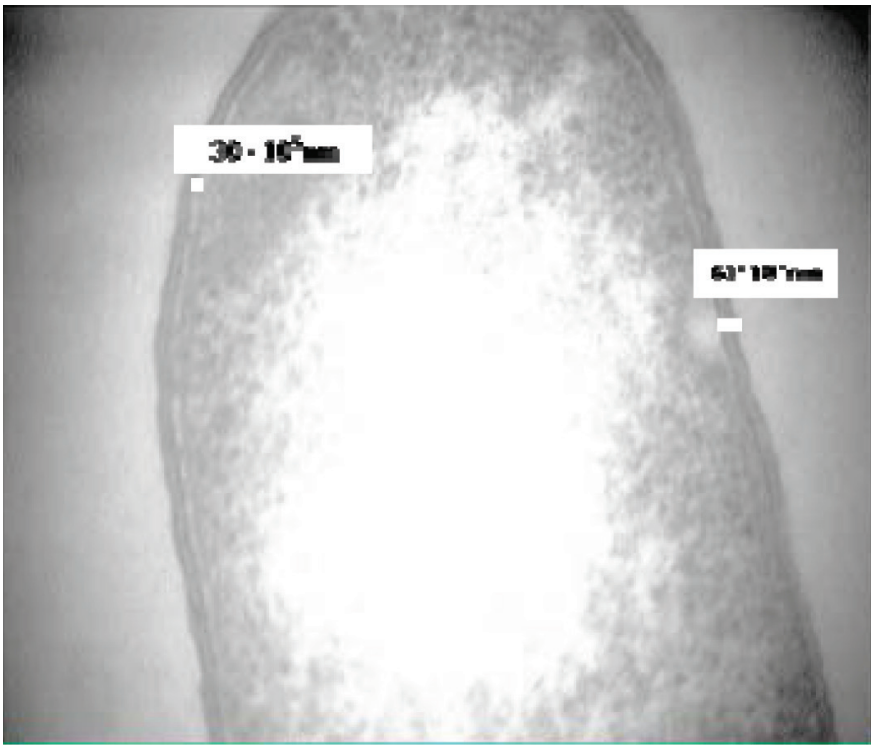
شکل۳- مقطع گیری و مشاهده لایه های مختلف غشا خارجی، لایه پپتیدوگلایکان، غشا سیتوپلاسمی باکتری
و فضای پری پلاسمیک و ضخامت دیواره سلولی
(بزرگنمایی ۴۰۰۰۰)



شکل۴- شمای کلی مقطع گیری از تجمعات باکتری ESBL در معرض عصاره با بزرگنمایی (۸۰۰۰ برابر)



شکل۵- مشاهده باکتری تغییر ساختار سلولی داده مقاوم در معرض عصاره: ساختار مورئین در برخی موارد از حالت محکم و غیر قابل انعطاف به حالت مضرس و قابل انعطاف تبدیل شده بود. باکتری از حالت میله ای ساده به فرم دمبلی و متورم تغییر کرد. انهدام باکتری بعد از حجیم شدن مشاهده شد. همان موادی که در سیتوپلاسم قبل از انهدام قابل مشاهده بود، بلافاصله بعد از انهدام بصورت آزاد مشاهده شد (بزرگنمایی ۱۶۰۰۰, ۵۰۰۰۰)



شکل۶- مقطع گیری و مشاهده لایه های مختلف غشا خارجی، لایه پپتید وگلایکان، غشا سیتوپلاسمی باکتری و فضای پری پلاسمیک و ضخامت دیواره سلولی (بزرگنمایی ۴۰۰۰۰)

بود، کمی ضخیم‌تر بود. فرم مضمحل شده باکتری در ESBL بیشتر دیده شد (۷۰ درصد) و پدیده پلاسمولیز در ESBL کمتر مشاهده شد.

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی منفی باکتری ESBL در معرض عصاره

تجمعات باکتریایی مشهود بود. تقسیم‌ها نامتقارن و از کنار قطب صورت گرفته بود. دو نوع مورفولوژی متفاوت هم در رنگ‌آمیزی منفی و هم در مقطع گیری در ESBL مشاهده شد: فرمی از باکتری با ظاهری شبیه اشرشیای معمولی و کدر، و فرمی از باکتری که بزرگ‌تر و دارای ضخامت۲/۳ نانومتر و طول حداقل دو برابر بود.

بحث

در این تحقیق اثر یک عصاره گیاهی روی باکتری مقاوم به دارو بررسی شد. تاکنون در تحقیقات مختلف، اثر عصاره‌ها، صرفا در کنترل رشد باکتری‌ها (عمدتا سویه‌های استاندارد) مورد ارزیابی قرار گرفته است. در مقاله حاضر، نحوه تاثیر عصاره آبی *آلوئه ورا* روی خواص بیوشیمیایی سویه ESBL *اشرشیا کلی*، تعیین و نیز محل و نحوه تخریب سلولی با کمک میکروسکوپ الکترونی اثبات گردید.

پدیده مقاومت دارویی با مصرف غیر اصولی آنتی‌بیوتیک‌ها در جوامع انسانی ایجاد شده و به صور مختلف مشاهده می‌شود. خانواده انتروباکتریاسه به خصوص *اشرشیا کلی* مقاومت زیادی به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این ارگانیسم‌ها با سرعت زیادی در حال افزایش است. در حقیقت، سرعت ایجاد مقاومت در انتروباکتریاسه‌ها به آنتی بیوتیک‌های جدید سریع‌تر از سرعت ایجاد و تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید می‌باشد (۸).

با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها به انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، تلاش برای استفاده از ترکیبات موجود در گیاهان برای درمان عفونت‌های مختلف افزایش یافته است. در مورد بررسي اثر ضد میکروبي گیاهان دارويي، در کشور ما و در بسياري از کشورهاي جهان مطالعات زیاد و گسترده‌اي انجام گرفته است که این تحقیقات بر روي میکروارگانیسم‌هاي مختلف صورت گرفته است. مطالعات فوق اثرات ضد میکروبي گیاه مورد بررسي در این تحقیق را بر اساس نتایج بدست آمده از هاله ممانعت از رشد تائید کرده است (۱۰).

در ایران با وجود مطالعات متنوع در زمینه خواص مختلف آلوئه‌ورا، مطالعات محدودي در زمینه خواص ضد میکروبی این گیاه روي باکتري‌هاي کلینیکی انجام شده است (۱۳). در مطالعه حاضر، اثر ضد میکروبی عصاره آبی *آلوئه ورا ليتورواليس* و تشابه اثر عصاره *آلوئه ورا* با هاله تشکیل شده توسط دیسک‌هاي آنتی‌بیوتیک در غلظت مشابه، نشان داده شد.

اشرشیا کلی می‌تواند به عنوان عامل بیماری‌زای اصلي و یا فرصت طلب، بیماري ایجاد کرده و نیز باگذشت زمان به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم گردد. لذا بررسی‌ها براي بدست آوردن مواد ضد میکروبي ارزشمند و طبیعي مانند گیاه آلوئه‌ورا امري ضروري به نظر می‌رسد. در این تحقیق به واسطه وجود ترکیبات بیولوژیکي فعال گیاه *آلوئه ورا* و مواد مؤثره ضد باکتریایي، تأثیر ضد میکروبي عصاره آبي گیاه *آلوئه ورا* موردبررسي قرار گرفت.

آگاري و همکاران مطالعه مقایسه‌اي روي اثر لیف و ژل آلوئه‌ورا بر عوامل باکتریایی و قارچی مختلفی انجام دادند. در تحقیق ایشان، برگ گیاه روي هر دو میکروارگانیسم سودوموناس و *کاندیدا آلبیکانس* مؤثربود. آن‌ها با اثبات موثر بودن هر دو بخش گیاه توصیه نمودند که بهتر است از هر دو بخش لیف و برگ این گیاه استفاده شود. نتایج آگاری مشابه نتایج تحقیق حاضر بود (۴).

در ۲۰۱۲، آبراهام و همکاران، خواص ضد میکروبي عصاره *آلوئه ورا* بر استافیلوکوکوس اورئوس را ارزیابی نمودند. عصاره خام در نتیجه فشردن آن‌ها در غلظت‌هاي مختلف آماده گردید و کشت حاوي *استافیلوکوکوس اورئوس* براي مهار این ارگانیسم در شرایط آزمایشگاهي با روش انتشار در آگار بررسي شد. ارتباط معناداري بین غلظت و قطر هاله عدم رشد اثبات گردیده و مشخص شد این گیاه داراي خاصیت ضد میکروبي بر روي *استافیلوکوکوس اورئوس* مي‌باشد. آن‌ها نتیجه گرفتند که انجام مطالعات بیشتر سبب گسترش کاربرد این عصاره خواهد شد (۱۵).

خرم و همکاران در سال ۲۰۰۹ به مقایسه فعالیت ضد میکروبي ژل تازه، ژل محافظ، ژل خنک‌کننده و کرم آکنه *آلوئه ورا* در برابر تعدادي از میکروارگانیسم‌ها پرداختند. مشخص شد که ژل تازه و ژل محافظ داراي حداکثر قطر هاله مهارکننده در برابر باسیلوس سابتیلیس و ژل خنک کننده و کرم آکنه داراي حداکثر قطر هاله مهارکننده در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*/ ۳۰ نانومتر) بوده است. علاوه بر این، حداقل قطر هاله مهارکننده توسط هر چهار نوع ژل روي *آسپرژیلوس فیکوم* معادل هم بود (۱۶).

کارپاگام و همکاران در سال ۲۰۱۱ فعالیت ضد میکروبي عصاره‌هاي مختلف آلوئه‌ورا را با تعیین حداقل غلظت مهارکنندگي روی سویه‌هاي *اشرشیا کلي*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *باسیلوس سابتیلیس*، *کلبسیلا پنومونیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار دادند. تفاوت قابل توجهي در اثر مهارکنندگي در میان عصاره‌هاي مختلف مشاهده شد. نفت خام و عصاره آبي هیچگونه فعالیتي را در برابر باکتري‌ها از خود نشان ندادند. عصاره متانولي، اتانولي و عصاره استوني فعالیت ضد باکتریایي علیه *اشرشیا کلي* و *باسیلوس سابتیلیس* نشان داده و عصاره متانولي فعالیت ویژه‌ای علیه استافیلوکوکوس اورئوس داشت که ممکن است به علت تفاوت ماده مؤثره بین آن‌ها در عصاره‌هاي مختلف باشد (۱۷). در این تحقیق تاثیر نوع عصاره‌گیری در آثار ضد میکروبی آن اثبات گردید. همچنین اثبات شد که عصاره تهیه شده از برگ کامل، شامل ژله داخلی و لیف به صورت همراه، آثار ضد میکروبی مناسبی روي باکتري‌هاي کلینیکی دارد (۴).

جورج و همکاران اثر خمیر دندان آلوئه‌ورا بر باکتري‌هاي متنوع را مورد بررسی قرار دادند. نتیجه تحقیق اثر مناسب ژل خمیر دندان را روي این میکروب‌ها نشان داد (۱۴).

با توجه به نوین بودن بررسی‌های الکترونی این عصاره بر روی باکتری مورد نظر، نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره آبی *آلوئه ورا* دارای اثرات ویژه‌ای روی ساختار *اشرشیا کلی* است. همین مساله در خصوص تاثیر ویژه عصاره روی فیزیولوژی باکتری نشان داده شد. به طوری که مجاورت باکتری با عصاره آبی *آلوئه ورا* موجب از بین رفتن توانایی باکتری در مصرف تریپتوفان، گلوکز و لاکتوز، از بین رفتن توانایی

حرکت و ناتوانی در تولید اسید و گاز شد. همچنین عصاره آبی *آلوئه ورا* موجب کاهش قابل توجه تعداد سلول باکتری شد.

نتیجه‌گیری

این بررسی نشان داد که عصاره *آلوئه ورا* دارای اثرات ضد باکتریایی علیه باکتری *اشرشیا کلی* مقاوم به دارو است و می‌تواند باعث ایجاد تغییرات در ساختار سلولی و خواص بیوشیمیایی در این باکتری شود. همچنین در این بررسی تغییرات آشکاری در شکل باکتری شامل تغییر اندازه، افزایش شکل کوکوباسیل، کاهش رنگ‌پذیری، افزایش انهدام و کاهش تجمع باکتری نسبت به نمونه شاهد مشاهده گردید. مجاورت باکتری با عصاره آبی *آلوئه ورا* موجب از بین رفتن توانایی باکتری در مصرف تریپتوفان، گلوکز و لاکتوز، از بین رفتن توانایی حرکت و ناتوانی در تولید اسید و گاز شد. لذا با ساخت داروي مناسب با منشاء گیاهی می‌توان به درمان عفونت‌هاي مقاوم امیدوار بود. امید است که در آینده‌ای نزدیک تحقیقات جامع و کامل‌تری در ادامه این طرح انجام شود.

تشکر و قدردانی

این بررسی با کمک مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شده است. بدین‌وسیله ازکلیه همکاراني که در انجام این پژوهش ما را یاري نمودند سپاسگزاري و تشکر نموده، پیروزي و بهروزي هر چه بیشتر برایشان آرزو داریم.

منابع مورد استفاده

1- Saurina G1, Quale JM, Manikal VM, Oydna E, Landman D.(2000). Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brooklyn, NY:Epidemiology and relation to antibiotic usage patterns. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45:895-898.

2- T. Eric Blank, David W. Lacher, Isabel C.A. Scaletsky,.(2003). Enteropathogenic *Escherichia coli* O157 strains from Brazil. *Emerg. Infect. Dis*. 9(1):113-115.

3- Mahdi Kargaran ; Ali Reza Moradabadi; Mohammad Arjomandzadegan, Effects of the Aqueous Extract of Aloe vera on the Morphological and Physiological Properties of *E. coli,* Iranian Red Crescent Medical Journal. 19(2): e23896.

4- Sadrnia M, Arjomandzadegan M. Comparative Study on the Effects of Aloe Vera Extract in Clinical Strains of *Staphylococcus aureus,* Klebsiella, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* Compared to Antibiotics of Choice. *Arak Medical University Journal*. 2014; 17 (6) :39-46.

5- Arjomandzadegan M1, Emami N1, Habibi G, Anti-mycobacterial activity assessment of three ethnobotanically plants against *Mycobacterium tuberculosis*, An In vitro study, Int J Mycobacteriol. 2016 Dec;5 Suppl 1:S108-S109.

6- Chithra, P.; Sajithlal, G.B. and Chandrakasan, G. (1998d). In-

شکل۷- رنگ آمیزی منفی از باکتری مقاوم در معرض عصاره و مشاهده باسیلهای بلند تغییر ساختار سلولی داده (بزرگنمایی ۴۰۰۰)

fluence of *Aloe vera* on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 59(3): 195-201Monstein, A. et al.(2007). Multiplex PCR amplification assay for the detection of bla SHV,bla TEM,blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae.APMIS:1400-8.

7- Tasli ,H. Bahar, I.H.(2005). Molecular characterization of TEM and SHV derived Extended-Spectrum Beta- Lactamase in hospital based Enterobacteriaceae in Turkey. *Jpn. J. Infect Dis*. 58:162-167

8- Chithra, P.; Sajthlal, G.B. and Chandrakasan, G. (1998a). Influence of *Aloe vera* on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 181: 71-76.

9- Fit NI, Chirila F, Nadas G, Pall E, Muresan R. Comparative testing of antimicrobial activity of aqueous extracts of *Aloe vera* and *Lycium barbarium*. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Veterinary Medicine*. 2013; 70(1): 72-613.

10- Dababneh B.F. (2008). Antimicrobial activity of selected Jordanian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms. journal of Food, *Agriculture and Environment*, 6, (2)134-139.

11- Pandey R. and Mishra A. (2009). Antibacterial Activities of Crude Extract of *Aloe barbadensis* to Clinically Isolated Bacterial Pathogens, *Applied Biochemistry and Biotechnology,* 3,1, 1-6 .

12- Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Eighteenth Informational Supplement , M100, Appendix A. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - formerly NCCLS), Villanova, PA.

13- plasmid mediated antibiotic resistance with focus onextended spectrum β-lactamases Alma brolund (2013).

14- George D, Bhat SS, Antony B. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of *Aloe vera* tooth gel and two popular commercial toothpastes: An in vitro study. Gen Dent. 2009;57(3):238-41.

15- Abraham, O; Odiba, P; Achumu, L; UpuO; Yahaya, O; Miachi, O; and Ndubuisi, C (2012). Antimicrobial properties of *Aloe vera* juice on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Science and the Environment*, 3:1-4.

16- Khurram, S; Rauf, A; Shaista, N; SalmanS; and Zafar, I. (2009). Comparative antimicrobial activity of Aloe Vera gel onmicroorganisms of public health significance. *Pharmacology online*. 1:41423.

17- Karpagam, T; Aruna Devaraj, R. (2011) Studies on the Efficacy of *Aleo vera* on antimicrobial activity. IJRAP. 2(4):1286-1289.