

بهینه‌سازی فرایند جذب زیستی اورانیوم توسط زیست توده اتوکلاو شده باکتری میکروکوکوس لوتئوس با استفاده از روش سطح پاسخ

پریسا تاجر محمد قزوینی، زهرا شیر یکتا، شقایق نصر، نرگس اسلامی، منصوره السادات حسینی

بررسی فعالیت ضد میکروبی مشتقات جدید سیپروفلوکساسین

شقایق چخماقی، موج خالقی، حجت اله خباززاده

مقایسه ترکیبات شیمیایی، اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس و عصاره برگ چای سیاه و چای سبز *Camellia sinensis* بر باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی (زانتوموناس کامپستریس و سودوموناس سیرینگه) و بیماری‌زای انسانی (استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی)

مسعود حیدری زاده، فاطمه علیجانی، مراحم آشنکرف، سجاد آتشی

رفتار همنوع خواری سوسک زردآرد (*Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758) در شرایط آزمایشگاهی
رضیه رشیدی ایل ذوله، وحید اکملی

اثر تنش یخ‌زدگی بر برخی پاسخ‌های فیزیولوژیک و آنتی‌اکسیدانی گل‌های زینتی میمونی (*Antirrhinum majus*) و بنفشه (*Viola × wittrockiana*)
بهروز صالحی اسکندری، زهره نصیریان جزی، جلیل عباس‌پور

بررسی اثرات افزودن هم‌زمان آلfa توکوفرول (ویتامین E) و کربن نانوتیوب‌های چند دیواره عامل دار (MWCNT) بر خواص مکانیکی و زیست سازگاری ماتریس پلیمری پلی‌اتیلن با وزن مولکولی بسیار بالا (UHMWPE) باهدف کاربرد در تعویض مفاصل محسن فکوری، محمدتقی خراسانی، مهدی کمالی دولت‌آبادی

نقش تنظیم کننده‌های رشد در بهینه‌سازی تشکیل کالوس در گیاه دارویی ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.)
مهدی کاکایی، فاطمه حاج مرادی، محسن منصوری، محمدعلی ابراهیمی

تأثیر روش نگهداری محلول نایل رد بر شدت فلوروسانس در تشخیص لیپیدها
زهره نوروزی مطلق، محمود اخوان مهدوی، رضا قشلاقی

مقایسه فعالیت‌های زیستی جلبک‌های کلرلا و اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز آنزیمی
طیبه هادی توران پشته، فخری سادات حسینی، فاطمه صفاخواه

بررسی اثرات هم‌افزایی نانوذرات سریم اکسید و اوژنول بر بازیابی عملکرد نورون‌های حسی و حرکتی ناشی از کمپرس عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی
سهیلا عالی پور، فریبا محمودی، آرش عبدالملکی، خدیجه حقیقت

بسم الله الرحمن الرحيم
فصلنامه علمی مجله زیست‌شناسی کاربردی

تابستان ۱۴۰۲

صاحب امتیاز: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)
مدیر مسئول: دکتر مهوش سیفعلی، استادیار دانشگاه الزهرا (س)
سر دبیر: دکتر محمد رضا صعودی، استاد دانشگاه الزهرا (س)

اعضای هیأت تحریریه:

دکتر مهناز اقدسی، دانشیار دانشگاه گرگان
دکتر حمید اجتهادی، استاد دانشگاه فردوسی مشهد
دکتر نرگس حسینمردی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دکتر فرشاد درویشی، استاد دانشگاه الزهرا (س)
دکتر مرجان سیدی، دانشیار دانشگاه تهران
دکتر مسعود رنجبر، استاد دانشگاه بوعلی سینا
دکتر عذرا صبور، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)
دکتر احیا عبدی عالی، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)
دکتر پریناز قدم، دانشیار دانشگاه الزهرا (س)
دکتر زرین مینوچهر، دانشیار دانشگاه تهران
دکتر تورج ولی نسب پوری، استاد پژوهشی موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

اعضای هیأت تحریریه بین‌المللی:

دکتر حسین رجایی، استاد موزه تحقیقات جانورشناسی الکساندر کوپینگ آلمان
دکتر شهرام شهابی، استاد مدیر پژوهش کمپانی داروسازی هایلند و عضو هیأت علمی وابسته کالج پزشکی نچروپاتی ساوت وست ایالت متحده
مدیر اجرایی: شهربانو برجیان
ناشر: معاونت پژوهشی دانشگاه الزهرا (س)
ویراستار فارسی: خانم معصومه اصلان زاده
ویراستار انگلیسی: فاطمه صانعی کاشانی فر
چاپ و صحافی: انتشارات دانشگاه الزهرا (س)
ترتیب و انتشار: فصلنامه

این فصلنامه علمی - پژوهشی با مجوز شماره ۵۲۴۷۴ / ۸۹/۳/۱۱ - در تاریخ ۸۹/۹/۸ منتشر می‌گردد.

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی کاربردی با همکاری انجمن زیست‌شناسی ایران منتشر می‌شود .
این مجله در پایگاه استنادی علوم جهان اسلام نمایه می‌شود : www.isc.gov.ir

نشانی: تهران، ونک، ده ونک، دانشگاه الزهرا (س) معاونت پژوهشی، کدپستی ۱۹۹۳۸۹۱۱۷۶. تلفن و نمابر: ۸۵۶۹۲۲۰۵

شاپا: ۹۸۸۴-۱۶۰۷

Website: <http://journals.alzahra.ac.ir/jab>

Email: japplbiol@alzahra.ac.ir

وضعیت اعمال موارد:

محققان با رعایت سلامت و اصالت کامل نویسندگی در چهارچوب های اخلاق حرفه ای، مقالات علمی-پژوهشی خود را براساس نکات زیر تدوین و ارائه نمایند.

تعهدات:

- فقط در صورت هیأت علمی بودن (مربی پژوهشی، استادیار، دانشیار و استاد) اقدام به ارسال مقاله فرمایید.
- نشریه زیست‌شناسی کاربردی در برابر مقاله‌های ارسال شده از سوی سایر افراد (دانشجوی مقاطع تحصیلی مختلف) موظف به پاسخگویی، بررسی و پیگیری نخواهد بود.
- الزامیست نویسنده ی مسئول مقاله یکی از اعضای محترم هیئت علمی دانشگاه‌ها یا موسسات تحقیقاتی باشد. از این‌رو ایمیل نویسنده ی مسئول حتی الامکان یک ایمیل سازمانی باشد.
- در تکمیل فرم آنلاین مشخصات نویسندگان در سامانه دقت لازم به‌عمل آید. به هیچ عنوان در هیچ مرحله‌ای امکان تغییر ترتیب، تعداد، مرتبه علمی و مشخصات نویسندگان و نویسنده مسئول وجود ندارد.
- مقاله قبلاً به هیچ زبانی چاپ نشده باشد و به طور هم زمان نیز برای چاپ ارسال نگردیده باشد.
- تعهد نامه، مطابق فرمت مجله ارسال شود.
- چنانچه مقاله بخشی از پایان نامه ی دانشجویی است این موضوع در پاورقی صفحه اول با ذکر نام استاد(ان) راهنما و دانشگاه مربوطه قید شود.

نگارش:

- مقاله‌ها بایستی به زبان فارسی تهیه شوند و قواعد دستور زبان فارسی و رسا بودن جملات مورد توجه ویژه قرار گیرند.
- هر مقاله باید یک چکیده به زبان انگلیسی داشته باشد که همراه عنوان و واژه‌های کلیدی انگلیسی در انتهای مقاله آورده شود.
- مقاله کامل دارای عنوان فارسی، نام و آدرس نویسندگان، چکیده ی فارسی، واژه های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث، نتیجه گیری کلی، سپاسگزاری، منابع، عنوان، آدرس، چکیده و واژه‌های کلیدی انگلیسی می باشد.
- سپاسگزاری و اعلام عدم تعارض منافع هم باید در انتهای مقاله ارائه گردد.
- تمام نمودارها، نقشه‌ها و شکل‌ها رنگی باشند (سیاه و سفید نباشند). زیرنویس و توضیحات مربوط به شکل‌ها و جدول‌ها در مقاله‌های فارسی، به هر دو زبان فارسی و انگلیسی ذکر شوند. این قسمت با قلم B-Nazanin با اندازه فونت ۱۰ و انگلیسی با قلم Times New Roman و اندازه فونت ۱۰ آماده شود. بعد از واژه شکل از خط تیره و بعد از واژه Figure از نقطه استفاده شود. کلمات شکل تا آخر شماره به فارسی با خط تیره باید بولد باشد و به لاتین Figure باید بولد باشد.
- تمامی جداول و نوشته های روی شکل ها به انگلیسی تنظیم شوند.

مثال: شکل ۱- درصد حذف کنگو رد در محلول ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر رنگ با غلظت‌های مختلف نمک.

Figure 1. Congo red removal percentage at ۶۰۰ mg/l dye solution with different salt concentrations.

- تایپ مقاله با نرم افزار Microsoft Office Word 2007 باحاشیه ۲/۵ سانتی متری از چهار طرف و فاصله خطوط متن ۱/۵ (به جز جداول، شکل‌ها و بالانویس و زیرنویس آنها) تهیه و تمام صفحات آن پشت سر هم در پایین و وسط صفحه با فونت B Nazanin شماره گذاری شوند. در هر صفحه شماره خط نوشته شود.
- از درج پاورقی برای بیان توضیحات انگلیسی و فارسی و بالعکس خودداری شود و در صورت نیاز درون پرانتز و در مقاله آورده شود.
- همواره فونت فارسی B Nazanin و فونت انگلیسی Times New Roman با دو سایز کوچکتر باشد و جزئیات مطابق زیر رعایت شود:

- عنوان فارسی مقاله: وسط چین، Bold و ۱۴ و انگلیسی وسط چین، Bold و ۱۲ باشد.
- نام نگارندگان: وسط چین، Bold و ۱۱ باشد و با کاما از هم جدا شوند. انگلیسی هم همینطور ولی با فونت ۹ باشد. اعداد بالای اسم نویسندگان سمت چپ قرار گیرد و ستاره مشخص کننده نویسنده ی مسئول سمت راست آن عدد باشد. (Akbari^{1*})
- نشانی نگارندگان: وسط، نازک و با فونت ۱۱ برای فارسی و ۹ برای انگلیسی باشد. نشانی پست الکترونیک نویسنده مسئول ذکر گردد.
- چکیده باید شامل مقدمه، روش‌ها، نتیجه و بحث باشد. از این به بعد نویسندگان ملزم به رعایت چکیده های بخش بندی شده هستند.
- چکیده ی فارسی: فونت ۱۲ نازک و ایتالیک، در یک پاراگراف و حداقل ۱۵۰ کلمه باشد.
- واژگان کلیدی فارسی: Bold و ۱۲ و ایتالیک باشند و کلمات مشترک با عنوان نداشته باشند و به ترتیب حروف الفبا مرتب شوند.

- **متن فارسی:** اندازه فونت ۱۲ و در انگلیسی اندازه فونت ۱۰ باشد.
- **عناوین بخش های مختلف:** عناوین اصلی، درجه دو و سه Bold باشند. عنوان اصلی فارسی راست چین ۱۴ و انگلیسی چپ چین و ۱۲ باشند.
- پس از عناوین اصلی و درجه دوم دو نقطه استفاده نشود و ادامه متن از سطر جدید نوشته شود، ولی عناوین درجه سه با دو نقطه از مطلب جدا شود.
- **چکیده ی گسترده انگلیسی:** (مشاهده شیوه تنظیم چکیده گسترده انگلیسی)
 - **چکیده انگلیسی:** فونت ۱۰ نازک و در یک پاراگراف باشد.
 - **واژگان کلیدی انگلیسی:** فونت ۱۰ Bold باشند.
 - **شماره صفحه:** پایین وسط با فونت ۱۲ Nazanin B
- ابتدای هر پاراگراف ۱/۲۷ سانتی متر تورفتگی داشته باشد.
- برای نوشتن اسامی علمی تحت جنس (سرده) سیستم دونا می رعایت شود.
- در مقاله، علائم نگارشی مثل نقطه و غیره به کلمه قبلی چسبیده و از بعدی یک فاصله داشته باشد. از علامت % استفاده نشود، بلکه کلمه درصد نوشته شود (به استثنای جداول و اشکال).
- برای بیان مقادیر از سیستم متریک استفاده شود.
- جدول با سه خط افقی رسم شود (دو خط نشان دهنده سرتیتر جدول و خط آخر پایان دهنده جدول).
- فونت اعداد و متن داخل جداول و اشکال ۱۰ نازک و وسط چین باشد.
- اعداد حداکثر تا دو رقم اعشار نوشته شوند.
- عنوان جداول (در بالای جدول) و اشکال (در پایین شکل) و وسط چین با فونت ۱۱ Bold علائم اختصاری جداول و اشکال در پایین جدول یا شکل و با فونت ۸ نازک نوشته شوند

مرجع نویسی در متن:

- منابع درون متن شامل نام خانوادگی (بدون ذکر نام کوچک) نگارنده و سال انتشار باشد مانند (Goodman, 2003).
- **منابع با دو نگارنده:** نام خانوادگی آنها با علامت & از هم جدا و سپس سال انتشار ذکر شود (kells & Tharp, 2001).
- **منابع با بیش از دو نگارنده:** تنها نام خانوادگی نگارنده اول به همراه واژه *et al* (ایتالیک) و سپس سال انتشار ذکر شود (Fermands *et al*, 2001). در متن مقاله می توان به نام فارسی نگارنده اشاره کرد، اما بلافاصله در پرانتز باید نام خانوادگی آن به انگلیسی به همراه سال انتشار را نوشت. به عنوان مثال، پتراک (Petrak, 1953).

منابع:

- بخش منابع علمی تحت عنوان References قید و تماماً به صورت انگلیسی ذکر شوند. عبارت (In Persian) حتماً برای مقالات فارسی ذکر شود.
- بدون شماره بر حسب حروف الفبا تنظیم شوند و نیم سانتی متر تورفتگی داشته باشند.
- عنوان مجلات کامل نوشته شوند.
- برای استناد به مقاله هایی که هنوز چاپ نشده اند به جای ذکر سال از عبارت (in press) استفاده شود.
- تمامی منابع به زبان انگلیسی باشد.

نشریات:

الف) با یک نویسنده:

Wilson, R.G.J.(1981) Weed control in established dryland Alfalfa (Medicago sativa). Weed science, 29: 615-618.

ب) با دو نویسنده:

Pline, W.A. and Wilcut, J.W. (2007). Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and nonglyphosate-resistant cotton (Gossypium hirsutum L.). Journal of Agriculture Food and Chemistry, 50: 506-512.

ج) با بیش از دو نویسنده:

Arregi, M.C., Sanchez, D. and Scotta, R. (1998). Weed control in established Alfalfa (Medicago sativa) with posremergrnce herbicides. Weed Technology, 3: 424-428.

د) بهتر است سایت به عنوان مرجع مورد استفاده قرار نگیرد؛ ولی در صورت اضطرار حتماً تاریخ مشاهده و دسترسی ذکر شود.

کتاب:

الف) کتاب فارسی: نام خانوادگی، حرف اول نام (سال انتشار) نام کتاب، تعداد چاپ‌ها، ناشر، تعداد صفحات.

ب) کتاب انگلیسی: نام خانوادگی، حرف اول نام، (سال انتشار)، نام کتاب، تعداد چاپ‌ها، ناشر، تعداد صفحات و سپس PP که اولی با حرف بزرگ و دومی با حرف کوچک است و سپس شهر محل انتشار.

Ahrens, W.H. (1994). *Herbicide Handbook*, 7th edn. Champaign, IL: Weed Science Society of America 224 pp. losAngeles.

ج) در صورتی که کتاب دو یا بیش از دو نویسنده داشته باشد، طریقه نوشتن نویسندگان آن، مشابه نشریات خواهد بود.

- **مقاله ای در یک کتاب:** نام خانوادگی، حرف اول نام (ها) (سال انتشار) نام مقاله مورد نظر. تعداد صفحات مقاله، عنوان کتاب. ناشر (کلمات ناشر با حروف انگلیسی بزرگ).

Baver, L.D. and Gardner, W.H. (1972). Flow in stratified soil systems. Pages 343–345 in Baver LD, ed. *Soil Physics* New York: Academic Press.

- **خلاصه مقالات یا مقالات کامل ارائه شده در همایش‌های علمی:** نام خانوادگی، حرف اول نام، (سال انتشار)، عنوان مقاله، نام همایش و تاریخ برگزاری همایش (روز ماه، شهر، کشور).

Ghorbanli, M. and Najafpour, M. (2005). Effect of extracts of Persian and Berseem clover on –Peroxidase activity of field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.) hypocotyl. *Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy*, 21-26 August, Wagga Wagga, Australia.

- **گزارش علمی مستخرج از طرح تحقیقاتی:** نام خانوادگی، حرف اول نام، سال انتشار، عنوان پروژه تحقیقاتی. ذکر سالیانه یا نهایی بودن گزارش، نام موسسه ی تحقیقاتی، تعداد صفحات.

Shimi, P.(2003). *Management of Cynanchum acutum in apple orchard*. Final Report. Iranian Research Institute of Plant Protection PP25.

- **منابع بی نام:** بهتر است این منابع استفاده نشود، اما اگر اجتناب ناپذیر بود به صورت زیر عمل شود:

بی نام، (سال انتشار)، عنوان مقاله، آدرس دقیق سایت که به واژه html ختم شود. تاریخ دستیابی (ماه، روز، سال).

Anonymous, (2001). Project Summary Comparative Genomics of Domestication Traits in Lettuce and Sunflower. http://veghome.ucdavis.edu/faculty/micheltmore/Project_summary.htm. Accessed August 23, 2001.

- **استفاده از سایت اینترنتی:** نام سایت. سال انتشار. عنوان مطلب مورد استفاده. آدرس دقیق سایت که به واژه html ختم شود. تاریخ دستیابی (ماه روز، سال).

Agriculture and Agri-Food Canada. (1999). Market and Industry Services Branch, Horticulture and Special Crops Division.

http://www.Agr.ca/misb/spcrops/bean_e.html. Accessed: January 29, 2001.

- وقتی مقاله ای به الفبای غیر لاتین چاپ شده است، لازم است عنوان مقاله به زبان انگلیسی ترجمه شود و با قید شماره صفحات، زبان اصلی آن مانند روسی در پرانتز قید شود.

- نگارندگان محترم از یک مقاله استاندارد که براساس راهنمای حاضر تهیه شده و در سایت مجله موجود است به عنوان الگو استفاده نمایند.

- مقاله فقط از طریق پایگاه اینترنتی مجله به دبیرخانه ارسال شود:

<http://jab.alzahra.ac.ir>

فهرست

- ۱- بهینه‌سازی فرایند جذب زیستی اورانیوم توسط زیست توده اتوکلاو شده باکتری میکروکوکوس لوتئوس با استفاده از روش سطح پاسخ
پریرسا تاجر محمد قزوینی، زهرا شیری یکتا، شقایق نصر، نرگس اسلامی، منصوره السادات حسینی..... ۷
- ۲- بررسی فعالیت ضد میکروبی مشتقات جدید سیپروفلوکساسین
شقایق چخماقی، موج خالقی، حجت اله خباززاده..... ۲۲
- ۳- مقایسه ترکیبات شیمیایی، اثرات آن‌تی اکسیدانی و ضد میکروبی اسانس و عصاره برگ چای سیاه و چای سبز *Camellia sinensis* بر باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی (زانتوموناس کامپستریس و سودوموناس سیرینگه) و بیماری‌زای انسانی (استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی)
مسعود حیدری زاده، فاطمه علیجانی، مراحم آشنگرف، سجاد آتشی..... ۳۹
- ۴- رفتار همنوع خواری سوسک زردآرد (*Tenebrio molitor* Linnaeus) در شرایط آزمایشگاهی
رضیه رشیدی ایل ذوله، وحید اکملی..... ۶۲
- ۵- اثر تنش یخ‌زدگی بر برخی پاسخ‌های فیزیولوژیک و آن‌تی‌اکسیدانی گل‌های زینتی میمونی (*Antirrhinum majus*) و بنفشه (*Viola × wittrockiana*)
بهروز صالحی اسکندری، زهره نصیریان جزئی، جلیل عباس‌پور..... ۸۱
- ۶- بررسی اثرات افزودن هم‌زمان آلفا توکوفرول (ویتامین E) و کربن نانوتیوب‌های چند دیواره عامل دار (MWCNT) بر خواص مکانیکی و زیست سازگاری ماتریس پلیمری پلی‌اتیلن با وزن مولکولی بسیار بالا (UHMWPE) باهدف کاربرد در تعویض مفاصل
محسن فکوری، محمدتقی خراسانی، مهدی کمالی دولت‌آبادی..... ۹۵
- ۷- نقش تنظیم کننده‌های رشد در بهینه‌سازی تشکیل کالوس در گیاه دارویی ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.)
مهدی کاکایی، فاطمه حاج مرادی، محسن منصوری، محمدعلی ابراهیمی..... ۱۱۳
- ۸- تأثیر روش نگهداری محلول نایل رد بر شدت فلوروسانس در تشخیص لیپیدها
زهرا نوروزی مطلق، محمود اخوان مهدوی، رضا قشلاقی..... ۱۲۶
- ۹- مقایسه فعالیت‌های زیستی جلبک‌های کلرلا و اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز آنزیمی
طیبه هادی توران پشتی، فخری سادات حسینی، فاطمه صفاخواه..... ۱۴۱
- ۱۰- بررسی اثرات هم‌افزایی نانوذرات سریم اکسید و اوژنول بر بازیابی عملکرد نورون‌های حسی و حرکتی ناشی از کمپرس عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی
سهیلا عالی‌پور، فریبا محمودی، آرش عبدالملکی، خدیجه حقیقت..... ۱۶۰



بهینه‌سازی فرایند جذب زیستی اورانیوم توسط زیست توده اتوکلاو شده باکتری میکروکوکوس لوتئوس با استفاده از روش سطح پاسخ

پریسا تاجرمحمد قزوینی^۱، زهرا شیرینی یکتا^{۲*}، شقایق نصر^۳، نرگس اسلامی^۴، منصوره‌السادات حسینی^۵

چکیده

مقدمه: اورانیوم به عنوان یکی از فلزات سنگین، یک رادیونوکلئید طبیعی است که به دلیل سمیت جدی و خاصیت پرتوزایی دارای اثرات مخرب بر روی سلامت انسان و محیط زیست است. جذب زیستی یک فناوری ساده و مقرون به صرفه است که می‌تواند برای حذف فلزات سنگین و رادیونوکلئیدها از پساب‌ها به کار گرفته شود. **مواد و روش‌ها:** در این پژوهش، زیست توده میکروکوکوس لوتئوس پیش تیمار شده با حرارت اتوکلاو استفاده گردید. سپس پارامترهای فیزیکی‌شیمیایی موثر بر جذب زیستی اورانیوم شامل دما، pH، غلظت اولیه اورانیوم و غلظت جاذب با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی شدند. **نتایج:** نتایج نشان داد که پارامترهای غلظت اولیه اورانیوم، مقدار جاذب و pH از لحاظ آماری ($p\text{-value} < 0.05$) بر روی فرآیند جذب زیستی اورانیوم تأثیرگذار هستند. در مقابل، پارامتر دما از لحاظ آماری ($p\text{-value} > 0.05$) بر روی فرآیند حذف اورانیوم توسط باکتری میکروکوکوس لوتئوس بدون تأثیر است. **بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج مشخص کردند که زیست توده پیش تیمار شده در شرایط پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ($19/75^\circ\text{C}$ دمای $32/14^\circ\text{C}$ و $\text{pH } 3/33$) قادر به حذف تقریباً $99/98$ درصد اورانیوم از محیط آلوده به $26/11$ میلی گرم بر لیتر اورانیوم است که نشان دهنده پتانسیل ارزشمند آن در کاربردهای زیست پالایی اورانیوم از پساب‌های اسیدی آلوده با غلظت های پایین اورانیوم است.

واژه‌های کلیدی: اورانیوم، جاذب زیستی، رادیونوکلئید، زیست پالایی، طراحی آزمایش

۱. دانشیار، پژوهشکده چرخه سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران
- *۲. استادیار، پژوهشکده چرخه سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران (*نویسنده مسئول، zshiri@aeoi.org.ir)
۳. استادیار، بانک میکروارگانیسم‌ها، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
۴. کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فناوریهای نوین زیستی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران
۵. کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س)، ونک، تهران، ایران

مقدمه

افزایش انتشار فلزات سنگین به واسطه گسترش فعالیت‌های صنعتی و تخلیه فاضلاب‌های حاوی سطوح بالای فلزات مختلف به یکی از مهم‌ترین معضلات محیطی تبدیل شده است (Shroff & Vaidya, 2011). برای مثال توسعه فعالیت‌های صنعتی انسان در زمینه معدن کاری و غیره منجر به انتشار آلودگی‌های رادیواکتیو به محلول‌های آبی شده است و در این زمینه مشکلاتی را ایجاد کرده است. ورود فلزات رادیواکتیو به محیط زیست و انباشت آن‌ها در بافت‌های زنده، می‌تواند در نهایت به بالاترین زنجیره غذایی، یعنی انسان رسیده و باعث مشکلات کلیوی و ریوی، انواع سرطان‌ها و ناهنجاری‌های مادرزادی متعدد شود (Khani et al, 2006; Li et al, 2014). حذف اورانیوم و فلزات سنگین دیگر از پساب‌ها می‌تواند به وسیله روش‌های شیمیایی (مانند خنثی‌سازی و رسوب) و روش‌های فیزیکی (مانند تبخیر، تعویض یونی و تکنولوژی‌های غشایی) انجام شود، اما این روش‌های مرسوم نه تنها نیاز به سرمایه‌گذاری بسیار دارند بلکه هزینه‌های جاری آن‌ها نیز بالا است. علاوه بر این، روش‌های مرسوم غیر زیستی در غلظت‌های پایین آلاینده از کارایی کافی برخوردار نیستند. بنابراین، از یک سو افزایش نگرانی‌ها از گسترش انتشار آلاینده‌ها و تخلیه پساب‌های بیمار نشده به محیط زیست و از سوی دیگر فشارهای مالی مربوط به روش‌های مرسوم آلودگی‌زدایی بر صنایع، موجب شده است تا مهندسان و دانشمندان محیط زیست به دنبال روش‌هایی مناسب، محیط دوستانه و به صرفه برای حذف فلزات سنگین و رادیونوکلئیدها از محلول‌های آبی باشند. امروزه فرایندهای جذب زیستی به عنوان جایگزینی برای حذف این آلاینده‌ها مطرح هستند (Ahmad et al, 2018; Bayramoğlu et al, 2006; Idris et al, 2012).

برای تیمار فاضلاب‌های صنعتی، جاذب‌های طبیعی زیادی شامل جلبک‌های دریایی، باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و پسماندهای صنعتی و کشاورزی استفاده شده‌اند (Farhan & Khadom, 2015). میکروارگانیسم‌های مورد استفاده برای حذف فلزات می‌توانند به صورت زنده یا غیرزنده مورد استفاده قرار گیرند. کاربرد جذب زیستی در مقیاس بالا مشخص کرده است که زیست توده غیرزنده نسبت به نوع زنده می‌تواند از مزایایی چون عدم حساسیت به غلظت یون‌های فلزات سمی، عدم نیاز به محیط کشت و مواد غذایی، سهولت و جذب و بازیابی فلزات و سهولت مدلسازی ریاضی برای افزایش مقیاس برخوردار باشد (Ayangbenro & Babalola, 2017; Shroff & Vaidya, 2011). بسیاری از این مواد زیستی، ظرفیت جذب خوبی را نسبت به انواع یون‌های فلزی از خود نشان داده‌اند. از جاذب‌های قوی برای فلزات در میان باکتری‌ها می‌توان به *باسیلوس*‌ها، *سودوموناس*‌ها، *استرپتومایسس* و مانند آن اشاره کرد (Vijayaraghavan & Yun, 2008). *باسیلوس*‌ها از شناخته شده‌ترین باکتری‌های گرم مثبت هستند که از گونه‌های مختلف آن‌ها مانند *cereus* در حذف کادمیوم، سرب، مس، روی، وانادیوم (Cheah et al, 2023; Mathivanan et al, 2023)، *mucilaginosus* در حذف وانادیوم (Dong et al., 2023)، *megaterium* و *amyloliquefaciens* در حذف کروم (Roşca et al, 2023) استفاده شده است. از باکتری *Streptomyces* نیز در حذف روی، سرب، نیکل استفاده شده است (Long et al, 2018; Sedlakova-Kadukova et al, 2019; Ziouane et al, 2019). علاوه بر این، حذف اورانیوم و توریم

توسط باکتری‌های گرم مثبت متعدد شامل *Micrococcus luteus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium equi* توسط Nakajima & Tsuruta (۲۰۰۴) گزارش شده است (Nakajima & Tsuruta, 2004).

بررسی مکانیزم جذب زیستی توسط محققان مختلف نشان داده است که برهمکنش بین فلزات و گروه‌های عملکردی موجود در پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌های موجود در دیواره سلولی، نقش اصلی را در حذف فلزات از محیط ایفا می‌کنند (Farhan & Khadom, 2015; Sana et al, 2015). بنابراین با توجه به نقش اساسی دیواره سلول در عمل جذب و حذف فلزات، تلاش‌های بسیاری با هدف تغییر دیواره سلولی زیست توده میکروبی به منظور اصلاح جذب زیستی صورت گرفته است. به عنوان مثال روش‌های فیزیکی متفاوتی مانند جوشاندن، حرارت دادن، اتوکلاو و یا تیمارهای شیمیایی متفاوت مانند تیمار کردن زیست توده با انواع بازها و اسیدهای ضعیف و قوی، انواع شوینده‌ها، مواد شیمیایی آلی و غیرآلی یا ترکیبی از هر دو روش فیزیکی و شیمیایی به کار گرفته شده‌اند (Ahalya et al, 2003; Liu et al, 2004; Sun et al, 2011; Vijayaraghavan et al, 2008).

همچنین مطالعات متعدد نشان داده است که ویژگی‌های جذب زیستی می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند شرایط محیطی که در آن جذب اتفاق می‌افتد مانند pH، دما، غلظت یون‌های جذب شونده، غلظت اولیه جاذب و غیره قرار گیرند و از سوی دیگر مشخص شده است که ویژگی جذب تا حدی اختصاصی سویه است و بعد از تیمار یا اعمال تغییرات در همان سویه، ویژگی‌های جذب آن متفاوت خواهد شد (Volesky, 1987). در نتیجه بهینه‌سازی پارامترهای محیطی و پیش تیمار جاذب زیستی می‌تواند در افزایش میزان ظرفیت جذب زیستی تاثیر به سزایی داشته باشد. بنابراین در این پژوهش از باکتری میکروکوکوس لوتئوس تیمار شده با حرارت به عنوان یک جاذب جدید زیستی در زمینه جذب اورانیوم استفاده شد که پارامترهای موثر بر فرایند جذب زیستی مانند غلظت اورانیوم، دما، pH و مقدار جاذب با استفاده از نرم افزار دیزان اکسپرت و روش سطح پاسخ بهینه شدند.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه، محیط کشت و مواد مورد استفاده: باکتری میکروکوکوس لوتئوس استفاده شده در این پژوهش با PTCC No. 1408 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شده است. نمک نیترات اورانیل ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) با درصد خلوص تجزیه‌ای از شرکت مرک تهیه شده است. محیط کشت نوترینت آگار، اسید سولفوریک و سدیم هیدروکسید و سایر مواد استفاده شده در این پژوهش از برند مرک تهیه گردیده است.

تهیه محلول ذخیره اورانیوم: از نمک نیترات اورانیل ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) محلول ذخیره با غلظت 1000 mg/l با استفاده از آب دیونیزه تهیه شد. در سایر مراحل، محلول‌های لازم با استفاده از رقیق کردن این محلول تهیه شدند. تنظیم pH

۱۰/ بهینه‌سازی فرایند جذب زیستی اورانیوم توسط زیست توده اتوکلاو شده باکتری میکروکوکوس لوتئوس با استفاده از روش سطح پاسخ

محلول‌های اورانیوم با استفاده از اسید سولفوریک و سدیم هیدروکسید ۱ نرمال صورت گرفت. پس از تهیه محلول ذخیره، غلظت نهایی محلول با استفاده از دستگاه ICP (Perkin Elmer-Optima 7300DV) مشخص شد.

آماده‌سازی زیست توده: از محیط کشت باکتری میکروکوکوس لوتئوس، در محیط نوترینت براث (pH 7 ± 0.2)

کشت داده شد و پیش کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای 30°C با ۱۵۰ دور بر دقیقه (Multitron-HT (iNFORS قرار گرفت. سپس از محیط کشت حاصل به میزان ۱۰ درصد با غلظت نیم مک فارلند در محیط کشت براث جدید، با همان شرایط تلقیح شد و همزنی صورت گرفت. سپس زیست توده کشت داده شده در حجم‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری با ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه به وسیله سانتریفیوژ برداشته شد و با آب دیونیزه، در همین شرایط سه مرتبه شست و شو داده شد.

تیمار حرارتی زیست توده با اتوکلاو: زیست توده به دست آمده از مرحله آماده‌سازی زیست توده درون فالكون

ریخته شد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 121°C ، با فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو گردید.

بهینه‌سازی فرایند جذب اورانیوم با استفاده از طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ: در این پژوهش روش

سطح پاسخ برای ارزیابی تاثیر پارامترهای موثر بر فرایند جذب اورانیوم توسط باکتری میکروکوکوس لوتئوس و بهینه‌سازی آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ توسط نرم افزار دیزاین اکسپرت 7.0.0 انجام شد. چهار متغیر شامل غلظت اورانیوم (mg/l)، دما ($^{\circ}\text{C}$)، pH و مقدار جاذب (g/l)، در پنج سطح $-\alpha$ ، -1 ، 0 ، $+1$ ، $+\alpha$ ، به صورت جدول ۱، جهت طراحی آزمایش استفاده شد. براین اساس، یک سری شامل ۲۷ آزمایش با استفاده از طراحی مرکب مرکزی ارائه گردید (جدول ۲).

جدول ۱- متغیرها و سطوح روش طراحی مرکب مرکزی برای بهینه‌سازی جذب اورانیوم توسط زیست توده اتوکلاو شده باکتری میکروکوکوس لوتئوس.

Table 1. Variables and levels of central composite design method for optimization of uranium biosorption by autoclaved biomass of *Micrococcus luteus* bacteria.

Variable	Symbol	levels				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Initial concentration (mg/l)	A	10	32.5	55	77.5	100
pH	B	2	2.75	3.5	4.25	5
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	C	25	36.25	32.5	28.75	40
biosorbent dose(g/l)	D	5	10	15	20	25

آزمایش‌های جذب زیستی اورانیوم با افزودن مقادیر مشخص شده از زیست توده باکتری، درون ارلن‌های ۲۰ ml حاوی

محلول اورانیوم با غلظت و pH مربوط به هر آزمایش، با دمای مشخص شده داخل گرمخانه شیکر انجام گرفت. پس از طی مدت

زمان ۹۰ دقیقه (مدت زمان تکمیل فرایند جذب زیستی اورانیوم توسط زیست توده)، هر نمونه با ۴۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت

۱۵ دقیقه در دمای °C ۴ سانتیفریوژ گردیده و میزان اورانیوم باقیمانده در محلول که زیست توده موفق به جذب آن نشده است با استفاده از روش ICP-OES با دستگاه شرکت Perkin Elmer مدل Optima 7300DV سنجیده شده است. میزان درصد حذف یا برداشت اورانیوم (R) با استفاده از رابطه شماره ۱ محاسبه شده است:

$$R(\text{درصد}) = \frac{(C_0 - C_f)}{C_0} * 100 \quad \text{رابطه (۱)}$$

در این رابطه C_0 و C_f به ترتیب غلظت اولیه و غلظت نهایی فلز پس از جذب توسط جاذب است.

نتایج و بحث

جذب زیستی به عنوان فرایند فیزیکیوشیمیایی غیروابسته به متابولیسم سلول تعریف می‌شود که یون‌های فلزات به سطح جاذب متصل می‌شود. با توجه به اهمیت بالای سطح سلولی در فرایند جذب زیستی، استفاده از تیمارهای فیزیکی و شیمیایی مختلف می‌تواند با تغییر گروه‌های عملکردی سطح سلول، باعث تغییر ظرفیت جذب زیستی شود (Hadiani et al., 2019; Long et al., 2018; Shroff & Vaidya, 2011). برای مثال Ziouane و همکارانش (۲۰۱۹) مشاهده کردند جذب زیستی سرب با زیست توده *Streptomyces rimosus* بعد از تیمار با سودسوزآور افزایش می‌یابد (Ziouane et al., 2019). Chaeh و همکارانش (۲۰۲۳)، حذف فلزات مس، سرب، روی، کادمیوم و کروم با استفاده از *Bacillus cereus* تیمار شده با اتوکلاو، جوشانده شدن و عوامل شیمیایی شامل اسید سولفوریک، سدیم هیدروکسید و متانول بررسی کردند و مشخص شد که تیمار باعث افزایش ظرفیت جذب زیستی جاذب شده است (Cheah et al., 2023). کوتاه بودن مدت زمان جذب زیستی، تولید پسماندهای ثانویه کم و هزینه‌های پایین افزایش مقیاس (صنعتی شدن)، کارایی بالا و امکان تولید مجدد جاذب زیستی از مواردی است که باعث جذابیت بیشتر جذب زیستی نسبت به سایر روش‌های زیست پالایی شده است (Kasra-Kermanshahi, 2019; Javanbakht et al., 2014; Yi & Yao, 2012; Yi & Lian, 2012). مطالعات متعدد نشان داده است که برخلاف روندهای مرسوم جذب که در غلظت‌های پایین آلاینده چندان موثر نیستند، جذب زیستی حتی در غلظت‌های پایین آلاینده نیز به خوبی عمل کرده و سطح فلزات سنگین را می‌تواند از ppm به ppb برساند (Hadiani et al., 2019).

در این پژوهش روش سطح پاسخ برای ارزیابی چهار متغیر شامل غلظت اولیه اورانیوم (mg/l)، دما (°C)، pH و مقدار جاذب (g/l) بر میزان جذب اورانیوم و بهینه‌سازی آن توسط باکتری میکروکوکوس/لوتئوس پیش تیمار شده، مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). مقادیر متغیرها و پاسخ‌های آزمایشگاهی در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- مقادیر متغیرها و پاسخ‌های آزمایشگاهی طراحی مرکب مرکزی در روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی جذب اورانیوم توسط زیست‌توده اتوکلاو شده باکتری میکروکوکوس لوتئوس.

Table 2. Values of variables and experimental responses of the central composite design in the response surface methodology for optimization of uranium biosorption by autoclaved biomass of *Micrococcus luteus* bacteria.

Test	Initial concentration (mg/l)	pH	Temperature (°C)	Biosorbent dose (g/l)	Removal (%)
1	55	3.5	32.5	5	89.29
2	100	3.5	32.5	15	99.55
3	55	3.5	32.5	25	96.82
4	32.5	2.75	36.25	20	93.31
5	77.5	2.75	28.75	10	74.75
6	77.5	2.75	36.25	20	99.1
7	55	3.5	32.5	15	90.9
8	32.5	4.25	36.25	10	93.18
9	32.5	4.25	28.75	10	94.1
10	32.5	4.25	28.75	20	98.34
11	32.5	2.75	28.75	20	94.07
12	55	3.5	40	15	94.11
13	10	3.5	32.5	15	98.81
14	77.5	2.75	36.25	10	80.76
15	77.5	4.25	36.25	20	91.87
16	55	3.5	25	15	92.04
17	55	5	32.5	15	95.93
18	32.5	4.25	36.25	20	97.8
19	77.5	2.75	28.75	20	99.03
20	32.5	2.75	28.75	10	98.1
21	77.5	4.25	36.25	10	95.6
22	55	2	32.5	15	45.46
23	32.5	2.75	36.25	10	98.46
24	55	3.5	32.5	15	91.59
25	77.5	4.25	28.75	10	92.39
26	55	3.5	32.5	15	90.65
27	77.5	4.25	28.75	20	92.81

مدل پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار به صورت زیر تعریف شده است:

$$\begin{aligned} \text{Biosorption of uranium} = & +381.00267 - 15.47727 * C \text{ (ppm)} - 45.12825 * \text{pH} + 0.62243 * T \text{ (}^\circ\text{C)} - 7.08198 * M \text{ (g/l)} \\ & + 4.10347 * C \text{ (ppm)} * \text{pH} + 7.56296E-003 * C \text{ (ppm)} * T \text{ (}^\circ\text{C)} + 0.18786 * C \text{ (ppm)} * M \text{ (g/l)} \\ & - 0.10822 * \text{pH} * T \text{ (}^\circ\text{C)} + 2.14135 * \text{pH} * M \text{ (g/l)} - 0.036100 * T \text{ (}^\circ\text{C)} * M \text{ (g/l)} + 0.10988 * C \text{ (ppm)}^2 - 8.84880 * \\ & \text{pH}^2 - 0.047385 * C \text{ (ppm)} * \text{pH} * M \text{ (g/l)} - 0.030184 * C \text{ (ppm)}^2 * \text{pH} \end{aligned}$$

به طور کلی، در جدول تحلیل واریانس مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ و F بیشتر نشان‌دهنده تأثیر بیشتر متغیرها با سطح

اطمینان ۹۵ درصد است. مقادیر P و F مدل پیشنهادی به ترتیب برابر با ۰/۰۰۰۱ و ۱۲/۱۹ است که نشان دهنده صحت مدل

پیشنهادی است. مقدار R^2 برابر با ۰/۹۳ نشان می‌دهد مدل پیشنهادی به خوبی می‌تواند مقادیر تجربی را پیش‌بینی کند.

در جدول ۳ تحلیل واریانس مدل، پارامترهای اصلی و برهم‌کنش پارامترهای میزان حذف اورانیوم آورده شده است.

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که پارامترهای غلظت اولیه اورانیوم، مقدار جاذب و pH از لحاظ آماری ($p\text{-value} < 0/05$) بر روی

فرآیند حذف اورانیوم تأثیرگذار هستند. سطح‌های سه‌بعدی پاسخ‌ها که ناشی از برهمکنش چهار متغیر غلظت اورانیوم، دما، pH و مقدار جاذب است، در اشکال ۱ تا ۶ مشاهده می‌گردد.

نتایج نمودارهای اشکال ۱ و ۲ و ۳ نشان دادند که با افزایش غلظت اورانیوم از ۱۰ mg/l تا ۱۰۰ mg/l میزان حذف از ۱۰۰ به ۹۹/۶ درصد کاهش می‌یابد. در بسیاری از تحقیقات انجام شده، مشخص شده است که ظرفیت جذب زیستی فلزات مختلف می‌تواند تحت تأثیر غلظت اولیه جذب شونده قرار گیرد. در برخی غلظت‌ها، میزان جذب شونده پایین‌تر از مقداری است که بتواند با تمام جایگاه‌های اتصال در دسترس برهم کنش کرده و جاذب به حد اشباع برسد. به همین دلیل با افزایش غلظت اولیه جذب شونده می‌توان ظرفیت جذب زیستی فلزات را افزایش داد (Yi & Yao, 2012). اما در این پژوهش، نتیجه افزایش بازده جذب در غلظت‌های پایین اورانیوم نشان دهنده این حقیقت است که جاذب باکتریایی مورد استفاده در محلول‌های فلزی رقیق کارآمد است.

نتایج نمودارهای اشکال ۱ و ۴ و ۵ نشان دادند که با افزایش pH از ۲ تا ۴/۲۵ میزان حذف از ۴۹/۱۸ به ۱۰۰ درصد افزایش یافته است، اما با افزایش pH به ۵ میزان حذف به ۹۹/۶۵ درصد کاهش می‌یابد. یکی از مهم‌ترین پارامترهای موثر در جذب زیستی pH محلول است. به طور کلی مشخص شده است که پارامتر pH، نقش اساسی در فرایند جذب زیستی ایفا می‌کند. Yi و همکارانش جذب اورانیوم توسط *Elodea canadensis* را بررسی کردند، نتایج آن‌ها نشان داد که مقدار pH محلول بیشترین تأثیر را در کنترل جذب اورانیوم دارد و مقدار بهینه آن برای حذف اورانیوم ۶ می‌باشد (Yi & Yao, 2016). Pang و همکارانش نیز در پژوهشی دیگر جذب زیستی اورانیوم را از محلول‌های آبی به وسیله زیست توده قارچ پنی سیلیوم سیتترینوم (*Penicillium citrinum*) مطالعه کردند. نتایج آن‌ها نیز نشان داد که با افزایش pH از ۳ تا ۶، میزان جذب افزایش یافته و در pH ۶ به بیشینه مقدار خود رسیده است (Pang et al, 2011). حذف اورانیوم توسط زیست توده *Ceratophyllum demersum* توسط Yi و همکارانش نیز نتایج مشابهی را نشان داد. آن‌ها گزارش کردند که مقدار مطلوب pH برای حذف اورانیوم از محلول‌های آبی ۵ است (Yi et al, 2017). مطالعات نشان داده‌اند که pH بهینه برای جذب معمولاً بین ۴ تا ۷ قرار دارد به گونه‌ای که ظرفیت جذب یون‌های فلزات سنگین معمولاً با افزایش مقدار pH، افزایش می‌یابد، اما ارتباط میان ظرفیت جذب فلزات و pH یک روند خطی نیست (Vijayaraghavan & Yun 2008; Yi & Yao 2012). در pH‌های اسیدی، رقابت بین یون‌های هیدروژن و اورانیوم برای برهمکنش با جایگاه‌های اتصال موجود در سطح جاذب بالا است و به این ترتیب میزان جذب اورانیوم کاهش می‌یابد. با افزایش pH گروه‌های عملکردی سطح جاذب به تدریج دپروتونه شده و بار منفی پیدا می‌کنند و به این ترتیب میزان جذب افزایش می‌یابد، اما در pH‌های بالاتر، با تشکیل کمپلکس‌های اورانیل مانند $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})^{5+}$ ، $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$ و $\text{UO}_2(\text{OH})^+$ ، جذب اورانیوم کاهش می‌یابد (Embaby et al, 2022; Pang et al, 2011; Wang & Chen 2006). در این بررسی نیز با افزایش pH از ۲ تا ۴/۲۵ میزان حذف از ۴۹/۱۸ به ۱۰۰ درصد افزایش یافته است، اما

با افزایش pH به ۵ میزان حذف به ۹۹/۶۵ درصد کاهش یافته است.

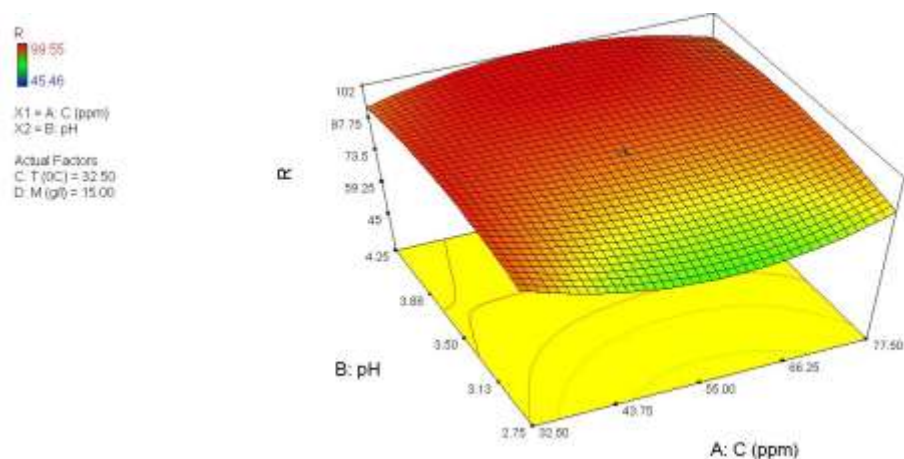
نتایج نمودارهای اشکال ۳ و ۵ و ۶ نشان دادند نشان داد که میزان حذف اورانیوم با افزایش مقدار جاذب از ۵ g/l تا ۱۰ g/l ۲۵٪ از ۸۹/۸۲ به ۹۸/۸۳ درصد افزایش پیدا می‌کند. پارامتر میزان جاذب به شدت بر روی میزان جذب تاثیرگذار است. به طور کلی افزایش تراکم بیومس به دلیل افزایش سطح برای جذب و همچنین افزایش محلول‌های متصل شونده فعال باعث افزایش جذب می‌شود (Vijayaraghavan & Yun, 2008).

از دیگر پارامتر مورد بررسی در این پژوهش پارامتر دما بود. نتایج نشان می‌دهد که پارامتر دما از لحاظ آماری ($p > 0.05$) بر روی فرایند حذف اورانیوم توسط باکتری میکروکوکوس لوتئوس بدون تاثیر است (جدول ۳ و نمودارهای اشکال ۲ و ۴ و ۶). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که در محدوده دمایی 20°C تا 35°C میزان تاثیر دما در جذب بسیار اندک است، هرچند با افزایش دما تا 50°C احتمال افزایش جذب در مورد برخی جاذب‌ها وجود دارد اما باید امکان تخریب ساختار جاذب و عدم امکان استفاده مجدد از آن را نیز در نظر گرفت (Mustafa et al, 2016). در سال ۲۰۲۲، Embaby و همکارانش، جذب زیستی اورانیوم از محلول‌های آبی با استفاده از میکرو جلبک *Chlorella sorokiniana* را مطالعه کردند. آنها تاثیر دماهای بین 25°C تا 65°C را بررسی کردند. بر اساس نتایج به دست آمده مناسب‌ترین دما برای حذف اورانیوم از محلول‌های آبی با استفاده از این میکرو جلبک 25°C گزارش شد و مشاهدات نشان داد که افزایش دما، سبب کاهش کارایی حذف می‌شود. آن‌ها علت این پدیده را غیرفعال کردن سطح جاذب زیستی یا تخریب برخی جایگاه‌های فعال سطح جاذب دانسته‌اند (Embaby et al, 2022).

جدول ۳- تحلیل واریانس مدل پیشنهادی برای میزان جذب زیستی اورانیوم توسط زیست‌توده اتوکلاو شده باکتری میکروکوکوس لوتئوس (R).

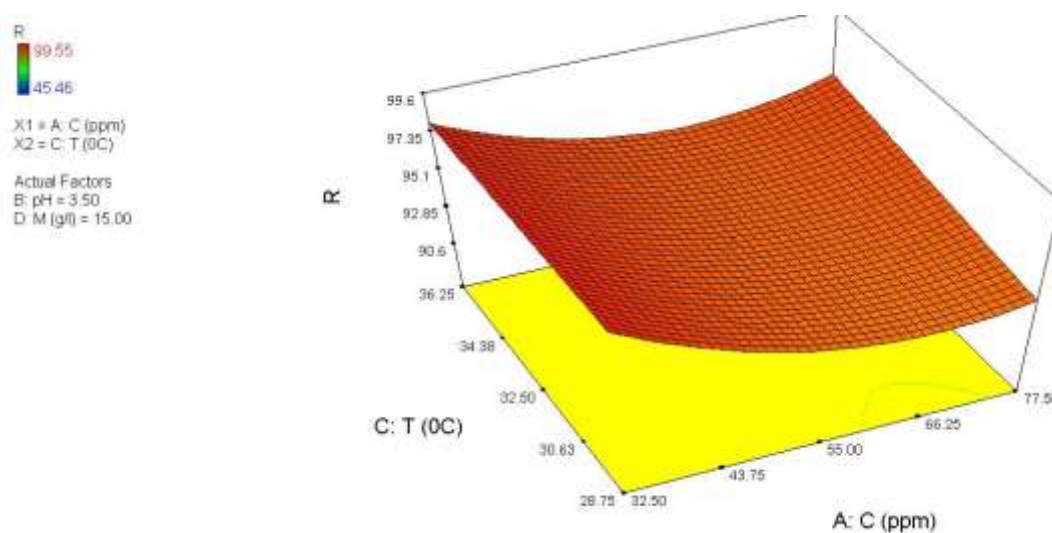
Table 3. Variance analysis of the proposed model for the amount of uranium biosorption by the autoclaved biomass of *Micrococcus luteus* bacteria (R).

Reference	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value
Model	2825.492	14	201.8209	12.19238	<0.0001
A-C (ppm)	65.24104	1	65.24104	3.941335	0.0704
B-pH	1273.61	1	1273.61	76.94122	<0.0001
C-T ($^{\circ}\text{C}$)	4.708204	1	4.708204	0.284432	0.6035
D-M (g/l)	121.7251	1	121.7251	7.353645	0.0189
AB	23.88766	1	23.88766	1.443099	0.2528
AC	6.515256	1	6.515256	0.393599	0.5422
AD	98.15856	1	98.15856	5.929945	0.0314
BC	1.482306	1	1.482306	0.089549	0.7699
BD	48.61576	1	48.61576	2.93697	0.1123
CD	7.330556	1	7.330556	0.442853	0.5183
A ²	117.6547	1	117.6547	7.107745	0.0206
B ²	634.2397	1	634.2397	38.31562	<0.0001
ABD	255.7601	1	255.7601	15.45095	0.0020
A ² B	700.5116	1	700.5116	42.31924	<0.0001



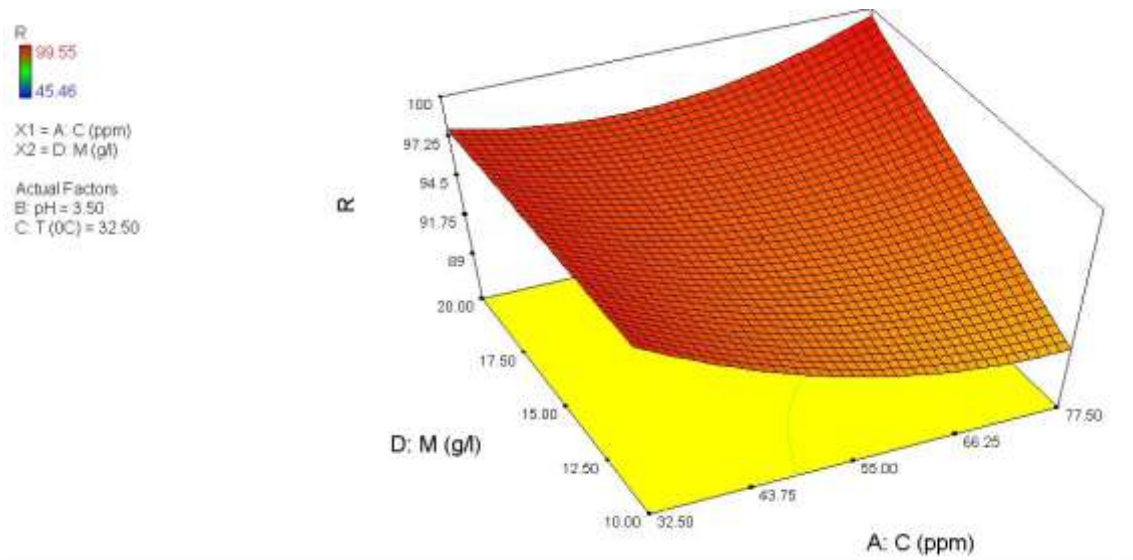
شکل ۱- سطح‌های سه‌بعدی مقدار جذب‌زیستی اورانیوم توسط میکروکوکوس/لوتئوس. برهم‌کنش مقدار غلظت اولیه اورانیوم (mg/l) و pH بر میزان R

Figure 1. Three-dimensional surfaces of uranium biosorption by *Micrococcus luteus*. The interaction of the initial concentration of uranium (mg/l) and pH on R.



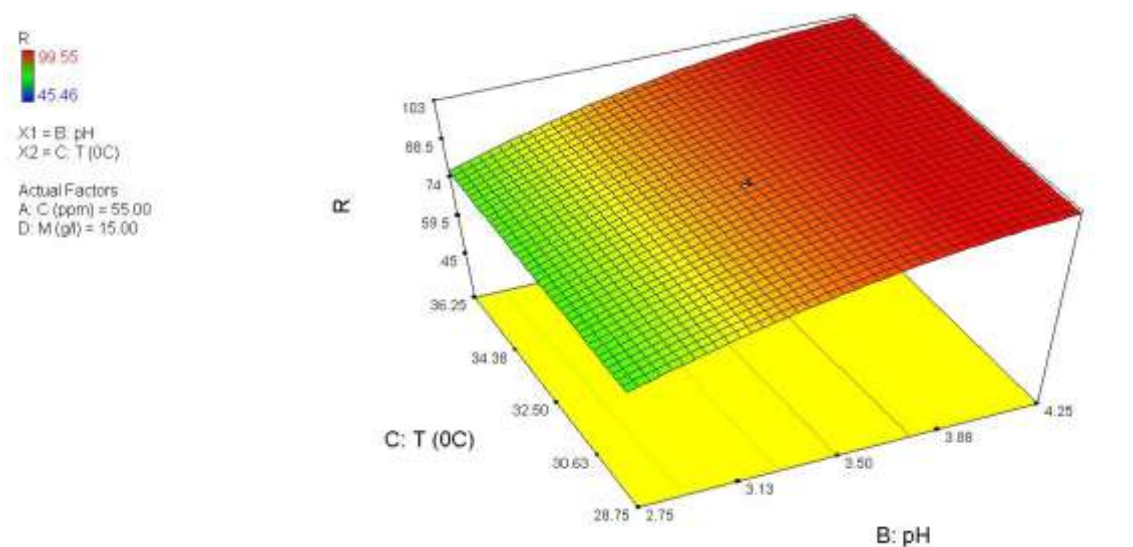
شکل ۲- سطح‌های سه‌بعدی مقدار جذب‌زیستی اورانیوم توسط میکروکوکوس/لوتئوس. برهم‌کنش مقدار غلظت اولیه اورانیوم (mg/l) و دما (°C) بر میزان R

Figure 2. Three-dimensional surfaces of uranium biosorption by *Micrococcus luteus*. The interaction of the initial concentration of uranium (mg/l) and temperature (°C) on R.



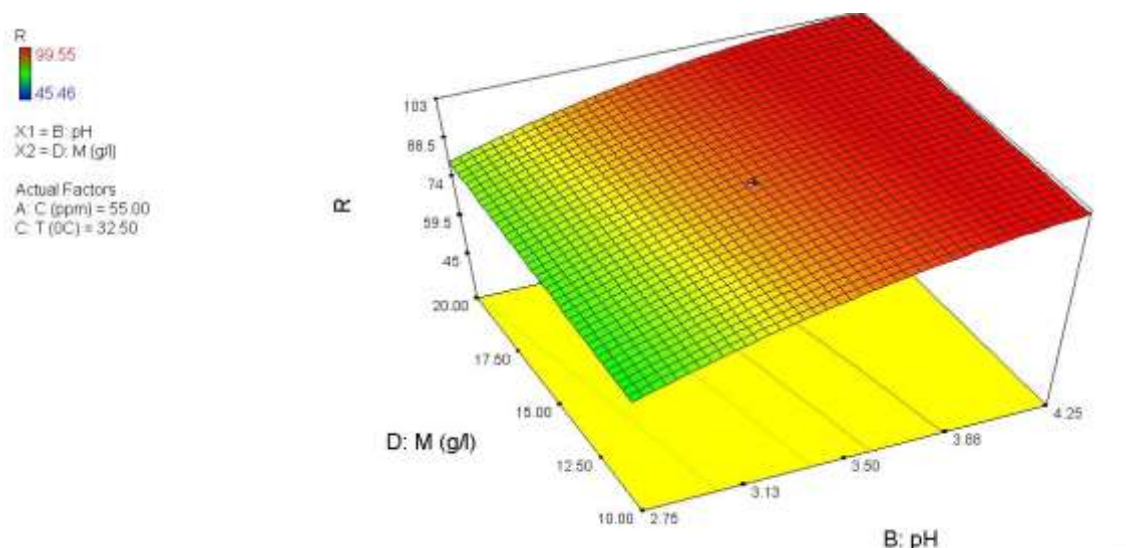
شکل ۳- سطح‌های سه‌بعدی مقدار جذب زیستی اورانیوم توسط میکروکوکوس لوتئوس. برهم‌کنش مقدار غلظت اولیه اورانیوم (mg/l) و مقدار جاذب زیستی (g/l) بر میزان R.

Figure 3. Three-dimensional surfaces of uranium biosorption by *Micrococcus luteus*. The interaction of the initial concentration of uranium (mg/l) and the amount of biosorbent (g/l) on R.



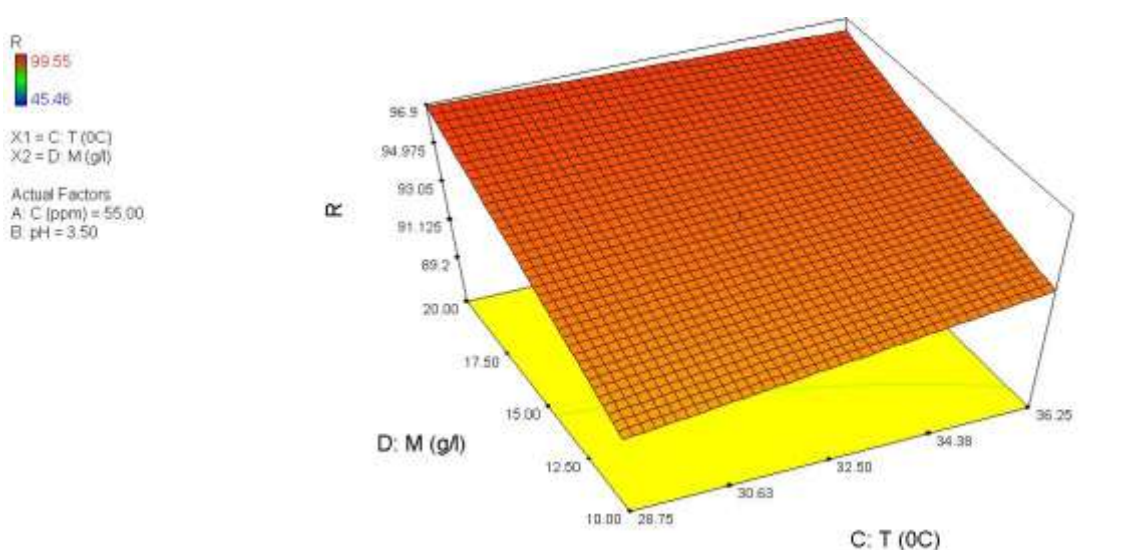
شکل ۴- سطح‌های سه‌بعدی مقدار جذب زیستی اورانیوم توسط میکروکوکوس لوتئوس. برهم‌کنش مقدار دما (°C) و pH بر میزان R.

Figure 4. Three-dimensional surfaces of uranium biosorption by *Micrococcus luteus*. The interaction of temperature (°C) and pH on R.



شکل ۵- سطح‌های سه‌بعدی مقدار جذب زیستی اورانیوم توسط میکروکوکوس لوتئوس. برهمکنش مقدار pH و مقدار جاذب زیستی (g/l) بر میزان R.

Figure 5. Three-dimensional surfaces of uranium biosorption by *Micrococcus luteus*. The interaction of pH value and the amount of biosorbent (g/l) on R.



شکل ۶- سطح‌های سه‌بعدی مقدار جذب زیستی اورانیوم توسط میکروکوکوس لوتئوس. برهمکنش مقدار دما (°C) و مقدار جاذب زیستی (g/l) بر میزان R.

Figure 6. Three-dimensional surfaces of uranium biosorption by *Micrococcus luteus*. The interaction of temperature (°C) and the amount of biosorbent (g/l) on R.

نتیجه گیری

با توجه به گسترش انتشار فلزات سنگین در محیط زیست و مخاطراتی که گسترش آن‌ها به همراه دارد، استفاده از تکنیک‌های ساده و مقرون به صرفه در حذف فلزات به ویژه اورانیوم و بازیابی آن‌ها امری گریز ناپذیر است. با توجه به نقش اساسی سطح سلول در جذب و حذف فلزات، تغییر گروه‌های عاملی سطح سلول با تیمارهای فیزیکوشیمیایی و بهینه‌سازی پارامترهای موثر در جذب زیستی، می‌تواند ظرفیت و کارایی جذب زیستی اورانیوم را بهبود ببخشد. در این پژوهش نتایج مشخص

کردند که باکتری میکروکوکوس لوتئوس تیمار شده در شرایط پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت با سطح اطمینان ۹۵ درصد (۱۹/۷۵ گرم بر لیتر زیست توده، دمای °C ۳۲/۱۴ و pH ۳/۳۳) قادر به حذف تقریباً ۹۹/۹۸ درصد اورانیوم از محیط آلوده به ۲۶/۱۱ میلی‌گرم بر لیتر اورانیوم است که نشان دهنده پتانسیل ارزشمند باکتری میکروکوکوس لوتئوس تیمار شده در کاربردهای زیست پالایی اورانیوم از پساب‌های اسیدی آلوده با غلظت‌های پایین اورانیوم به عنوان یک جاذب جدید زیستی است. همچنین کوتاه بودن مدت زمان جذب زیستی و تولید پسماندهای ثانویه کم که قابلیت سوزاندن و خاکسترسازی در قسمت پسمانداری را دارند، از مزایای این جاذب زیستی در فرایندهای زیست پالایی اورانیوم محسوب می‌شود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای انجام شده‌است. لذا نویسندگان جهت حمایت‌های مالی و معنوی آن مرکز صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

منابع

- Ahalya, N. Ramachandra, T.V. and Kanamadi, R.D. (2003). Biosorption of heavy metals. Research Journal of Chemistry and Environment 7: 71-79
- Ahmad, A. Bhat, A.H. and Buang, A. (2018). Biosorption of transition metals by freely suspended and Ca-alginate immobilised with *Chlorella vulgaris*: Kinetic and equilibrium modeling. Journal of Cleaner Production 171: 1361-1375
- Ayangbenro, A.S. and Babalola, O.O. (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. International journal of environmental research public health 14: 94
- Bayramoğlu, G. Tuzun, I. Celik, G. Yilmaz, M. and Arica, M.Y. (2006). Biosorption of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. International Journal of Mineral Processing 81: 35-43
- Cheah, C., Cheow, Y. L., & Ting, A. S. Y. (2023). Pre-Treatment of Exopolymeric Substances from *Bacillus cereus* for Metal Removal as a Novel Strategy to Enhance Metal Biosorption. *Water, Air, and Soil Pollution*, 234(2). doi:10.1007/s11270-023-06150-w
- Dong, Y., Chong, S., & Lin, H. (2023). Bioleaching and biosorption behavior of vanadium-bearing stone coal by *Bacillus mucilaginosus*. *International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials*, 30(2), 283-292. doi:10.1007/s12613-021-2344-9
- Embaby, M.A. Haggag, E.S.A. El-Sheikh, A.S. and Marrez, D.A. (2022). Biosorption of Uranium from aqueous solution by green microalga *Chlorella sorokiniana*. Environmental Science and Pollution Research 29: 58388-58404
- Farhan, S.N. and Khadom, A.A. (2015). Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces Cerevisiae*. International journal of industrial chemistry 6: 119-130
- Hadiani, M.R. Khosravi-Darani, K. and Rahimifard, N. (2019). Optimization of As (III) and As (V) removal by *Saccharomyces cerevisiae* biomass for biosorption of critical levels in the food and water resources. Journal of Environmental Chemical Engineering 7: 9

- Idris, A. Ismail, N.S.M. Hassan, N. Misran, E. and Ngomsik, A.F. (2012). Synthesis of magnetic alginate beads based on maghemite nanoparticles for Pb(II) removal in aqueous solution. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18: 1582-1589
- Javanbakht, V. Alavi, S.A. and Zilouei, H. (2014). Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent. *Water Science Technology* 69: 1775-1787
- Kasra-Kermanshahi, R. Bahrami-Bavani, M. and Tajer-Mohammad-Ghazvini, P. (2019). Microbial clean-up of uranium in the presence of molybdenum using pretreated *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 322: 1139-1149
- Khani, M.H. Keshtkar, A.R. Meysami, B. Zarea, M.F. and Jalali, R. (2006). Biosorption of uranium from aqueous solutions by nonliving biomass of marinealgae *Cystoseira indica*. *Electronic Journal of Biotechnology* 9: 100-106
- Li, X. Ding, C. Liao, J. Lan, T. Li, F. Zhang, D. Yang, J. Yang, Y. Luo, S. Tang, J. and Liu, N. (2014). Biosorption of uranium on *Bacillus* sp. dwc-2: Preliminary investigation on mechanism. *Journal of Environmental Radioactivity* 135: 6-12
- Liu, H.-L. Chen, B.-Y. Lan, Y.-W. and Cheng, Y.-C. (2004). Biosorption of Zn (II) and Cu (II) by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. *Chemical Engineering Journal* 97: 195-201
- Long, J., Gao, X., Su, M., Li, H., Chen, D., & Zhou, S. (2018). Performance and mechanism of biosorption of nickel(II) from aqueous solution by non-living *Streptomyces roseorubens* SY. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 548, 125-133. doi:10.1016/j.colsurfa.2018.03.040
- Mathivanan, K., Uthaya Chandirika, J., Srinivasan, R., Emmanuel Charles, P., Rajaram, R., & Zhang, R. (2023). Exopolymeric substances production by *Bacillus cereus* KMS3-1 enhanced its biosorption efficiency in removing Cd²⁺ and Pb²⁺ in single and binary metal mixtures. *Environmental Research*, 228. doi:10.1016/j.envres.2023.115917
- Mustafa, J. Kausar, A. Bhatti, H.N. and Ilyas, S. (2016). Sequestering of uranium (VI) onto eucalyptus bark: kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. *Desalination and Water Treatment* 57: 14578-14589
- Nakajima, A., & Tsuruta, T. (2004). Competitive biosorption of thorium and uranium by *Micrococcus luteus*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 260(1), 13-18. doi:10.1023/B:JRNC.0000027055.16768.1e
- Pang, C. Liu, Y.H. Cao, X.H. Li, M. Huang, G.L. Hua, R. Wang, C.X. Liu, Y.T. and An, X.F. (2011). Biosorption of uranium(VI) from aqueous solution by dead fungal biomass of *Penicillium citrinum*. *Chemical Engineering Journal* 170: 1-6
- Roşca, M., Silva, B., Tavares, T., & Gavrilescu, M. (2023). Biosorption of Hexavalent Chromium by *Bacillus megaterium* and *Rhodotorula* sp. Inactivated Biomass. *Processes*, 11(1). doi:10.3390/pr11010179
- Sana, S. Roostaazad, R. and Yaghmaei, S. (2015). Biosorption of uranium (VI) from aqueous solution by pretreated *Aspergillus niger* using sodium hydroxide. *Iranian journal of chemistry chemical engineering* 34: 65-74
- Sedlakova-Kadukova, J., Kopcakova, A., Gresakova, L., Godany, A., & Pristas, P. (2019). Bioaccumulation and biosorption of zinc by a novel *Streptomyces* K11 strain isolated from highly alkaline aluminium brown mud disposal site. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 204-211. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.09.123
- Shroff, K.A. and Vaidya, V.K. (2011). Effect of pre-treatments on biosorption of Ni (II) by dead biomass of *Mucor hiemalis*. *Iranian journal of chemistry chemical engineering* 11: 588-597
- Sun, F. Wu, F. Liao, H. and Xing, B. (2011). Biosorption of antimony(V) by freshwater cyanobacteria *Microcystis* biomass: Chemical modification and biosorption mechanisms. *Chemical Engineering Journal* 171: 1082-1090
- Vijayaraghavan, K. Won, S.W. Mao, J. and Yun, Y.S. (2008). Chemical modification of *Corynebacterium glutamicum* to improve methylene blue biosorption. *Chemical Engineering Journal* 145: 1-6
- Vijayaraghavan, K. and Yun, Y.S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances* 26: 266-291
- Volesky, B. (1987). Biosorbents for metal recovery. *Trends in Biotechnology* 5: 96-101
- Wang, J. and Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances* 24: 427-451
- Yi, Z.-J. and Yao, J. (2012). Kinetic and equilibrium study of uranium (VI) adsorption by *Bacillus licheniformis*. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry* 293: 907-914
- Yi, Z. and Lian, B. (2012). Adsorption of U (VI) by *Bacillus mucilaginosus*. *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry* 293: 321-329
- Yi, Z.J. Yao, J. Zhu, M.J. Chen, H.L. Wang, F. and Liu, X. (2017). Biosorption characteristics of *Ceratophyllum demersum* biomass for removal of uranium(VI) from an aqueous solution. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 313: 19-27

- Yi, Z.J. Yao, J. Zhu, M.J. Chen, H.L. Wang, F. Yuan, Z.M. and Liu, X. (2016). Batch study of uranium biosorption by *Elodea canadensis* biomass. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 310: 505-513
- Ziouane, A., Iddou, A., Aguedal, H., & Aziz, A. (2019) Biosorption of Lead(II) from Aqueous Solution by Raw and Treated *Streptomyces rimosus*: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. In: *Vol. 800 KEM. 59th International Scientific Conference of Riga Technical University (RTU) Section of Materials Science and Applied Chemistry, MSAC 2018* (pp. 145-150): Trans Tech Publications Ltd.

Optimization of uranium biosorption process by autoclaved *Micrococcus Luteus* biomass using response surface methodology

Parisa Tajer-Mohammad-Ghazvini¹, Zahra Shiri-Yekta^{2*}, Shaghayegh Nasr³, Narges Eslami⁴, Mansoureh Hosseini⁵

Received: 2023.03.10

Accepted: 2023.06.12

Abstract

Introduction: Uranium, as one of the heavy metals, is a natural radionuclide that has harmful effects on human health and the environment due to its serious toxicity and radiation properties. Biosorption is a simple and cost-effective technique that can be used for removal of heavy metals and Radionuclides from waste waters.

Material and methods: In this study, *Micrococcus luteus* biomass pretreated with autoclave heat was used. Then, physicochemical factor affecting the biosorption including biosorbent dose, initial uranium concentration, temperature and pH were investigated by Response Surface Methodology. **Results:** The results showed that the factor of initial uranium concentration, sorbent dose and pH statistically ($p\text{-value} < 0.05$) affect the uranium biosorption process. In contrast, temperature factor ($p\text{-value} > 0.05$) statistically have no effect on uranium removal by *M. luteus*. **Discussion and conclusion:** The results indicated that the pre-treated biomass under the conditions suggested by Design Expert software (19.75 g/liter of biomass, temperature 32.14 °C and pH 3.33) is able to remove approximately 99.98 percent of uranium from the contaminated area is 26.11 mg/liter of uranium, which shows its valuable potential in bioremediation applications of uranium from acidic wastewaters contaminated with low concentrations of uranium.

Keywords: Uranium, Biosorbent, Radionuclide, Bioremediation, Design–Expert

1. Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

2*. Nuclear Fuel Cycle Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran (*Corresponding Author: zshiri@aeoi.org.ir).

3. Microorganisms Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran.

4. Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Basic Sciences and Advanced Technologies in Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran

5. Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran, Iran



بررسی فعالیت ضد میکروبی مشتقات جدید سیپروفلوکساسین

شقایق چخماقی^۱، موج خالقی^{۱*}، حجت اله خباززاده^۲

چکیده

مقدمه: مقاومت آنتی بیوتیکی از زمان کشف آنتی بیوتیک ها یک واقعیت شناخته شده بوده است، اما در سال های اخیر با افزایش گونه های مقاوم و کاهش آنتی بیوتیک های مؤثر و در دسترس، به مسئله ای نگران کننده تبدیل شده است. بنابراین، کشف و یا سنتز عوامل ضد باکتریایی جدید نقشی کلیدی در حل مسئله بحران مقاومت آنتی بیوتیکی ایفا می کند. هدف از این مطالعه، سنتز مشتقات جدید آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به منظور اثرگذاری بیشتر بر روی باکتری های مقاوم به سیپروفلوکساسین بود. **مواد و روش ها:** سری جدیدی از مشتقات تیواوره و تیوسیانات سیپروفلوکساسین سنتز شد و سپس تست آنتی بیوگرام به روش انتشار دیسک بر روی باکتری های استاندارد و باکتری های بالینی مقاوم انجام شد. همچنین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) ترکیبات سنتزی تعیین گردید. **نتایج و بحث:** نتایج نشان داد که ترکیبات S1-6 دارای فعالیت آنتی باکتریال بوده و ترکیب S4 با هاله عدم رشد ۳۸ میلی متر بر روی *P. aeruginosa* ATCC 27853 موثرترین ترکیب بوده است. از طرف دیگر حداقل غلظت مهارکنندگی سیپروفلوکساسین خالص بر روی باکتری *E. coli* ATCC 25922، ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود، در حالی که ترکیبات S1-6 دارای حداقل غلظت مهارکنندگی کمتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی این باکتری می باشد، که نشان دهنده فعالیت آنتی باکتریال بالای ترکیبات است. به طور کلی بر اساس نتایج به دست آمده، با اضافه کردن استخلاف ها و گروه های عاملی مختلف به سیپروفلوکساسین، می توان مشتقات جدیدی سنتز کرد که بر روی باکتری های مقاوم، مؤثر باشد.

واژه های کلیدی: باکتری های مقاوم، تیوسیانات، سیپروفلوکساسین، ضد میکروبی، مقاومت آنتی بیوتیکی

۱- دانشجو کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

۱- دانشیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران (*نویسنده مسئول: m.khaleghi@uk.ac.ir)

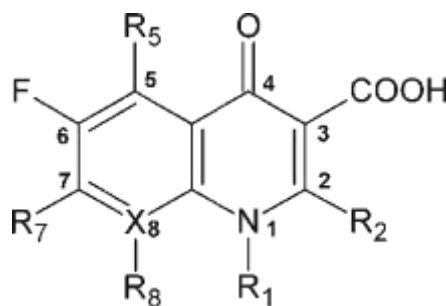
۲- دانشیار شیمی آلی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران

مقدمه

یکی از علل اصلی مرگ و میر در جهان عفونت‌های باکتریایی است. باکتری‌هایی مانند *Acinetobacter baumannii*، *Escherichia coli*، *methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*، *Klebsiella pneumoniae* می‌توانند علت طیف وسیعی از عفونت‌ها باشند. کشف آنتی‌بیوتیک‌ها در دهه‌های گذشته باعث کنترل و کاهش چشمگیر بیماری‌های عفونی شد (Christaki et al., 2020). اما با گذشت زمان، به دلیل استفاده نادرست و تکامل مقاومت باکتری‌ها، این گروه از داروها عموماً کارایی خود را در محیط‌های بالینی از دست دادند (Khaleghi et al., 2014). به طور کلی، انسان‌ها با روش‌های زیادی باعث تسریع مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شود به عنوان مثال، تجویز بیش از حد و نادرست آنتی‌بیوتیک‌ها برای علائمی که در بسیاری از موارد ممکن است توسط باکتری‌ها ایجاد نشده باشد، یکی از موارد مشکل‌ساز در این زمینه است (Jia & Zhao, 2021).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی از زمان کشف آنتی‌بیوتیک‌ها یک واقعیت شناخته شده بود، اما در بیست سال گذشته فراوانی و سرعت ظهور گونه‌های مقاوم رو به افزایش بوده است (Hutchings et al., 2019). افزایش مقاومت باکتری‌ها و کاهش تولید و توسعه آنتی‌بیوتیک‌ها، یک چشم‌انداز ترسناک و نگران‌کننده است، به طوری که سازمان بهداشت جهانی معضل مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به عنوان یکی از تهدیدهای بزرگ برای انسان، حیوانات و محیط زیست اعلام نموده است (Fair & Tor, 2014). پاتوژن‌های مقاوم به سرعت در سراسر جهان پخش می‌شوند و از طرفی تعداد آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر و در دسترس کاهش می‌یابد. از این رو، کشف عوامل ضد باکتریایی جدید نقشی کلیدی در حل مسئله بحران مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایفا می‌کند (2013 Saeedi et al.,).

کوئینولون‌ها یکی از رایج‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های تجویز شده در جهان است که برای درمان طیف گسترده‌ای از عفونت‌های باکتریایی استفاده می‌شود. در اوایل دهه ۱۹۶۰، نالیدیکسیک اسید به عنوان اولین کوئینولون برای درمان عفونت‌های مجاری ادراری ناشی از میکروارگانیسم‌های گرم منفی معرفی شد. سپس نسل دوم کوئینولون‌ها به نام فلوروکوئینولون (شکل ۱)، مانند نورفلوکساسین، سیپروفلوکساسین و افلوکساسین به بازار عرضه شدند. یکی از مشخصات مهم و اصلی این ترکیبات از نظر ساختاری، حضور یک اتم فلور در موقعیت ۶ و یک حلقه پیرازین در موقعیت ۷ است (Foroumadi et al., 2007). اتم فلور به دلیل تقویت انتشار سلولی و اتصال دارو به کمپلکس آنزیم-DNA، بهترین جانشین برای موقعیت ۶ است و آمین حلقوی پنج یا شش عضوی (مانند پیرولیدین، پیرازین) در موقعیت ۷ بر خواص ضد باکتریایی و فارماکوکینتیکی فلوروکوئینولون‌ها تأثیر می‌گذارد (Ahadi & Emami, 2020).



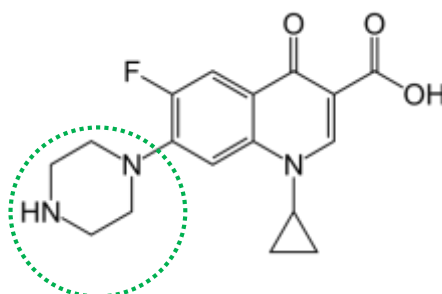
شکل ۱- ساختار فلوروکوئینولون ها (Rusu et al., 2023).

Figure 1: Structure of fluoroquinolone (Rusu et al., 2023)

فلوروکوئینولون ها یکی از متداول ترین گروه های آنتی بیوتیکی که جایگزین محبوبی برای مشتقات پنی سیلین و سفالوسپورین در درمان عفونت های مختلف می باشد. فلوروکوئینولون ها فعالیت باکتری کشی خود را از طریق مهار آنزیم های DNA ژیراز و توپوایزومراز IV اعمال می کند. مهار این آنزیم های باکتریایی باعث اختلال در تکثیر طبیعی DNA، ایجاد آسیب اکسیداتیو و تحریک مکانیسم های مرگ سلولی می شود (Wang et al., 2012).

اگرچه کوئینولون ها آنتی بیوتیک های نسبتاً بی خطری هستند اما عوارض جانبی نادر و کمتر شایعی مانند حالت تهوع، سردرد، سرگیجه، ناهنجاری های کبدی، آرتروپاتی و ناهنجاری های غضروفی دارند. این عوارض جانبی در ۲ تا ۲۰ درصد از بیماران تحت درمان با کوئینولون ها رخ می دهد. اثرات نامطلوب کوئینولون ها را می توان با تجویز درست و آگاهی از عوامل خطر از جمله در بیماران بالای ۶۰ سال و یا داروهای تداخلی کاهش داد (Oliphant & Green, 2002).

سیپروفلوکساسین (شکل ۲) یکی از قوی ترین و مهم ترین آنتی بیوتیک های گروه فلوروکوئینولون است که در سال ۱۹۸۷ سنتز و مورد تایید FDA قرار گرفت و به طور موفقیت آمیزی برای درمان طیف وسیعی از عفونت های باکتریایی از جمله عفونت های دستگاه تنفسی (RTI)، عفونت های دستگاه ادراری (UTI)، بیماری های مقاربتی (STD) و عفونت های گوارشی استفاده شد (Rehman et al. 2019).



شکل ۲- ساختار سیپروفلوکساسین: سیپروفلوکساسین ۱-سیکلوپروپیل-۶-فلوئورو-۴-اکسو-۷-پپیرازین-۱-یل-۳-کربوکسیلیک اسید است. حلقه پپیرازین به رنگ سبز مشخص شده است (Sharma et al, 2010).

Figure 2: Ciprofloxacin structure: Ciprofloxacin is 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7- Piperazine -1-ylquinoline-3-carboxylic acid. The piperazine ring is highlighted in green (Sharma et al, 2010)

امروزه مقاومت باکتری ها به فلوروکوئینولون ها به طور نگران کننده ای رو به افزایش است. به این منظور تلاش های گسترده‌ای جهت سنتز فلوروکوئینولون های جدید در برابر باکتری های مقاوم انجام شده است و اعمال تغییرات در فلوروکوئینولون ها با افزودن گروه های عاملی مختلف منجر به دست یابی ترکیبات فعال تر شده است. در بسیاری از کینولون ها یک رابطه متقابل بین افزایش فعالیت گرم مثبت و کاهش فعالیت گرم منفی مشاهده می شود (Appelbaum & Hunter, 2000).

به طور کلی، بیشتر تحقیقات از زمان معرفی فلوروکوئینولون ها، بر روی عملکرد موقعیت کربن شماره ۷ (حلقه پیرازین) متمرکز شده است. به نحوی که عمدتاً، تکامل این گروه از طریق تغییر در موقعیت C-7 مولکول اصلی ناشی می شود (شکل ۲) و بخش های دیگر مولکول به ندرت اصلاح می شوند زیرا به عنوان مثال، گروه کربوکسیلیک اسید در موقعیت ۳ و اکسیژن اگزوسیکلیک در موقعیت ۴ بخشی از مولکول هستند که به DNA ژیراز باکتریایی متصل می شود بنابراین مهم است که با استریوشیمی اطراف آن ناحیه، تداخل وجود نداشته باشد (Sharma *et al.*, 2010). همچنین تغییر در موقعیت ۲ به علت نزدیک بودن به محل اتصال، میتواند منجر به کاهش سطح فعالیت ضد میکروبی شود. (Zhang *et al.*, 2018).

همانطور که ذکر شد، زنجیره جانبی متصل به پیرازین با تعدادی از ویژگی های کلیدی سیپروفلوکساسین، نظیر طیف ضد باکتریایی، فراهمی زیستی و اثرات نامطلوب مرتبط است و یک عامل تعیین کننده در فعالیت ضد میکروبی است (Emami *et al.*, 2005). امروزه تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید فرآیندی پرهزینه و زمان بر است و معمولاً اصلاح آنتی‌بیوتیک‌های موجود به عنوان مسیر مقرون به صرفه تر انتخاب می شود. بنابراین در این مطالعه با توجه به اهمیت موقعیت کربن شماره ۷، جایگزین های جدیدی برای C-7 به منظور افزایش فعالیت ضد میکروبی، طراحی و سنتز شد. همچنین فعالیت های آنتی باکتریال ترکیبات سنتزی مورد بررسی قرار گرفت.

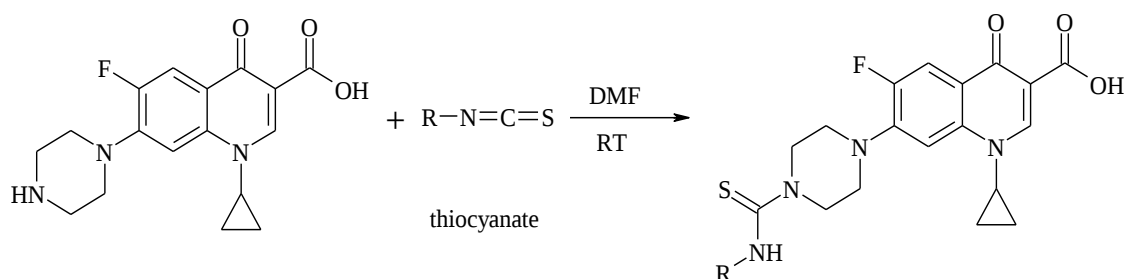
مواد و روش ها

سنتز مشتقات آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین

تمام ترکیبات شیمیایی و حلال های مورد نیاز از برند Merck خریداری شدند. نمای کلی مکانیسم سنتز ترکیبات مورد نظر در شکل ۳ و ۴ آورده شده است. ترکیبات پس از سنتز توسط ^1H NMR و IR تعیین ساختار شدند.

روش عمومی سنتز ترکیبات S1,S2,S3: مقدار ۳۳۰ میلی گرم (۱ میلی مول) سیپروفلوکساسین در ۲۰ میلی لیتر دی متیل فرماید (DMF) در دمای محیط حل شد، سپس مقدار ۱ میلی مول از مشتقات تیوسیانات به آن اضافه، مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط توسط همزن مغناطیسی هم زده شد. در سنتز ترکیبات S3,S2,S1 به ترتیب گروه های فنیل کارباموتیول، متیل کارباموتیول و بنزیل کارباموتیول به سیپروفلوکساسین متصل شد (شکل ۳). پس از تکمیل واکنش، ۳۰۰ میلی لیتر آب

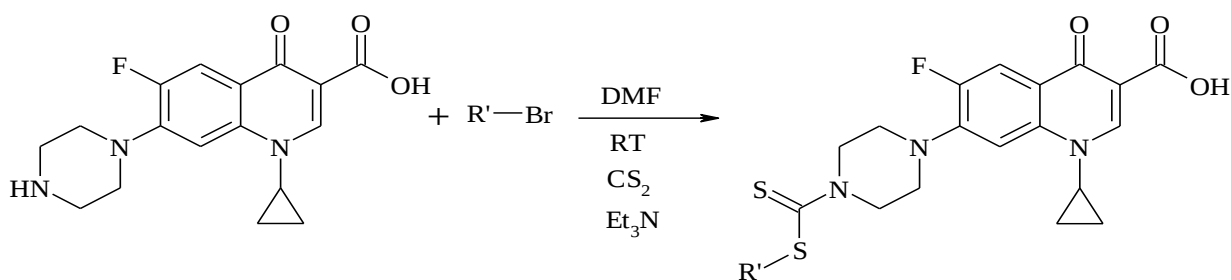
مقطر به مخلوط اضافه و رسوب حاصله صاف شد. جهت خالص سازی ترکیبات تبلور مجدد توسط اتانول صورت گرفت (Shamsa *et al.*, 2011).



شکل ۳- مسیر سنتز ترکیبات S1,S2,S3 (رسم شده توسط نرم افزار ChemBioDraw)

Figure 3: Synthesis pathway of S1,S2,S3 Compounds (Drawn by ChemBioDraw Software)

روش عمومی سنتز ترکیبات S4,S5,S6: مقدار ۳۳۰ میلی گرم (۱ میلی مول) سیپروفلوکساسین در ۲۰ میلی لیتر دی متیل فرماید (DMF) در دمای محیط حل شد و سپس مقدار ۰/۲۷۸ میلی لیتر (۲ میلی مول) تری اتیل آمین و ۰/۰۷۲ میلی لیتر (۱/۲ میلی مول) کربن دی سولفید و مقدار ۱ میلی مول از مشتقات آلکیل هالید به آن اضافه گردید. در سنتز ترکیبات S6,S5,S4 به ترتیب گروه های اتیل کارباموتیول تیواستات، بنزیل کارباموتیول تیواستات، بنزیل کاربامو دی تیونات به سیپروفلوکساسین متصل شد (شکل ۴). مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط توسط همزن مغناطیسی هم زده شد و سپس مخلوط به ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و pH آن توسط محلول ۱ مولار HCl به ۶/۵ رسانده شد. رسوب حاصله صاف شده و سپس توسط اتانول تبلور مجدد گردید (Shamsa *et al.*, 2011).



شکل ۴- مسیر سنتز ترکیبات S4,S5,S6 (رسم شده توسط نرم افزار ChemBioDraw)

Figure 4: Synthesis pathway of S4,S5, S6 Compounds (Drawn by ChemBioDraw Software)

بررسی فعالیت ضد میکروبی

فعالیت ضد میکروبی ترکیبات سنتز شده با روش های انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) بر روی سویه‌های بالینی مقاوم به سیپروفلوکساسین و همچنین سویه های استاندارد بررسی شدند. سویه های استاندارد در این مطالعه، شامل *Escherichia coli* ATCC 25922، *Klebsiella pneumoniae* PTCC 1859 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 بود که از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. سویه های بالینی از بیمارستان شهر کرمان جمع آوری شده و پس از تعیین هویت سویه ها توسط روش های بیوشیمیایی برای تست های آنتی باکتریال استفاده شدند که در این تحقیق از ۲ سویه *Staphylococcus aureus* و ۳ سویه *Pseudomonas aeruginosa* استفاده شد.

سنجش انتشار دیسک

فعالیت ضد میکروبی ترکیبات به روش انتشار دیسک بر روی باکتری های استاندارد و مقاوم انجام شد (Hudzik, 2009). باکتری های مذکور در محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. سپس از سویه های موردنظر در سرم فیزیولوژی مطابق با کدورت نیم مک فارلند سوسپانسیون تهیه شد و بر روی محیط کشت MHA به صورت چمنی کشت شدند. مقدار ۵ میکرو گرم از ترکیبات S1-6 در ۲۵ میکرولیتر DMSO حل شد و محلول به دیسک‌های بلانک تلقیح شد. سپس دیسک ها بر روی محیط کشت MHA قرار گرفت و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در گرمخانه نگه داری شدند. پس از این مدت ، قطر هاله های عدم رشد در اطراف دیسک بر حسب میلی متر اندازه گیری و ثبت گردید. در این پژوهش از سیپروفلوکساسین به عنوان کنترل مثبت و از DMSO بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC)

برای تعیین حداقل غلظت مهار کننده ترکیبات روش میکرودیلوژن براث انتخاب شد. به این منظور از میکروتیتر پلیت استریل ۹۶ خانه استفاده گردید. ابتدا به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث اضافه شد و سپس سریال رقت (از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تا ۰/۷۸ میکروگرم بر میلی لیتر) از ترکیبات مورد نظر تهیه و اضافه گردید. در آخر به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (معادل با کدورت نیم مک فارلند) اضافه گردید و در نهایت، نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس چاهک ها از نظر رشد و عدم رشد باکتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. اولین چاهکی که عدم رشد باکتری در آن مشاهده شد به محیط فاقد آنتی بیوتیک منتقل شد و به مدت ۱۷ الی ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. بعد از گذشت زمان، در صورت رشد، آن غلظت به عنوان MIC و عدم رشد به عنوان غلظت MBC

گزارش شد. لازم به ذکر است یک چاهک کنترل مثبت (باکتری + محیط کشت) و یک چاهک به عنوان کنترل منفی (محیط کشت) برای هر نمونه در نظر گرفته شد (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021).

آنالیز آماری

تمام آزمایش ها با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) در IBM SPSS Statistics 26 با سطح معنی داری $P \leq 0.05$ انجام شد.

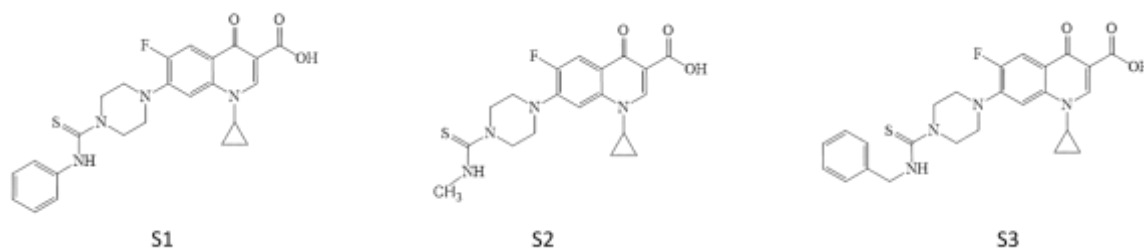
نتایج

سنتز مشتقات سیپروفلوکساسین

روش سنتز ترکیبات در شکل های ۳ و ۴ نشان داده شده است. شش مشتق مختلف از سیپروفلوکساسین سنتز شد که به ترکیبات S3, S2, S1 به ترتیب، گروه های فنیل کارباموتیول، متیل کارباموتیول و بنزیل کارباموتیول متصل شد. در مورد ترکیبات S6, S5, S4 به ترتیب گروه های اتیل کارباموتیول تیواستات، بنزیل کارباموتیول تیواستات، بنزیل کاربامو دی تیونات به حلقه پیرازین سیپروفلوکساسین متصل شد. نتایج طیف سنجی ^1H NMR و IR ساختار شیمیایی ترکیبات سنتز شده S1-6 را تایید کردند.

به عنوان مثال، در طیف NMR ترکیب S1 هیدروژن های گروه CH_2 سیکلوپروپیل و هیدروژن های گروه CH سیکلوپروپیل به ترتیب در ناحیه ۱/۲۱-۱/۳۷ و ۳/۸۱ ppm و هیدروژن های حلقه پیرازین در ناحیه ۳/۴۵ ppm به صورت پیک چند تایی ظاهر گردیده است. همچنین NH گروه فنیل کارباموتیول در ناحیه ۹/۵۳ ppm ظاهر شده است. در مورد ترکیب S2 طیف NMR نشان داد که هیدروژن های گروه CH_2 سیکلوپروپیل و هیدروژن های گروه CH سیکلوپروپیل به ترتیب در ناحیه ۱/۲۰-۱/۳۵ ppm و ۳/۸۴ قرار دارد.

هیدروژن های حلقه پیرازین در ناحیه ۳/۴۱-۳/۴۳ ppm به صورت پیک چند تایی ظاهر گردیده است. متیل متصل به گروه کارباموتیول در ناحیه ۲/۹۷ ppm به صورت یک پیک دوتایی با ثابت کوپلاژ ۳/۹ Hz ظاهر شده است. در طیف NMR ترکیب S3 هیدروژن های گروه CH_2 سیکلوپروپیل و هیدروژن های گروه CH سیکلوپروپیل به ترتیب در ناحیه های ۱/۲۰-۱/۳۵ ppm و ۴/۹۶ ppm و هیدروژن های حلقه پیرازین در ناحیه ۳/۴۶ ppm به صورت پیک چند تایی ظاهر گردیده است. گروه CH_2 بنزیل در ناحیه ۴/۸۵ ppm به صورت پیک دوتایی با ثابت کوپلاژ ۵/۴ Hz ظاهر گردیده است (شکل ۵).



شکل ۵- ساختار ترکیبات. به ترتیب از چپ به راست S1, S2, S3 (رسم شده توسط نرم افزار ChemBioDraw)

Figure 5: The structures of compounds. from left to right. S1, S2, S3 (Drawn by ChemBioDraw Software)

(S1): 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(4-(phenylcarbamothioyl) Piperazine -1-yl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid

IR (KBr): 1631, 1715, 2899, 3381 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.21-1.37 (4H, m, 2CH₂, cyclopropyl), 3.45 (4H, m, 2CH₂, piperazine), 3.81 (1H, m, CH, cyclopropyl), 7.12-7.56 (6H, m, arom), 7.83 (1H, d, $^3J_{\text{H-F}} = 13.2$ Hz, arom), 8.61 (1H, s, CH-vinyl), 9.53 (1H, s, NH), 15.09 (1H, s, OH).

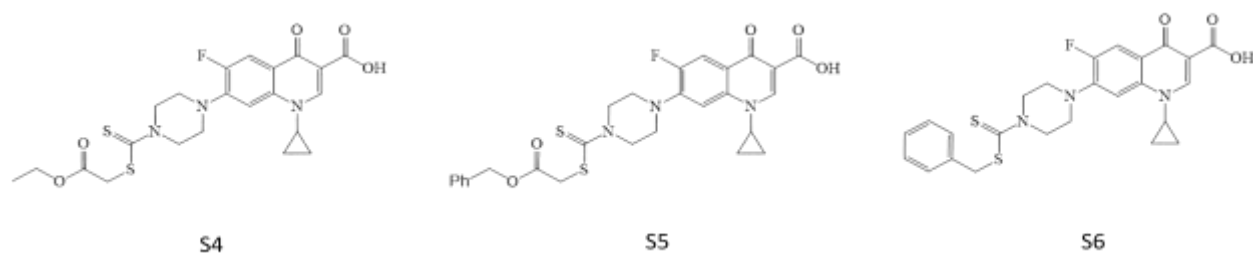
(S2): 1-cyclopropyl-6-fluoro-7-(4-(methylcarbamothioyl) Piperazine -1-yl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid

IR (KBr): 1631, 1719, 2918, 3441 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.20-1.35 (4H, m, 2CH₂, cyclopropyl), 2.97 (3H, d, $J = 3.9$ Hz, CH₃), 3.41-3.43 (4H, m, 2CH₂, piperazine), 3.84 (1H, m, CH, cyclopropyl), 4.01-4.05 (4H, m, 2CH₂, piperazine), 7.58 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, arom), 7.88 (1H, m, NH), 7.95 (1H, d, $^3J_{\text{H-F}} = 13.3$ Hz, arom), 8.61 (1H, s, CH-vinyl), 15.19 (1H, s, OH).

(S3): 7-(4-(benzylcarbamothioyl) Piperazine -1-yl)-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid

IR (KBr): 1631, 1714, 2904, 3407 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.20-1.35 (4H, m, 2CH₂, cyclopropyl), 3.46 (4H, m, 2CH₂, piperazine), 4.11 (4H, m, 2CH₂, piperazine), 4.85 (2H, d, $J = 5.4$ Hz, CH₂ benyl), 4.96 (1H, m, CH, cyclopropyl), 7.23-7.45 (5H, m, arom and NH), 7.59 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, arom), 7.95 (1H, d, $^3J_{\text{H-F}} = 13.3$ Hz, arom), 8.41 (1H, t, $J = 5.7$ Hz, arom), 8.69 (1H, s, CH-vinyl), 15.19 (1H, s, OH).

در ترکیب S4 هیدروژن های سیکلوپروپیل و گروه متیل در ناحیه ۱/۲۰ - ۱/۳۷ ppm و هیدروژن های حلقه پیرازین در ناحیه ۴/۲۵ ppm به صورت پیک چند تایی ظاهر گردیده است. همچنین هیدروژن های گروه OCH₂ در ناحیه ۴/۱۴ ppm ظاهر شده است. طیف NMR ترکیب S5 نشان داد که هیدروژن های گروه CH₂ سیکلوپروپیل و هیدروژن های گروه CH سیکلوپروپیل به ترتیب در ناحیه ۱/۱۷ - ۱/۳۷ ppm و ۳/۸۰ ppm قرار دارد. همچنین هیدروژن های گروه CH₂ حلقه پیرازین در ناحیه ۳/۵۳ - ۳/۵۷ ppm و پروتون های گروه OCH₂ در ناحیه ۵/۱۷ ppm ظاهر گردیده است. در طیف NMR ترکیب S6 هیدروژن های گروه CH₂ سیکلوپروپیل و هیدروژن های گروه CH سیکلوپروپیل به ترتیب در ناحیه ۱/۱۹ - ۱/۳۷ ppm و ۳/۸۰ ppm قرار دارد. هیدروژن های CH₂ گروه بنزیلی در ناحیه ۴/۴۰ - ۴/۴۷ ppm ظاهر گردیده است (شکل ۶).



شکل ۶- ساختار ترکیبات ، به ترتیب از چپ به راست ساختار S4,S5,S6 (رسم شده توسط نرم افزار ChemBioDraw)

Figure 6: The structure of compounds, from left to right, S4,S5,S6 structure (Drawn by ChemBioDraw Software)

(S4): 1-cyclopropyl-7-(4-(((2-ethoxy-2-oxoethyl)thio)carbonothioyl) Piperazine -1-yl)-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid

IR (KBr): 1629, 1728, 2916, 3437 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.20-1.37 (7H, m, 2CH₂, cyclopropyl and CH₃ ethyl), 3.56 (4H, m, 2CH₂, piperazine), 3.82 (1H, m, CH, cyclopropyl), 4.14 (2H, d, J = 7.1 Hz, OCH₂), 4.25 (4H, m, 2CH₂, piperazine), 4.47 (2H, s, S-CH₂), 7.59 (1H, s, arom), 7.93 (1H, d, $^3J_{\text{H-F}}$ = 13.2 Hz, arom), 8.66 (1H, s, CH-vinyl), 14.97 (1H, s, OH).

(S5): 7-(4-(((2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)thio)carbonothioyl) Piperazine -1-yl)-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid

IR (KBr): 1627, 1748, 2925, 3438 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.17-1.37 (4H, m, 2CH₂, cyclopropyl), 3.53-3.57 (4H, m, 2CH₂, piperazine), 3.80 (1H, m, CH, cyclopropyl), 4.22-4.27 (2H, m, 2CH piperazine), 4.34 (2H, s, S-CH₂), 4.40-4.47 (2H, m, 2CH, piperazine), 5.17 (2H, s, O-CH₂), 7.32-7.43 (5H, m, arom), 7.54 (1H, d, J = 6.6 Hz, arom), 7.86 (1H, d, $^3J_{\text{H-F}}$ = 13.2 Hz, arom), 8.62 (1H, s, CH-vinyl), 15.15 (1H, s, OH).

(S6): 7-(4-((benzylthio)carbonothioyl) Piperazine -1-yl)-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid

IR (KBr): 1631, 1713, 2865 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1.19-1.37 (4H, m, 2CH₂, cyclopropyl), 3.54 (4H, m, 2CH₂, piperazine), 3.80 (1H, m, CH, cyclopropyl), 4.19 (2H, m, 2CH piperazine), 4.50 (2H, m, 2CH, piperazine), 4.40-4.47 (2H, s, S-CH₂), 7.29-7.45 (5H, m, arom), 7.54 (1H, m, arom), 7.88 (1H, d, $^3J_{\text{H-F}}$ = 13.2 Hz, arom), 8.63 (1H, s, CH-vinyl), 15.16 (1H, s, OH).

فعالیت ضد میکروبی

انتشار دیسک: سویه های بالینی مورد استفاده در آزمایش، به سیپروفلوکساسین مقاوم بوده و هاله عدم رشدی را نسبت به سیپروفلوکساسین نشان ندادند، اما به نظر می رسد که این سویه ها نسبت به مشتقات سنتز شده حساسیت بیشتری از خود نشان دادند. همان طور که در جدول ۱ مشخص است، ترکیب S6 در *S. aureus* 1 در ۳۴ میلی متر داشت، در صورتی که این سویه در برابر سیپروفلوکساسین کاملاً مقاوم بوده است. همچنین این سویه نسبت به مشتقات S1 و S2 نیز از

حساسیت خوبی برخوردار بود به طوری که قطر هاله عدم رشد نسبت به این ترکیبات به ترتیب ۳۰ و ۲۱ میلی متر اندازه گیری شد. از طرف دیگر براساس نتایج به دست آمده مشخص گردید که مشتق S2 نسبت به سایر ترکیبات، دارای بیشترین اثر ضد میکروبی است ($p < 0.05$) به طوری که بر روی تمامی سویه های میکروبی (استاندارد و بالینی) دارای قطر هاله عدم رشد > 20 mm است (به غیر از *S. aureus* 2 و *P. aeruginosa* 3).

جدول ۱: فعالیت ضد میکروبی مشتقات سیپروفلوکساسین به روش دیسک دیفیوژن بر روی باکتری های استاندارد و بالینی (هاله عدم رشد بر حسب میلی متر). S1 - S6 ترکیبات سنتزی می باشد و سیپروفلوکساسین (Cip) به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است.

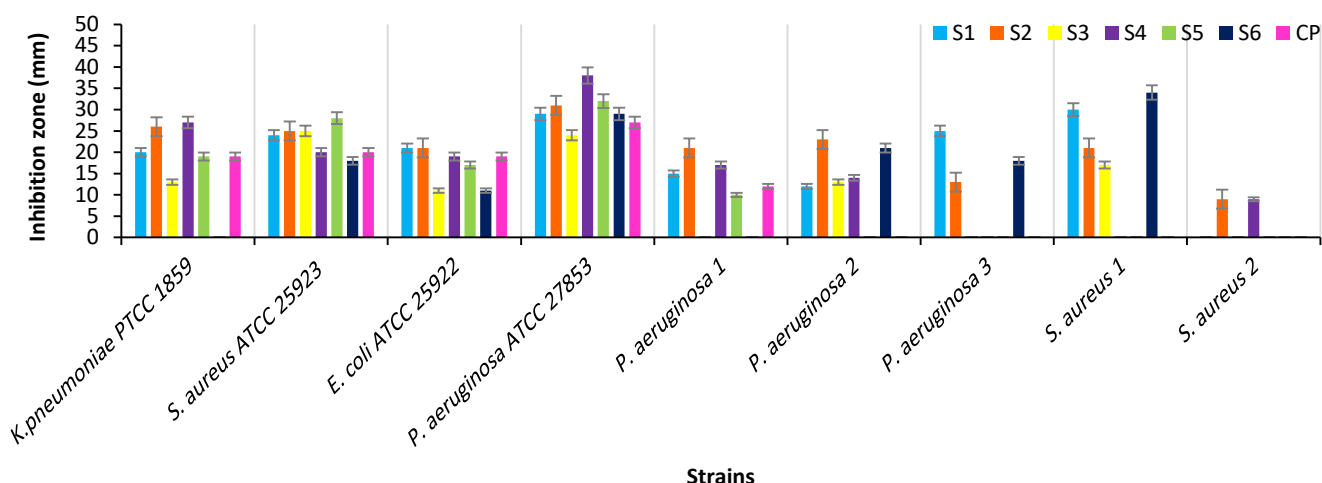
Table 1 Antimicrobial activity of ciprofloxacin derivatives by disc diffusion method on standard and clinical bacteria (zone of inhibition in mm). S1 - S6 are synthetic compounds and ciprofloxacin (Cip) is considered as a positive control.

strain	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Cip*
<i>K.pneumoniae</i> PTCC 1859	20± 0.02	26±0.05	13±0.08	27±0.05	19±0.19	0	19±0.02
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	24±0.08	25±0.06	25±0.02	20±0.05	28±0.05	18±0.03	20±0.05
<i>E. coli</i> ATCC 25922	21±0.02	21±0.05	11±0.05	19±0.09	17±0.08	11±0.02	19±0.06
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	29±0.05	31±0.01	25±0.12	38±0.08	32±0.02	29±0.18	27±0.11
<i>P. aeruginosa</i> 1**	15±0.19	21±0.05	0	17±0.15	10±0.03	0	12±0.09
<i>P. aeruginosa</i> 2**	12±0.05	23±0.08	13±0.07	14±0.02	0	21±0.05	0
<i>P. aeruginosa</i> 3**	25±0.11	13±0.09	0	0	0	18±0.15	0
<i>S. aureus</i> 1**	30±0.03	21±0.19	17±0.11	0	0	34±0.08	0
<i>S. aureus</i> 2**	0	9±0.05	0	9±0.06	0	0	0

* سیپروفلوکساسین به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است.

** سویه ها بالینی و مقاوم به سیپروفلوکساسین می باشد.

مطابق جدول ۱، ترکیبات سنتز شده بر روی سویه های استاندارد دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بودند و این تاثیر بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی از نظر آماری معنی دار نبود و تفاوت معنی داری بین دو گروه گرم مثبت و گرم منفی وجود نداشت (شکل ۷). از طرف دیگر مشخص شد، که ترکیبات S1، S2 و S3 در تمام سویه های مورد آزمایش دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بوده است. بدین ترتیب ترکیبات دارای مشتقات تیوسیانات فعالیت ضد میکروبی بهتری نسبت به مشتقات تیواوره داشتند به طوری که مشتقات تیوسیانات نسبت به کنترل (سیپروفلوکساسین) افزایش تقریباً ۵۰ درصد را از خود نشان دادند.



شکل ۷-مقایسه اثر ضد باکتریایی ترکیبات سنتزی S1-S6 به روش دیسک دیفیوژن بر باکتری های بالینی و استاندارد

Figure 7-Comparison of the antibacterial effect of the synthetic compounds S1-S6 by disk diffusion method on clinical and standard bacteria

حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC): بر اساس نتایج بدست آمده، مشخص گردید بیشتر ترکیبات سنتز شده، هم باکتریواستاتیک و هم باکتریسیدال هستند. همان طور که در جدول ۲ آمده است، این ترکیبات در غلظت های بالا دارای اثر کشندگی هستند ولی در غلظت های پایین، اثر باکتریواستاتیک دارد. بر طبق یافته ها، ترکیب S2 بر روی تعداد بیشتری از سویه های میکروبی مورد مطالعه، اثر مهارکنندگی و کشندگی داشت و بازه فعالیت مهارکنندگی رشد آن در سویه های مختلف از ۰/۳۹ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر متفاوت بود.

همچنین علی رغم مقاومت نسبی اکثر سویه ها، ترکیب S1 با حداقل غلظت مهارکنندگی ۰/۷۸ میکروگرم بر میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر دارای بهترین اثر ضد میکروبی بوده است. MIC و MBC ترکیب S4 بر روی *P. aeruginosa* ATCC 27853 و نزدیک به هم است که نشان دهنده فعالیت آنتی باکتریایی بالای این ترکیب است. در بررسی های بدست آمده مشخص گردید که ترکیب سنتزی S2 روی تعداد بیشتری از نمونه ها دارای اثر مهارکنندگی و کشندگی است که نشان دهنده فعالیت ضد میکروبی بالا این ترکیب نسبت به سیپروفلوکساسین است.

جدول ۲: تعیین حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) ترکیبات بر علیه باکتری های مختلف (مقادیر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ است). S1 - S6 ترکیبات سنتزی می باشد و سیپروفلوکساسین (Cip) به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است.

Table 2: Determination of Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of compounds against different bacteria (values are in $\mu\text{g/ml}$). S1 - S6 are synthetic compounds and ciprofloxacin (Cip) is considered as a positive control.

strain	S1		S2		S3		S4		S5		S6		Cip**	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>K.pneumoniae</i> PTCC 1859	25	100	12.5	100	6.25	100	12.5	100	0.78	100	-	-	12.5	100
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	6.25	100	0.78	100	3.125	100	6.25	25	1.56	-	25	-	3.125	25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3.125	100	12.5	100	25	100	25	100	25	-	0.39	-	50	100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.78	1.56	25	100	12.5	100	12.5	25	12.5	100	50	-	0.39	1.56
<i>P. aeruginosa</i> 1*	50	-	25	-	-	-	25	100	25	100	-	-	25	100
<i>P. aeruginosa</i> 2*	0.78	-	50	100	25	100	1.56	12.5	-	-	-	12.5	12.5	100
<i>P. aeruginosa</i> 3*	12.5	100	0.39	100	-	-	-	-	-	-	3.125	12.5	6.25	50
<i>S. aureus</i> 1*	12.5	100	25	100	1.56	-	-	-	-	-	-	1.56	12.5	-
<i>S. aureus</i> 2*	6.25	100	25	100	12.5	50	25	100	-	-	-	-	25	100

*سویه ها بالینی و مقاوم به سیپروفلوکساسین است.

**سیپروفلوکساسین به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است.

بحث

سیپروفلوکساسین یک آنتی بیوتیک پرکاربرد با طیف وسیع است که به علت اثر باکتری کشی قوی، به عنوان یکی از آنتی بیوتیک های اصلی و در حال توسعه حوزه بالینی محسوب می شود (Rehman et al. 2019). با توجه به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در سال های اخیر، اصلاح و تغییر در ساختار آنتی بیوتیک های موجود، یکی از راه های مقابله با این بحران است. ما در این تحقیق با افزودن گروه هایی از مشتقات تیواوره و تیوکاربامات امکان دستیابی به قدرت ضد میکروبی بیشتر را فراهم کردیم. به طوری که در برخی از ترکیبات در مقایسه با سیپروفلوکساسین خالص، مقادیر حداقل غلظت مهاری (MIC) افزایش حداقل ۵۰ درصد را نشان دادند. ترکیب S1 با حداقل غلظت مهاری ۰/۷۸ میکروگرم بر میلی لیتر بر روی باکتری استاندارد *P. aeruginosa* ATCC 27853 و باکتری مقاوم *P. aeruginosa* 2 بهترین اثر را داشته است. بنابراین افزودن گروه فنیل تیوکارباموتیول به حلقه پیرازین باعث افزایش فعالیت آنتی باکتریال سیپروفلوکساسین می شود. به طور کلی، در روش انتشار دیسک، ترکیبات دارای مشتقات تیوسیانات فعالیت ضد میکروبی بهتری نسبت به مشتقات تیواوره داشتند. ترکیب S5 و S4 در

روش انتشار دیسک نسبت به کنترل (سیپروفلوکساسین خالص) نتایج بهتری ارائه داد که ممکن است به علت وجود گروه استری در ساختار باشد.

مصطفی و همکاران با قرار دادن استخلاف بنزیل تیو و بنزیل سولفونیل ۱ و ۳ و ۴- تیادی آزول در موقعیت کربن شماره ۷ سیپروفلوکساسین مشتقات جدیدی سنتز نمودند. آن ها گزارش کردند که مشتقات بنزیل تیو ۱ و ۳ و ۴- تیادی آزول متصل شده به پپرازین در موقعیت ۷ کوئینولون ها دارای اثرات ضد میکروبی قوی تری نسبت به مشتقات بنزیل سولفونیل ۱ و ۳ و ۴- تیادی آزول بوده و تغییرات استخلاف حلقه فنیل نیز تاثیر زیادی در اثرات ضد میکروبی این مشتقات ندارد. نتایج به دست آمده نشان داد که ترکیبات سنتز شده اثرات مهار کنندگی بسیار بیشتری نسبت به سیپروفلوکساسین بر روی باکتری های گرم مثبت (*S. aureus* و *B. subtilis*) داشت، اما بر روی باکتری های گرم منفی (*E. coli* و *K. pneumoniae*) فعالیت قابل توجهی نداشت در حالی که ترکیبات سنتز شده در پژوهش ما، بر روی سویه های گرم مثبت و گرم منفی موثر بوده است (Moshefi et al, 2001).

یک سری از مشتقات N-(5-benzylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl) و N-(5-benzylsulfonyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl) سیپروفلوکساسین و نورفلوکساسین سنتز شد که در آن ها هیدروژن N-4 گروه پپرازینیل نورفلوکساسین و سیپروفلوکساسین با نیتروبنزیل تیو و نیتروبنزیل سولفونیل جایگزین شده است. نتایج آزمایش های MIC بر علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد که مشتقات سیپروفلوکساسین معمولاً قوی تر از مشتقات نورفلوکساسین به ویژه در برابر پاتوژن های گرم مثبت هستند. ترکیبات سنتز شده در تحقیق حال حاضر نتایج بهتری در سویه های *E. coli*، *P. aeruginosa* ارائه داد (Foroumadi et al, 2005).

در مطالعه مشابه دیگری، سیپروفلوکساسین از طریق واکنش با اتیل سیانواستات و اتیل استواستات آسیله شد تا مشتق سیانواستیل پپرازینیل دی هیدروکینولین و مشتق اکسوبوتانوئیل پپرازینیل دی هیدروکینولین به دست آید. نتایج نشان داد که ترکیبات اثرات خوبی در برابر باکتری های مقاوم به سیپروفلوکساسین مانند *E. coli*، *P. aeruginosa* و *K. pneumoniae* نشان می دهند. در این پژوهش ترکیب ۸ بر روی *P. aeruginosa* ATCC 27853 هاله عدم رشد ۳۴ میلی متر داشته است اما در تحقیق حاضر ترکیب S4 بر روی همین سویه، هاله عدم رشد ۳۸ میلی متر داشت و اثر ضد میکروبی بهتری از خود نشان داد (Alsughayer et al, 2021).

همچنین Pedrood و همکاران گزارش کردند که موقعیت گروه عاملی در مقایسه با نوع جایگزینی نقش مهم تری دارد. آن ها مشتقات نیتروژن- تیواسیله سیپروفلوکساسین را سنتز کردند، که این ترکیبات فعالیت ضد باکتریایی خوبی بر روی دو باکتری گرم منفی *E. coli* و *P. aeruginosa*، و باکتری گرم مثبت، *S. aureus* و *S. epidermidis* از خود نشان داد (Pedrood et al, 2022).

نتیجه گیری

به طور کلی، تغییر در ساختار آنتی بیوتیک های موجود در بازار، یک استراتژی کارآمد برای کشف داروهای ضد باکتریایی جدید است. در این مطالعه هدف، توسعه و سنتز مشتقات جدیدی از سیپروفلوکساسین بود. ترکیبات سنتز شده دارای اثر ضد باکتریایی قابل توجهی در برابر باکتری های مقاوم به ویژه باکتری های گرم منفی بودند. ترکیب S4 با گروه اتیل کارباموتیول تیواستات دارای بیشترین هاله عدم رشد در روش انتشار دیسک بود. نتایج این تحقیق نشان می دهد که متصل کردن مشتقاتی از گروه های تیواوره و تیوسیانات به حلقه پیرازین سیپروفلوکساسین می تواند اثر ضد باکتریایی بالاتری را نسبت به سیپروفلوکساسین خالص (کنترل) نشان دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه تحت عنوان "سنتز مشتقات جدید سیپروفلوکساسین و سولفانامید و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن ها" مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۴۰۱ است که با حمایت دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شده است. بدین وسیله از تمامی کسانی که ما را در این مطالعه صمیمانه یاری رسانند، نهایت سپاسگزاری را داریم.

عدم تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام میدارند که در انجام این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

References

- Ahadi, H., & Emami, S. (2020). Modification of 7-piperazinylquinolone antibacterials to promising anticancer lead compounds: Synthesis and in vitro studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 187, 111970.
- Appelbaum, P. C., & Hunter, P. A. (2000). The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International journal of antimicrobial agents*, 16(1), 5-15.
- Alsughayer, A., Elassar, A. Z. A., Hasan, A. A., & Al Sagheer, F. (2021). Antibiotic resistance and drug modification: Synthesis, characterization and bioactivity of newly modified potent ciprofloxacin derivatives. *Bioorganic Chemistry*, 108, 104658.
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of molecular evolution*, 88, 26-40.
- Emami, Saeed & Foroumadi, Alireza. (2005). Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 3.
- Fair, R. J., & Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal chemistry*, 6, 25–64.

- Foroumadi, A., Emami, S., Hassanzadeh, A., Rajaei, M., Sokhanvar, K., Moshafi, M. H., & Shafiee, A. (2005). Synthesis and antibacterial activity of N-(5-benzylthio-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl) and N-(5-benzylsulfonyl-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl) piperazinyl quinolone derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 15(20), 4488-4492.
- Foroumadi, A., Emami, S., Mansouri, S., Javidnia, A., Saeid-Adeli, N., Shirazi, F. H., & Shafiee, A. (2007). Synthesis and antibacterial activity of levofloxacin derivatives with certain bulky residues on piperazine ring. *European journal of medicinal chemistry*, 42(7), 985-992.
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American society for microbiology*, 15, 55-63.
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72-80.
- Jia, Y., & Zhao, L. (2021). The antibacterial activity of fluoroquinolone derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 224, 113741.
- Khaleghi, M., Bokaiean, M., & Saeedi, S. (2014). Assessment of antimicrobial activity of *Myrtus communis* extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied Biology*, 26(2), 37-46. (In Persian)
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165.
- Moshafi, M. H., Foromadi, A. R., & Rajaei, M. (2001). Evaluation of antibacterial activity of new N-piperazinyl quinolone derivatives with 1, 3, 4. thiadiazole group. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 8(1), 32-37.
- Oliphant, C. M., & Green, G. M. (2002). Quinolones: a comprehensive review. *American family physician*, 65(3), 455-465.
- Pedrood, K., Azizian, H., Montazer, M. N., Moazzam, A., Asadi, M., Montazeri, H., & Mahdavi, M. (2022). Design and synthesis of new N-thioacylated ciprofloxacin derivatives as urease inhibitors with potential antibacterial activity. *Scientific Reports*, 12(1), 13827.
- Rehman, A., Patrick, W. M., & Lamont, I. L. (2019). Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. *Journal of Medical Microbiology*, 68(1), 1-10.
- Rusu, A., Munteanu, A. C., Arbănași, E. M., & Uivarosi, V. (2023). Overview of Side-Effects of Antibacterial Fluoroquinolones: New Drugs versus Old Drugs, a Step Forward in the Safety Profile? *Pharmaceutics*, 15(3), 804.
- Saeedi, S., Khaleghi, M., & Pour Saedi, S. (2013). Study of the antimicrobial activity of ethanol extract of Cayenne pepper, *Amaranthus retroflexus* and *Satureja hortensis* against antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Applied Biology*, 25(2), 39-48. (In Persian)
- Shamsa, F., Foroumadi, A., Shamsa, H., Samadi, N., Faramarzi, M. A., & Shafiee, A. (2011). Synthesis and in-vitro antibacterial activities of acetylanthracene and acetylphenanthrene derivatives of some fluoroquinolones. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 10(2), 225.
- Sharma, P. C., Jain, A., Jain, S., Pahwa, R., & Yar, M. S. (2010). Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 25(4), 577-589.

Wang, S., Jia, X. D., Liu, M. L., Lu, Y., & Guo, H. Y. (2012). Synthesis, antimycobacterial and antibacterial activity of ciprofloxacin derivatives containing a N-substituted benzyl moiety. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(18), 5971-5975.

Zhang, G. F., Liu, X., Zhang, S., Pan, B., & Liu, M. L. (2018). Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *European journal of medicinal chemistry*, 146, 599-612.

Assessment of antimicrobial activity of new derivatives of ciprofloxacin

Shaghayegh chakhmaghi¹, *Moj khaleghi¹, Hojatollah Khabazzadeh²

Received: 2023/3/5

Accepted: 2023/7/10

Abstract

Introduction: Antibiotic resistance has been a known fact since the discovery of antibiotics, but in recent years, with the increase of resistant species and the decrease of effective and available antibiotics, it has become a worrying issue. Therefore, discovering or synthesizing new antibacterial agents plays a key role in solving the antibiotic resistance crisis. This study aimed to synthesize new derivatives of ciprofloxacin antibiotics to be more effective on ciprofloxacin-resistant bacteria. **Method:** A new series of thiourea and thiocarbamate derivatives of ciprofloxacin were synthesized and then the antibiogram test was performed by disk diffusion method on standard bacteria and clinically resistant bacteria. Also, the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of synthetic compounds were determined. **Results and discussion:** The results showed that all compounds S1-6 had antibacterial activity, and compound S4 was the most effective compound with an inhibition zone of 38 mm on *P. aeruginosa* ATCC 27853. The minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin on *E. coli* ATCC 25922 is 50 µg/ml, while all the synthesized compounds have a minimum inhibitory concentration of less than 50 µg/ml, which indicates the high antibacterial activity of the synthetic compounds. In general, based on the obtained results, by adding different substituents and functional groups to ciprofloxacin, it is possible to synthesize new derivatives that are effective on resistant bacteria.

Keywords: Antibiotic Resistance, Antimicrobial, Ciprofloxacin, Resistant Bacteria, Thiocyanate

1-Master student in microbiology, Faculty of Sciences ,Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

2-Associate Professor of Microbiology, Faculty of Sciences , Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

* (Corresponding author: m.khaleghi@uk.ac.ir)

3-Associate Professor of Organic Chemistry, Faculty of Sciences , Shahid Bahonar University, Kerman, Iran



مقایسه ترکیبات شیمیایی، اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره برگ چای سیاه و چای

سبز *Camellia sinensis* بر باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی (زانتوموناس کامپستریس و سودوموناس

سیرینگه) و بیماری‌زای انسانی (استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی)

مسعود حیدری زاده^{۱*}، فاطمه علیجانی^۲، مراحم آشنکرف^۳، سجاد آتشی^۲

چکیده

مقدمه: شناسایی و معرفی ترکیبات جدید طبیعی ضد میکروبی در برابر عوامل بیماری‌زای انسانی و گیاهی مورد توجه پژوهشگران است. مطالعه حاضر با هدف مقایسه ترکیبات شیمیایی، اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی چای سیاه و چای سبز انجام گرفت. **روش‌ها:** عصاره آبی و متانولی برگ چای سیاه و چای سبز تهیه و ترکیبات عصاره‌های متانولی با GC-Mass شناسایی شد. اثرات ضد باکتری با روش انتشار دیسک و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و ویژگی آنتی اکسیدانی به روش DPPH (۱ و ۱۰۱ دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل) اندازه‌گیری گردید. **نتایج و بحث:** کافئین ترکیب اصلی تشکیل دهنده عصاره چای سبز و چای سیاه است که مقدار آن به ترتیب در این دو عصاره ۸۲/۹۷ و ۸۶/۲۵ درصد است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سبز در برابر اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس سیرینگه (پنج میلی گرم بر لیتر) به طور معنی‌دار سه برابر بیشتر از مهارکنندگی عصاره چای سیاه (۱۵ میلی گرم در لیتر) است. مهارکنندگی عصاره چای سبز در برابر زانتوموناس کامپستریس و مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر سودوموناس سیرینگه به طور معنی‌دار بیشتر از سه باکتری دیگر مورد مطالعه بود. بسیاری از اثرات درمانی و پیشگیری مرتبط با مصرف چای سبز و چای سیاه را می‌توان مرتبط با ظرفیت نسبتاً بالای مهار رادیکال‌های آزاد در نظر گرفت. ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد و آنتی اکسیدانی چای سبز (EC_{50}) برابر با ۲۸/۸۷۵ گرم بر لیتر) به طور معنی‌دار یک و نیم برابر چای سیاه (EC_{50} برابر ۴۴/۲۲۲ گرم بر لیتر) است. به طور نسبی و معنی دار، توانایی مهارکنندگی هر دو عصاره در برابر پاتوژن‌های گیاهی بیشتر از پاتوژن‌های انسانی است. از فراورده‌های مختلف و شاید پسماند چای سیاه و چای سبز برای کنترل میکروارگانیسم‌های آسیب‌رسان می‌توان استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پاداکسایندگی، ضد باکتریایی، حداقل غلظت مهارکنندگی

* استادیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران (m.haidarizadeh@uok.ac.ir)

^۲ کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

^۳ دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشجو فاطمه علیجانی به راهنمایی دکتر مسعود حیدری زاده و مشاوره دکتر مراحم آشنکرف اعضای هیئت علمی دانشگاه کردستان می‌باشد.

مقدمه

گیاهان ظرفیتی ارزشمند برای تولید بسیاری از داروها، آفت کش ها و نگهدارنده های طبیعی بوده و قابلیت جایگزینی با فرآورده های سنتزی آلوده کننده محیط زیست را دارند. گیاهان زیادی به دلیل ویژگی های ضد میکروبی و دارویی مورد استفاده قرار گرفته اند. چای با نام علمی *Camellia sinensis* درختچه ایی همیشه سبز است، که ارتفاع آن به شش تا هفت و گاهی به ۱۵ متر می رسد. چای یکی از پرمصرف ترین نوشیدنی های جهان است و به صورت تخمیر شده (چای سیاه)، نیمه تخمیری (چای اولانگ) و تخمیر نشده (چای سبز) مصرف می شود. چای سبز به وسیله خشک کردن برگ های گیاه به دست می آید. چای سیاه نیاز به یک مرحله فرآوری اضافی دارد، که با تولید پلی فنل هایی مانند Theaflavin و Thearubigin همراه است. تقریباً ۷۶-۷۸ درصد چای تولید شده و مصرف آن مربوط به چای سیاه، ۲۲-۲۰ درصد مربوط به مصرف چای سبز و کمتر از ۲ درصد مربوط به چای اولانگ است (Cabrera et al., 2006). در سال های اخیر، مزایای سلامتی مصرف چای سبز، شامل پیشگیری از سرطان و بیماری های قلبی عروقی، و اثرات ضد التهابی، آنتی آرتری، ضد باکتری، آنتی اکسیدانی، ضد ویروسی، جلوگیری از آسیب سلول های عصبی، کاهش کلسترول و مواد تشکیل دهنده آن در پژوهش های متعدد بررسی شده اند (Sharangi, 2009).



شکل ۱ - مقایسه چای سیاه و چای سبز فرآوری شده از برگ چای

Figure 1. Comparison of black tea and green tea processed from tea leaves (*Camellia sinensis*)

برخی از بررسی های اپیدمیولوژیک نشان می دهد که مصرف چای سبز با کاهش بروز بیماری های قلبی عروقی، سکتة مغزی، چاقی و سرطان در ارتباط است. این اثرات به طور نسبی به فعالیت های آنتی اکسیداتیو و مهار رادیکال های آزاد اجزا پلی فنولیک نسبت داده می شود (Koech et al., 2017). برگ های چای دارای ترکیباتی هستند که در دفاع گیاهان در برابر پاتوژن هایی همچون حشرات، باکتری ها، قارچ و ویروس ها نقش دارند. بیماری های ناشی از باکتری های بیماری زای گیاهی تهدیدی برای امنیت غذایی جهانی هستند. *زانتوموناس کمپستریس* گونه ای از باکتری های گرم منفی است که سبب بیماری های گوناگون گیاهی مانند پوسیدگی سیاه در کلم سانان و پژمردگی باکتریایی چمن می شود. پوسیدگی سیاه ناشی از *زانتوموناس کامپستریس* یکی از مهم ترین و مخرب ترین بیماری های سرده کلمیان (crucifers) است (Singh et al., 2011). *سودوموناس*

سیرینگیه یک باکتری گرم منفی میله‌ای شکل است که به‌عنوان یک پاتوژن گیاهی، می‌تواند طیف وسیعی از گونه‌ها را آلوده کند (Anzai et al., 2000). /شریشیاکلی نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که به‌طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد و یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده بیماری التهاب معده و روده به‌ویژه در کودکان است (Malakar, 2014). /ستافیلوکوک /ورئوس یکی از عوامل مهم در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و عفونت‌های همه‌گیر در جمعیت‌های انسانی به‌شمار می‌رود. امروزه مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌دلیل مصرف بیش از حد در حال افزایش بوده و این مساله موجب نگرانی در سرتاسر جهان شده‌است. /ستافیلوکوک /ورئوس یک پاتوژن فرصت طلب گرم مثبت است و طیف گسترده‌ای از اگزوتوکسین‌ها را تولید می‌کند که باعث بیماری در میزبان پستاندار است. تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که ۸۰-۱۵ درصد سوبیه‌های /ستافیلوکوکوس /ورئوس جدا شده از منابع مختلف، قادر به تولید انترتوکسین (عامل مسمومیت غذایی) هستند (Bowersox, 1999).

استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌تدریج در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مقاومت به وجود آورده‌است. از این‌رو شناسایی و معرفی منابع جدید طبیعی ضد باکتریایی در برابر این عوامل بیماری‌زای انسانی و گیاهی، دارای اهمیت و یک ضرورت پژوهشی است. بر این اساس مطالعه حاضر با هدف ارزیابی و مقایسه اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی چای سیاه و چای‌سبز طراحی گردید.

مقایسه اثرات ضد باکتریایی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی چای سیاه و چای‌سبز و همچنین بررسی حساسیت و مقاومت پاتوژن‌های گیاهی (/زانتوموناس کامپستریس و سودوموناس سیرینگه) و پاتوژن‌های انسانی (/ستافیلوکوکوس /ورئوس و /شریشیاکلی) نسبت به اثرات ضد باکتریایی چای سیاه و چای‌سبز از اهداف این پژوهش است. در زمینه ارزیابی اثرات ضد باکتریایی چای‌سبز و سیاه در برابر باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی (/زانتوموناس کامپستریس و سودوموناس سیرینگه) گزارشی مشاهده نشد. آیا می‌توان از چای سیاه و چای‌سبز برای کنترل پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌ها آسیب‌رسان به انسان و گیاهان استفاده کرد؟ به نظر می‌رسد که عصاره چای‌سبز و سیاه خاصیت ضدباکتریایی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی متفاوتی داشته و اثرات بیولوژیک چای سیاه و چای‌سبز متفاوت باشند. در این پژوهش عصاره آبی و متانولی برگ چای سیاه و چای‌سبز تهیه و ترکیبات موجود در آنها با GC- Mass شناسایی و اندازه‌گیری گردید. اثرات ضد باکتری با روش‌های انتشار دیسک و حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و ویژگی آنتی اکسیدانی با روش DPPH اندازه‌گیری و مقایسه گردید.

مواد و روش

روش عصاره‌گیری از چای سبز و چای سیاه

نمونه‌های چای سیاه و چای سبز ایرانی از یک فروشگاه معتبر و مطمئن شهر سمنان تهیه گردید. بعد از شستشوی کامل، در سایه خشک و آسیاب شد و با استفاده از کلونجر با نسبت ۱۰ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر حلال (متانول خالص (مرک) یا آب دوبار تقطیر بر حسب مورد) عصاره‌گیری شد. عصاره‌ها به کمک دستگاه تقطیر دوار (مدل Tecan sunrise) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. حذف کامل حلال در یک ظرف شیشه‌ای و در زیر هود به‌طور کامل انجام شد. از ماده خشک باقیمانده غلظت‌های مختلف بر حسب آزمایش تهیه گردید. برای هر یک از آزمایش‌ها عصاره تازه تهیه شد (Haidarizadeh *et al.*, 2022).

جداسازی و شناسایی ترکیبات عصاره با استفاده از دستگاه GC-MS

نمونه‌ها پس از عصاره‌گیری، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (Agilent Technologies, USA, 7890B GC System/ 5977A MSD) آنالیز شد. مقدار ۰/۲ میکرولیتر از عصاره یا اسانس به دستگاه GC-Mass تزریق شد. ستون به کار رفته (HP-5 ms (30 m×0.25mm, 0.25 Micron) و دمای محل تزریق در ۲۸۰ درجه سانتیگراد و دمای اکسیلاری در ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای اولیه ستون ۵۰ درجه سانتیگراد بود، به مدت دو دقیقه در این دما ثابت نگه‌داشته شد، سپس دمای آن با افزایش ۷ درجه سانتیگراد در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۶۰ درجه، افزایش یافت. از گاز حامل هلیوم با درصد خلوص ۹۹/۹۹۹۵ درصد، فشار ۳۴ psi و شدت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. شناسایی ترکیبات به کمک مقایسه طیف‌های جرمی آنها با داده‌های پایگاه‌های اطلاعاتی دستگاه شامل NIST و Wiley و همچنین مقایسه‌ی اندیس‌های بازداری و الگوی شکست گزارش شده برای آنها صورت پذیرفت (Haidarizadeh *et al.*, 2018).

اثرات ضد باکتریایی عصاره چای سبز و سیاه

پس از تهیه محیط کشت مولر هینتون آگار، ارزیابی اثرات آنتی باکتریال به روش انتشار دیسک (Disk diffusion) انجام گرفت. قبل از انجام آزمایش، عصاره آبی برگ چای سبز و چای سیاه در غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، گرم بر لیتر) با استفاده از کلونجر تهیه شد. سوسپانسیون میکروبی از تک کلونی باکتری‌های مورد مطالعه (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *شریشیا کلی*، *زانتوموناس کامپستریس* و *سودوموناس سیرینگه*) با کدورت معادل نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$) (کلنی فرمینگ یونیت در میلی‌لیتر) تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آنها به‌طور مجزا و به‌صورت کشت چمنی بر روی محیط کشت مولر

هینتون، کشت داده شدند. پس از آماده‌سازی محیط کشت و استریل کردن آن و قبل از سرد شدن کامل، حدود ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت در پلیت‌های استریل ریخته شد. از عصاره آبی چای سبز و چای سیاه، غلظت‌های مختلف (۰،۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰) گرم بر لیتر) تهیه شد. دیسک‌های بلانک استریل به مدت ۳۰ دقیقه در غلظت‌های مختلف عصاره و کنترل منفی قرار داده شدند. بر روی محیط کشت از سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک فارلند به صورت کشت چمنی یکنواخت، کشت داده شد. دیسک‌ها را به مدت ۵ دقیقه از غلظت‌ها بیرون آورده که آب اضافی آن‌ها گرفته شود. سپس با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح محیط کشت قرار داده شد. پلیت‌های آماده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس قطر هاله عدم رشد در مقابل نور اندازه‌گیری شد. کشت باکتری و دیسک‌گذار در سه تکرار انجام شد. درصد قطر نسبی ناحیه مهار به عنوان یک شاخص فعالیت ضد میکروبی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد که در آن RIZD (Relative inhibitory zone diameter، درصد قطر نسبی ناحیه مهار و IZD، قطر ناحیه مهار (inhibitory zone diameter) بر حسب میلی‌متر است (Haidarizadeh et al., 2020).

$$\text{RIZD (درصد)} = (\text{IZD}_{\text{zon diameter}} - \text{IZD}_{\text{negative control}}) / \text{IZD}_{\text{zon diameter}}$$

سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه به صورت کشت فعال از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران خریداری شدند.

جدول ۱- ویژگی‌ها و بیماری‌زایی سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در آزمایش اثرات ضد میکروبی

Table 1. Characteristics and pathogenicity of bacterial strains used in antimicrobial testing

Pathogenicity	Property	Bacterial strain
Food poisoning, scabies, staphylococcal scaly skin syndrome (Kluytmans et al. 1997)	Gram-positive, Coccid	<i>S. aureus</i> IBRC-M 10690
(Malakar, 2014) Urinary tract infection, bloody diarrhea	Gram-negative, bacilli	<i>E. coli</i> IBRC-M 10871
Bacterial black knot, blight (coarse and irregular spots of dead tissue in white to yellow color on the leaf) bacterial wheat (Mori et al., 2019)	Gram negative, bacteria	<i>P. syringae</i> IBRC-M 10702
Black rot in Brassica plants (Bajpai et al. 2011)	Gram negative, rod	<i>X. campestris</i> IBRC-M 10644

آزمون تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

برای انجام آزمون MIC از محیط لوریا برتانی برات در میکروپلیت و همچنین غلظت‌های مختلفی از عصاره چای سبز و سیاه استفاده شد. به این منظور میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده (با تراکم ۰/۵ مک فارلند) به چاهک‌های الیزا حاوی ۱۴۰ میکرولیتر لوریا برتانی برات که شامل غلظت‌های مشخصی از عصاره چای سبز و سیاه (۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ گرم در لیتر) و همچنین غلظت یک گرم در لیتر کلرامفنیکل (به عنوان کنترل مثبت) هستند، اضافه گردید. پلیت‌های حاوی باکتری‌های پاتوژن انسانی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و باکتری پاتوژن

گیاهی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. به تمام خانه‌های هر پلیت، ۱۰ میکرولیتر محلول ۳، ۵ و ۲ تری فنیل تترازولیوم کلراید با غلظت اولیه ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر اضافه شد و به مدت سه ساعت گرمخانه گذاری شد. در خانه‌هایی که رشد میکروبی اتفاق افتاده باشد ظرف مدت کمتر از ۳ ساعت رنگ قرمز ایجاد می‌شود. دلیل این امر این است که باکتری‌های فعال و زنده به کمک آنزیم هیدروژن از خود تری فنیل تترازولیوم کلراید را به نمک‌های فورمازان احیا می نمایند که رنگ قرمز دارند. پس از گذشت سه ساعت انکوبه گذاری، میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج و از نظر ایجاد رنگ قرمز بررسی شد. اولین غلظتی که در آن رشد میکروبی رخ نداد و رنگ قرمز تشکیل نشد، به عنوان MIC برای باکتری‌های مورد بررسی در نظر گرفته شد (Eloff, 1998).

بررسی ویژگی آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز و چای سیاه

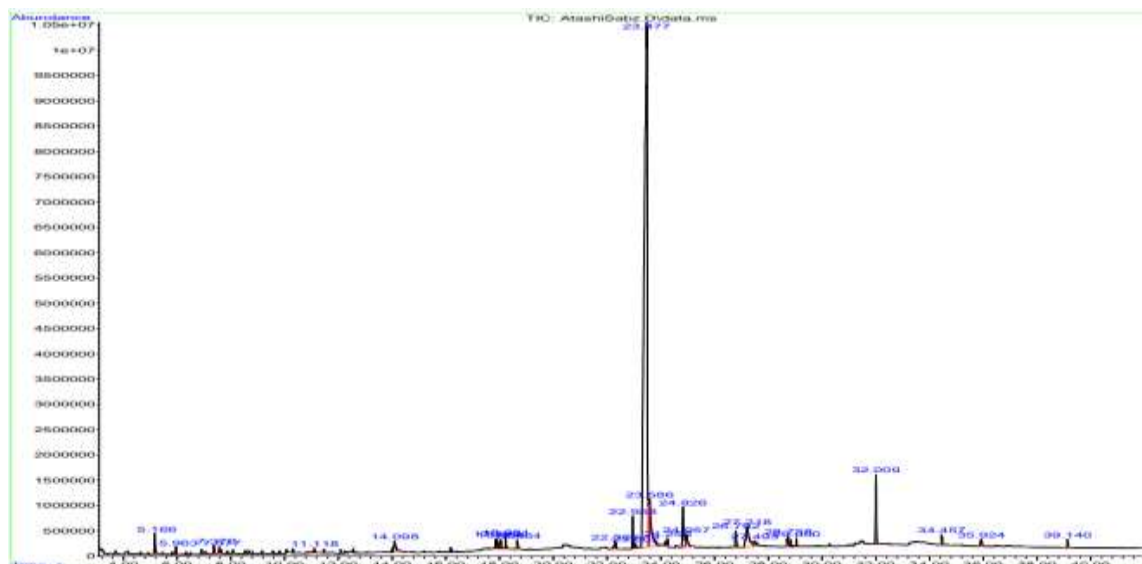
هدف از انجام این آزمایش، بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره‌های متانولی چای سبز و سیاه به روش DPPH در مقایسه با اسکوربیک اسید (ویتامین C) است. DPPH (۱ و ۱ دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل) از رادیکال‌های آزاد پایدار است. در این روش توانایی اهداء اتم هیدروژن یا الکترون توسط عصاره، از روی میزان تغییر رنگ محلول ارغوانی به محلول زرد رنگ سنجیده می‌شود. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌های چای سبز و سیاه (۵/۱۲، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ گرم بر لیتر) با ۳ میلی لیتر از محلول متانولی DPPH (غلظت ۱۵۰ میکرومولار) مخلوط شد. از اسکوربیک اسید (غلظت‌های ۱، ۵/۰، ۲۵/۰، ۱۲۵/۰ میلی مولار) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جذب DPPH به عنوان کنترل منفی اندازه گرفته شد و در سه تکرار ارزیابی گردید. جذب نمونه‌ها بعد از ۳۰ دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. تمام مراحل آزمایش برای عصاره‌ها در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انجام شد. درصد حذف رادیکال DPPH به روش زیر محاسبه شد (Znati et al., 2017).

$$\text{درصد احیا رادیکال} = \left\{ (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \right\} \times 100$$

: جذب نمونه مورد آزمایش A_{sample} جز نمونه مورد آزمایش است؛ جذب واکنش کنترل شامل تمام واکنشگرها به A_{control} شود. محاسبه می‌DPPH: با استفاده از رابطه خطی بین غلظت ترکیب و احتمال درصد مهار EC_{50} است.

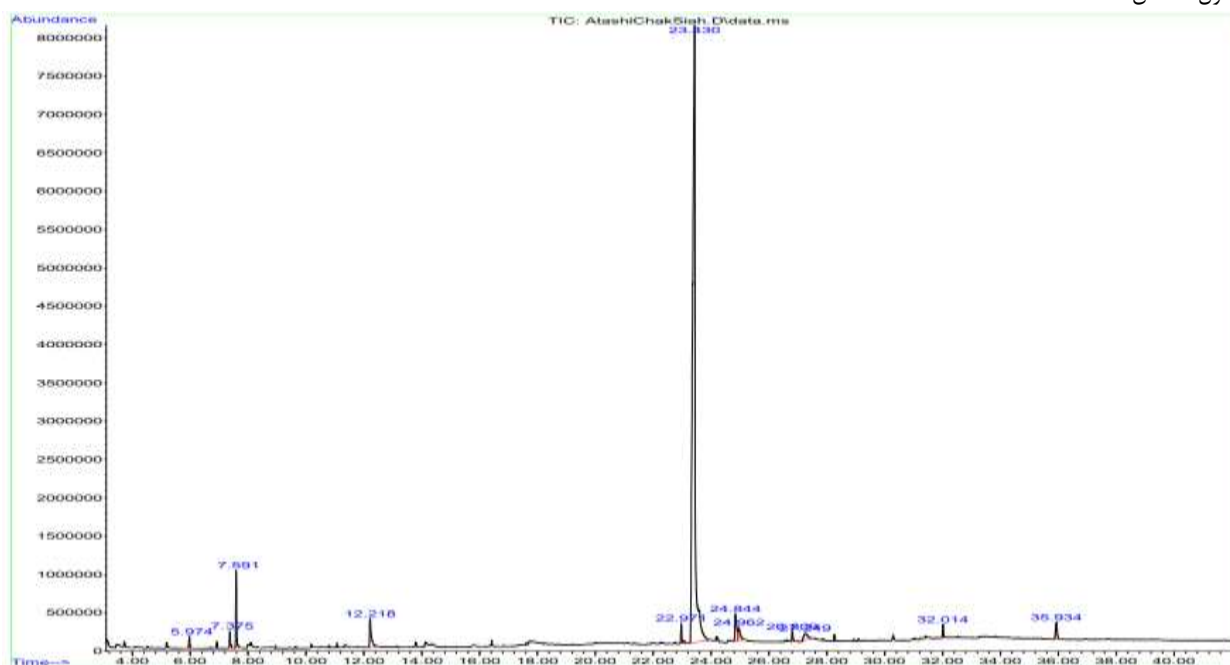
نتایج و بحث

در نمودار شکل ۲ دیاگرام به‌دست آمده از آنالیز GC-Mass عصاره متانولی چای سبز و در نمودار شکل ۳ آنالیز GC-Mass عصاره متانولی چای سبز نشان داده شده‌است.



شکل ۲ - دیاگرام به‌دست آمده از آنالیز GC-Mass عصاره متانولی برگ چای سبز برحسب زمان بازداری (محور افقی) و فراوانی (محور عمودی)
Figure 2. Diagram obtained from GC-Mass analysis of methanolic extract of green tea leaves

دیاگرام شکل ۲، ۲۳ ترکیب موجود در عصاره برحسب زمان بازداری و فراوانی را نشان می‌دهد. ترکیبات شناسایی شده به‌همراه ویژگی‌های آنها در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.



شکل ۳ - دیاگرام به‌دست آمده از آنالیز GC-Mass عصاره متانولی برگ چای سیاه برحسب زمان بازداری (محور افقی) و فراوانی (محور عمودی)

Figure 3. Diagram obtained from GC-Mass analysis of methanolic extract of black tea leaves

دیگرام، نه ترکیب موجود در عصاره برحسب زمان بازداری و فراوانی را نشان می‌دهد. ترکیبات شناسایی شده به همراه ویژگی‌های آنها در جدول ۳ نشان داده شده‌اند.

جدول ۲- ترکیبات شناسایی شده احتمالی موجود در عصاره متانولی برگ چای‌سبز به‌دست آمده از آنالیز GC-Mass

Table 2. Possible compounds in methanolic extract of green tea leaves obtained from GC-Mass analysis

شماره پیک	فرمول بسته	زمان بازداری (دقیقه)	درصد (درصد)	ترکیب احتمالی
۱	C ₆ H ₁₀ O	۵/۱۶۹	۰/۹۶	Cyclohexanone
۲	C ₁₀ H ₁₆	۵/۹۶۳	۰/۳۱	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1] hept-2-ene
۳	C ₈ H ₁₆ O ₂	۷/۵۷۵	۰/۲۲	1,1-Dimethoxycyclohexane
۴	C ₆ H ₈ O ₄	۱۱/۱۱۶	۰/۶۰	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one
۵	C ₁₀ H ₁₄ O	۱۴/۰۹۸	۱/۰۰	3-Methyl-4-isopropylphenol
۶	C ₆ H ₆ O ₃	۱۷/۸۹۸	۱/۰۰	Pyrogallol
۷	C ₆ H ₆ O ₃	۱۸/۰۵۷	۰/۳۷	Pyrogallol
۸	C ₆ H ₆ O ₃	۱۸/۲۳۳	۰/۳۹	1,2,4-Benzenetriol
۹	C ₆ H ₆ O ₃	۱۸/۶۶۲	۰/۳۹	1,2,4-Benzenetriol
۱۰	C ₁₄ H ₁₄	۲۲/۳۰۳	۰/۵۷	Benzene, 1-methyl-2- (phenylmethyl) -
۱۱	C ₂₀ H ₃₈	۲۲/۹۵۶	۱/۲۵	Neophytadiene
۱۲	C ₁₀ H ₁₆ O	۲۳/۰۶۲	۰/۲۴	2-Acetyl,- 1,5-dimethyl,-8-oxabicyclo [3.2.1] octane
۱۳	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	۲۳/۴۸۰	۷۷/۱۲	Caffeine
۱۴	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	۲۳/۵۸۶	۵/۶۰	Caffeine
۱۵	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	۲۴/۲۵۶	۰/۲۵	Caffeine
۱۶	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	۲۴/۸۲۷	۲/۶۹	n-Hexadecanoic acid
۱۷	C ₉ H ₁₂ N ₄ O ₃	۲۴/۹۵۶	۱/۲۷	1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-8-methoxy-1,3,7-trimethyl-
۱۸	C ₂₀ H ₄₀ O	۲۶/۷۹۱	۰/۸۵	Phytol
۱۹	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	۲۷/۲۲۱	۳/۱۰	9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z, Z, Z) -
۲۰	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	۲۷/۴۹۱	۰/۶۶	Octadecanoic acid
۲۱	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	۲۸/۷۳۸	۰/۶۹	6-Octadecenoic acid
۲۲	C ₁₄ H ₁₄	۲۹/۰۵۰	۰/۲۶	3-(2-naphthyl)-1-butene
۲۳	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	۳۹/۱۳۸	۰/۳۲	Octadec-9-enoic acid

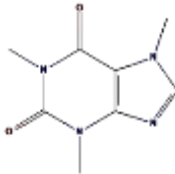
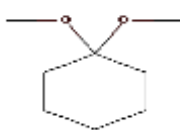
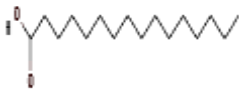
جدول ۳- ترکیبات شناسایی شده احتمالی موجود در عصاره متانولی برگ چای سیاه به‌دست آمده از آنالیز GC-Mass

Table 3. Possible compounds in methanolic extract of black tea leaves obtained from GC-Mass analysis

شماره پیک	فرمول مولکولی	زمان بازداری (دقیقه)	درصد (درصد)	ترکیب احتمالی
۱	C ₁₀ H ₁₆	۵/۹۷۵	۰/۶۲	(1S)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1] hept-2-ene
۲	C ₈ H ₁₆ O ₂	۷/۵۹۲	۳/۴۸	1,1-Dimethoxycyclohexane
۳	C ₅ H ₈ N ₄ O ₂	۱۲/۲۱۶	۲/۶۴	1-ETHYL-5-AMINO-1,2,4-TRIAZOLE
۴	C ₂₀ H ₃₈	۲۲/۹۷۴	۰/۸۸	Neophytadiene
۵	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	۲۳/۴۳۳	۸۶/۲۵	Caffeine
۶	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	۲۴/۸۴۴	۲/۴۹	n-Hexadecanoic acid
۷	C ₉ H ₁₂ N ₄ O ₃	۲۴/۹۶۲	۱/۵۶	1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-8-methoxy-1,3,7-trimethyl-
۸	C ₂₀ H ₄₀ O	۲۶/۸۰۹	۰/۶۴	Phytol
۹	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	۲۷/۲۵۰	۱/۴۴	6-Octadecenoic acid

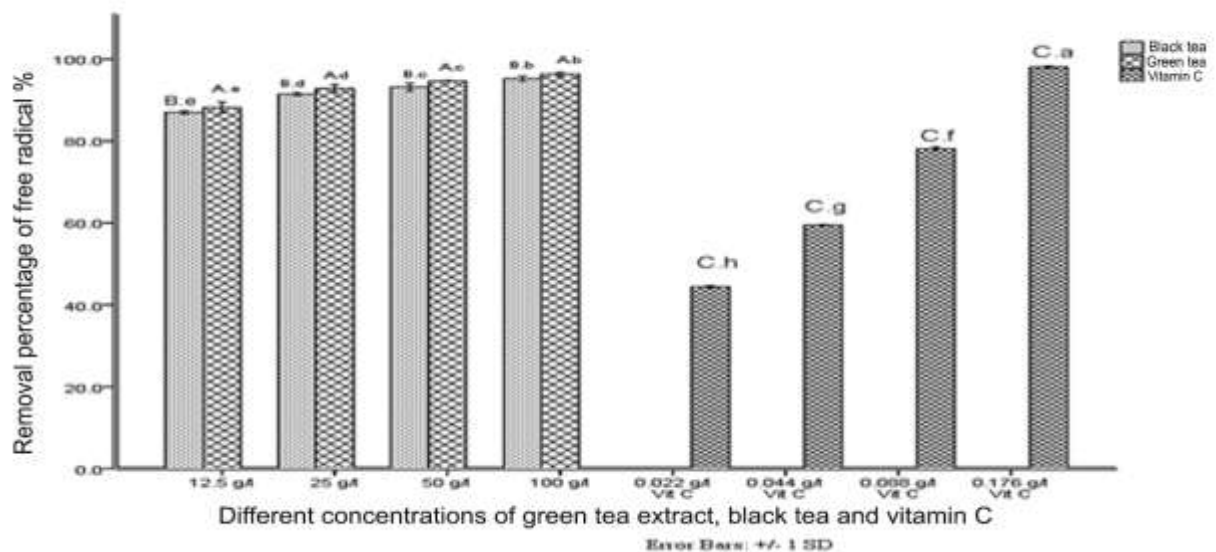
جدول ۴- مقایسه ترکیبات عصاره چای سبز و چای سیاه

Table 4. Comparison of green tea and black tea extract compositions

ترکیبات اصلی	کافئین	دی متوکسی سیکلوهگزان	اسید هگزادکانوئیک	نئوفیتادین
چای سبز (درصد)	۸۲/۹۷	۰/۲۲	۲/۶۹	۱/۲۵
چای سیاه (درصد)	۸۶/۲۵	۳/۴۸	۲/۴۹	۰/۸۸
ساختار شیمیایی				
فرمول مولکولی	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂ (ترکیب فنلی)	C ₈ H ₁₆ O ₂ (ترکیب فنلی)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	C ₂₀ H ₃₈

بر اساس نتایج جدول ۳ و ۲ ترکیب اصلی تشکیل دهنده عصاره چای سبز شامل کافئین (۸۲/۹۷ درصد)، و ترکیب اصلی عصاره چای سیاه نیز کافئین (۸۶/۲۵ درصد) است. کافئین چای سیاه سه و نیم درصد بیشتر از چای سبز است. کافئین در هر دو عصاره بالاترین درصد را داشته و بیشترین ترکیب است. در جدول ۴ مقایسه ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در هر دو عصاره، انجام شده است. ترکیبات اصلی برگ چای پلی فنل‌ها هستند. چای سبز حاوی مقادیر بیشتری از پلی فنل‌ها در مقایسه با چای سیاه است. که این ناشی از تفاوت در فرایندهای فراوری برگ‌های چای بعد از برداشت است. در چای سبز، برگ‌های تازه چای پس از برداشت، در دمای بالا تبخیر و سپس خشک می‌شود تا آنزیم پلی فنل اکسیداز آن غیرفعال گردد. در نتیجه، از اکسیداسیون کاتچین‌ها جلوگیری می‌شود و پلی فنل‌ها در فرم مونومری حفظ می‌گردند. علاوه بر جلوگیری از اکسیداسیون پلی فنل‌ها، فرایند تبخیر از تجزیه آنزیمی ویتامین‌ها جلوگیری می‌کند. از طرف دیگر چای سیاه از تخمیر برگ‌های چای به دست می‌آید که منجر به تولید ترکیبات پلی مریک همچون تیاروبیجین (Thearubigin) و ثئافلاوین (Theaflavin) می‌شود و عمده‌تاً چای سیاه حاوی اپی کاتچین‌هاست (Senanayake, 2013). چای سیاه دارای ترکیبات و اجزای بیشتری از چای سبز است بخشی از آن به دلیل فرایندهای اکسیداسیونی است که در طول تخمیر رخ می‌دهد. مهم‌ترین ترکیبات پلی فنلی شناسایی شده براساس ساختار، ایزوفلاون‌ها هستند. هرچند تشابه قابل توجهی بین ترکیبات گزارش شده در این پژوهش با دیگر پژوهش‌های مرتبط مشاهده می‌شود تفاوت در نوع و درصد ترکیبات گزارش شده را می‌توان به شرایط اقلیمی، عرض و طول جغرافیایی، ارتفاع محل رویش و کشت و همچنین تا حدودی ژنوتیپ گونه مورد مطالعه مرتبط دانست.

ظرفیت آنتی اکسیدانی: پتانسیل آنتی اکسیدانی عصاره طبیعی چای سبز و چای سیاه بعد از محاسبه خاصیت مهارکنندگی با استفاده از فرمول ۱-۲ و محاسبه EC_{50} با استفاده از رابطه خطی بین غلظت ترکیب و احتمال درصد حذف DPPH ارزیابی شد. ویتامین C به عنوان کنترل مثبت با چهار غلظت مختلف در نظر گرفته شد. بعد از محاسبه درصد مهار، EC_{50} آن محاسبه گردید. EC_{50} ، غلظتی مؤثر از ترکیب آنتی اکسیدانی است که در آن، ۵۰ درصد رادیکال های آزاد DPPH احیا شده باشند از این رو، مقدار EC_{50} کم، بیانگر خاصیت آنتی اکسیدانی بالا است.



شکل ۴- اثر غلظت های مختلف عصاره چای سبز، چای سیاه و ویتامین C بر درصد بازدارندگی و حذف DPPH

Figure 4. The effect of different concentrations of green tea extract, black tea and vitamin C on DPPH inhibition and removal percentage

نمودار شکل ۴ اثر غلظت های مختلف عصاره چای سبز و چای سیاه (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ گرم بر لیتر) و ویتامین C (۰/۱۷۶، ۰/۰۸۸، ۰/۰۴۴، ۰/۰۲۲ گرم بر لیتر) را بر درصد بازدارندگی نشان می دهد. غلظت های عصاره چای سبز و چای سیاه در سمت چپ نمودار و غلظت های ویتامین C در سمت راست نمودار مشخص شده اند. با افزایش غلظت، میانگین درصد بازدارندگی برای ویتامین C و غلظت های عصاره ها افزایش یافته است. ویتامین C با غلظت ۰/۱۷۶ گرم بر لیتر و غلظت ۱۰۰ گرم بر لیتر هر دو عصاره نیز با اختلاف کمی از غلظت ۵۰ گرم بر لیتر بیشترین درصد بازدارندگی را نشان دادند. هرچه درصد بازدارندگی بالاتر باشد به معنای خاصیت آنتی اکسیدانی بالا است. همچنان که نمودار نشان می دهد خاصیت آنتی اکسیدانی هر دو عصاره چای سبز و سیاه قابل مقایسه با بالاترین غلظت ویتامین C است. خاصیت آنتی اکسیدانی چای سبز بیشتر از چای سیاه است که تفاوت معنی دار است. می توان به طور کلی نتیجه گیری کرد ظرفیت مهار رادیکال های آزاد در غلظت ۱۰۰ گرم در لیتر عصاره چای سیاه و چای سبز تقریباً برابر ظرفیت مهار رادیکال های آزاد غلظت ۰/۱۷۶ گرم در لیتر ویتامین C خالص

است. برای محاسبه EC_{50} از رابطه خطی بین غلظت ترکیب و درصد مهار، استفاده شد. با استفاده از معادله‌های به‌دست آمده از این نمودارها، EC_{50} برای عصاره‌های چای سبز، سیاه و ویتامین C محاسبه شد. در جدول ۵، EC_{50} نشان داده شده است.

جدول ۵ - فعالیت مهار رادیکال DPPH (EC_{50}) در برگ چای سبز، چای سیاه و ویتامین C

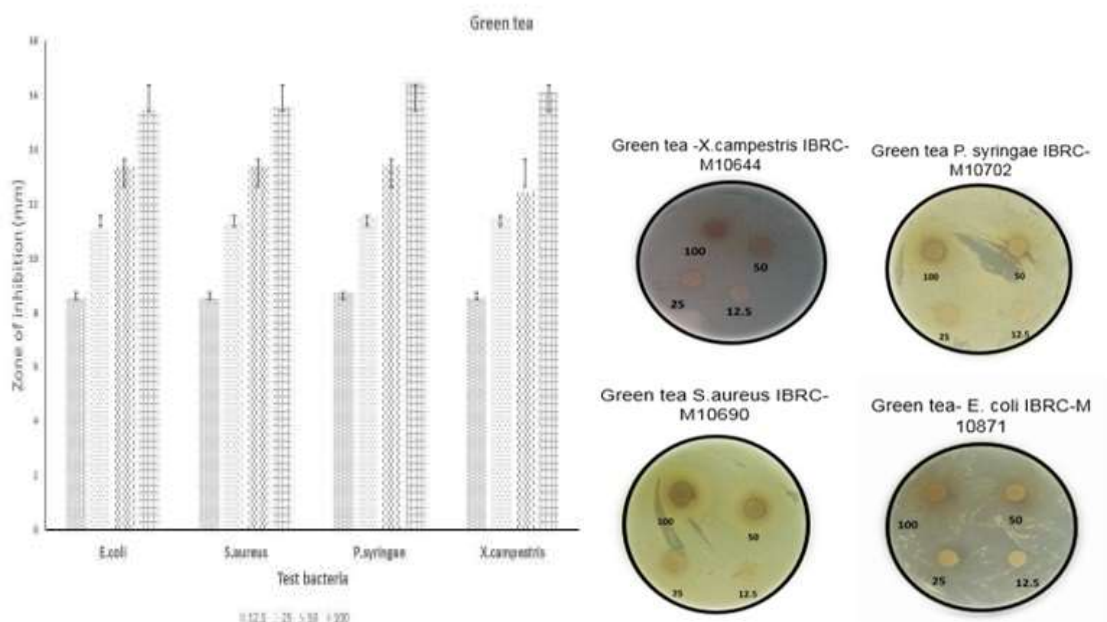
Table 5- DPPH radical inhibitory activity (EC_{50}) by green and black tea leaves and vitamin C

نمونه	EC_{50} (g/l)
عصاره چای سبز	۲۸/۸۷۵ g/l
عصاره چای سیاه	۴۴/۲۲۲ g/l
ویتامین C	۰/۱۲۵ g/l

جدول ۵، مقادیر EC_{50} را در نمونه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. میزان EC_{50} در ویتامین C دارای کمترین مقدار، معادل ۰/۱۲۵ گرم بر لیتر و میزان EC_{50} عصاره چای سیاه دارای بیشترین مقدار، معادل ۴۴/۲۲۲ گرم بر لیتر است. طبق تعریف، EC_{50} پایین، نشان دهنده خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا/ست. داده‌های مرتبط با EC_{50} نشان می‌دهد ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد توسط عصاره چای سبز با مقدار اندازه گیری شده ۲۸/۸۵۷ گرم در لیتر ۱/۵۳ برابر ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد عصاره چای سیاه با مقدار اندازه گیری شده ۴۴/۲۲۲ گرم بر لیتر است. یعنی خاصیت آنتی‌اکسیدانی چای سبز یک و نیم برابر چای سیاه است.

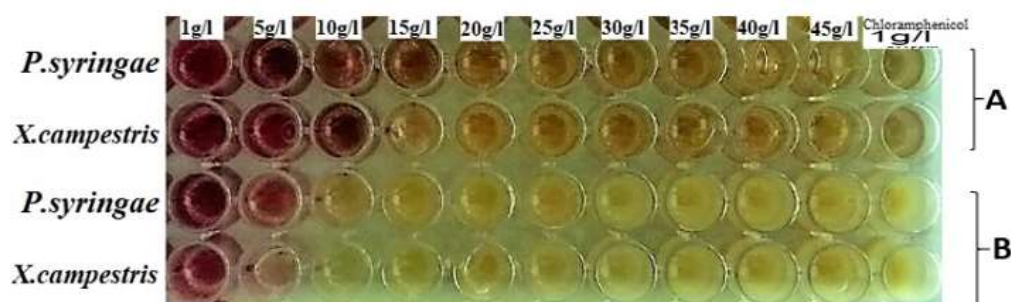
اثرات ضد میکروبی: به‌منظور ارزیابی خاصیت ضد میکروبی عصاره چای سبز و چای سیاه دو گونه باکتری پاتوژن انسانی و دو گونه باکتری پاتوژن گیاهی انتخاب شدند. *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان باکتری گرم مثبت و *اشریشیا کلی* به‌عنوان باکتری گرم منفی که هر دو پاتوژن انسانی محسوب می‌شوند و *زانتوموناس کامپستریس* و *سودوموناس سیرینگیه* از پاتوژن‌های گیاهی با روش انتشار دیسک و تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

شکل ۵ و شکل ۶، نشان دهنده اثر مهار عصاره‌ی چای سبز در برابر سویه‌های مختلف پاتوژن‌های بیماری‌زا و باکتری‌های گیاهی است. عصاره‌ی چای سبز کمترین اثر مهار را در برابر باکتری‌های *زانتوموناس کامپستریس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۰ تا ۱۵ میلی متر از خود نشان داد. بیشترین میزان مهارکنندگی هم‌علیه باکتری *سودوموناس سیرینگیه* با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۵ تا ۱۷ میلی متر بود. ارزیابی اثرات ضد میکروبی عصاره چای سیاه با روش انتشار دیسک نتایج قابل‌ارائه نشان نداد. نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) در شکل (۴) نشان داده شده است. هر کدام از سویه‌های باکتریایی دارای MIC مختص به خود بوده که مقادیر آن در جدول (۶) نشان داده شده است.

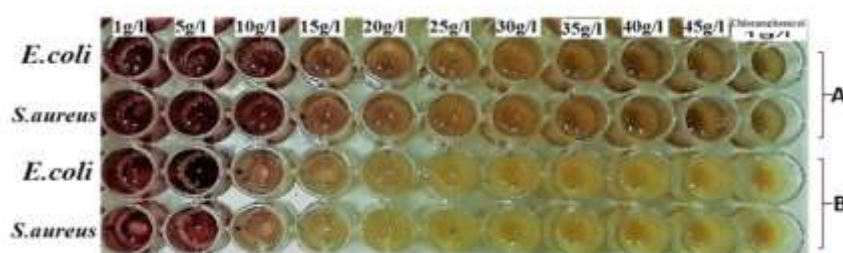


شکل ۵- نتایج اثر مهاری عصاره‌ی چای‌سبز علیه برخی سویه‌های باکتریایی به روش‌های انتشار در آگار

Figure 5. The results of the inhibitory effect of green tea extract against some bacterial strains by diffusion methods in agar



(a)



(b)

شکل ۶- تعیین میزان MIC عصاره‌های چای‌سبز و سیاه در برابر سویه‌های باکتریایی بیماری‌زا. A عصاره چای سیاه. B عصاره چای‌سبز. a پاتوژن گیاهی b پاتوژن انسانی.

Figure 6. Determination of MIC of green and black tea extracts against pathogenic bacterial strains. A black tea extract. B green tea extract. a. Plant pathogen. b. Human pathogen.

جدول ۶- نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

Table 6- The results of determining the minimum inhibitory concentration (MIC)

Pathogenic bacteria	Minimum inhibitory concentration extract (mg/ml)	
	Black tea	Green tea
<i>E. coli</i> IBRC-M 10871	15	5
<i>S. aureus</i> IBRC-10690	10	5
<i>P. syringae</i> IBRC- M10702	5	5
<i>X. campestris</i> IBRC-644	10	1

جدول ۶ نشان می‌دهد حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سبز در برابر اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس سیرینگه با غلظت پنج میلی گرم بر لیتر به طور معنی دار سه برابر بیشتر از مهارکنندگی عصاره چای سیاه با غلظت پانزده میلی گرم در لیتر است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سبز در برابر زانتوموناس کمپستریس با غلظت یک میلی گرم در لیتر نشان می‌دهد این باکتری بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره چای سبز نشان داده و قدرت مهارکنندگی عصاره چای سبز در برابر زانتوموناس کمپستریس به طور معنی دار بسیار بیشتر از سه باکتری دیگر است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر سودوموناس سیرینگه با غلظت پنج میلی گرم بر لیتر به طور معنی دار بیشتر از مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، زانتوموناس کمپستریس است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر سودوموناس سیرینگه با غلظت یک میلی گرم در لیتر نشان می‌دهد این باکتری بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره چای سیاه نشان داده و قدرت مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر سودوموناس سیرینگه به طور معنی دار بسیار بیشتر از سه باکتری دیگر است.

پژوهش‌های متمرکز بر شناسایی و معرفی ترکیبات ضدباکتریایی طبیعی با منشأ گیاهی و کاربردهای احتمالی آن‌ها در کشاورزی برای کنترل بیماری‌های باکتریایی در حال افزایش است. فراورده‌های گیاهی طبیعی و فعال بیولوژیکی مانند اسانس و عصاره می‌توانند جایگزین سموم غیرطبیعی و سنتزی شده و به عنوان ترکیبات جدید و مؤثر در کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای گیاهی استفاده گردند. اسانس‌ها، فراورده‌های معطر و فرار نتیجه متابولیسم ثانویه یک گیاه معطر بوده، به طور معمول در سلول یا گروه‌های سلولی خاص تشکیل می‌شوند. اسانس‌ها عمدتاً از مونوترپن‌ها، سزکوئی‌ترپن‌ها و مشتقات اکسیژنه آنها (الکل، آلدئید، استر، کتون، فنل و اکسید) تشکیل شده‌اند. اثرات ضد میکروبی، ضدباکتریایی، ضد قارچی، آنتی لیشمانیا (antileishmanial) و اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره چای سبز و چای سیاه در پژوهش‌های متعددی ارزیابی شده‌است.

اثرات آنتی اکسیدانی (پاداکسایندگی): آنتی اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که باعث محافظت در برابر آسیب سلولی ناشی از مولکول‌هایی به نام رادیکال‌های آزاد می‌شوند. DPPH به عنوان یک معرف برای بررسی مهار رادیکال آزاد توسط عصاره به کار می‌رود. DPPH که یک رادیکال آزاد ارغوانی رنگ است، در تماس با ترکیب آنتی اکسیدان (عصاره یا ویتامین C) به ترکیب پایدار زرد رنگی تبدیل می‌شود. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار نیتروژن دار است که رنگ آن از طریق فرایند الکترون گیری هیدروژنی از بنفش تا زرد تغییر می‌یابد. موادی که قادر به انجام این واکنش هستند می‌توانند به عنوان آنتی اکسیدان‌ها و به همین ترتیب مهارکننده‌های رادیکال‌های آزاد در نظر گرفته شوند (Sung *et al.*, 2000). در این پژوهش ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره متانولی چای سبز، چای سیاه و ویتامین C در غلظت‌های مختلف بررسی شد.

سانگ و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که ظرفیت آنتی اکسیدانی نهایی پلاسمای انسانی پس از مصرف ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی لیتر از چای سبز افزایش چشمگیری دارد (Sung *et al.*, 2000). چان و همکاران (۲۰۱۱) فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های متانولی برخی از گیاهان دارویی را با روش احیا رادیکال‌های آزاد با استفاده از DPPH ارزیابی کرده و نشان دادند فعالیت آنتی اکسیدانی چای سبز بیشتر است (Chan *et al.*, 2011).

نظری و همکاران (۱۳۹۵) جهت بررسی زمان پایداری روغن‌ها (آفتابگردان، کانولا، زیتون و تالو) به اکسیداسیون، از عصاره چای سیاه استفاده کردند. به این منظور عصاره چای سیاه با سه روش استخراج با متانول، اتانول و آبی تهیه گردید. نتایج نشان داد که استخراج آبی مؤثرترین عصاره از نظر ظرفیت آنتی اکسیدانی را ایجاد کرده است. غلظت‌های مختلف عصاره چای، خاصیت آنتی اکسیدانی داشته و روند اکسیداسیون را کاهش دادند (Nazari *et al.* 2016). Khalaf (۲۰۰۸) عصاره متانولی برخی از گیاهان دارویی را جهت به دام انداختن رادیکال آزاد بررسی نمودند. نتایج نشان داد که فعالیت آنتی اکسیدانی چای سبز بیشتر از چای سیاه و سایر گیاهان است (Khalaf *et al.*, 2008). العبیدی و همکاران (۲۰۱۵) فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های آبی چای سفید، سبز و سیاه با سه روش احیا رادیکال آزاد (DPPH) روش آنتی اکسیدان احیا کننده آهن (FRAP) و ظرفیت آنتی اکسیدان معادل (TRAC) ارزیابی کردند. نتایج روش احیا رادیکال آزاد نشان داد که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدان مربوط به چای سفید است. عصاره‌های آبی چای سبز و سیاه نیز فعالیت آنتی اکسیدانی چشمگیری داشتند (Al-Obaidi & Sahib, 2015).

فخاری و همکاران (۲۰۱۵) فعالیت آنتی اکسیدانی چهار عصاره چای مختلف را با روش DPPH بررسی نمودند. نتایج نشان داد تفاوت چشمگیری بین فعالیت آنتی اکسیدانی چای سبز، سفید، سیاه و قرمز وجود دارد. فعالیت آنتی اکسیدانی چای سبز بیشتر از چای سفید، سیاه و قرمز بود (Fakheri *et al.*, 2015).

فعالیت آنتی اکسیدانی گیاهان را می‌توان عمدتاً به حضور ترکیبات فنلی در آن‌ها نسبت داد. ترکیبات فنلی تقریباً در تمام بخش‌های گیاه وجود دارند و در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک مانند رشد سلولی، جوانه‌زنی دانه و رسیدن میوه نقش

دارند. از مهم‌ترین خصوصياتی که به این گروه نسبت داده می‌شود، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده که به آن‌ها امکان از دست دادن هیدروژن و به دام انداختن رادیکال آزاد را می‌دهد. فنل‌ها و فلاونوئیدها به‌طور گسترده‌ای در محصولات غذایی تولید شده از منابع گیاهی یافت می‌شود و نشان داده شده‌است که فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند.

یافته‌های ما نشان داد که عصاره چای سبز و سیاه خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته و با افزایش غلظت‌های مختلف از عصاره، IC_{50} آن‌ها کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا است. غلظت ۱۰۰ گرم بر لیتر عصاره چای سبز، بیشترین درصد مهار رادیکال آزاد را نشان داد. ویتامین C به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد که کمترین IC_{50} را دارد. ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد در غلظت ۱۰۰ گرم در لیتر عصاره چای سیاه و چای سبز تقریباً برابر ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد غلظت ۰/۱۷۶ گرم در لیتر ویتامین C خالص است. مقایسه تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون دانکن میانگین‌های مربوط به غلظت‌های عصاره و ویتامین C نمودار شماره را به هشت گروه دسته‌بندی نمود. بین همه تیمارها و غلظت‌ها تفاوت معنی دار وجود دارد. در مقایسه بین غلظت‌های عصاره، غلظت ۱۰۰ گرم بر لیتر در هر دو عصاره بیشترین درصد بازدارندگی رادیکال آزاد را نشان داد. با کاهش غلظت درصد مهار شدن رادیکال آزاد هم کاهش یافته‌است. در مقایسه بین دو عصاره، عصاره چای سبز درصد مهارکنندگی بالاتری دارد. ویتامین C به‌عنوان کنترل مثبت بیشترین درصد مهار معادل ۰/۱۲۵ گرم بر لیتر را نشان داد (EC_{50}). با کمتر شدن غلظت آن، درصد مهار و بازدارندگی آن هم کاهش می‌یابد.

بسیاری از اثرات درمانی و پیشگیری مرتبط با مصرف چای سبز و چای سیاه را می‌توان مرتبط با این ظرفیت نسبتاً بالای مهار رادیکال‌های آزاد در نظر گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد چای سبز به‌طور معنی دار یک و نیم برابر بیشتر از چای سیاه است.

اثرات ضدباکتریایی: مقاومت میکروبی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و اثرات مخرب افزودنی‌ها و مواد نگهدارنده غذایی از مشکلات رایج سیستم بهداشتی و درمانی است که کنترل و رفع آن‌ها دستیابی به گروه جدیدی از ترکیبات ضد میکروبی را ضروری می‌سازد. در این راستا ترکیبات مشتق از عصاره‌های گیاهی به‌عنوان منابع بالقوه مهم حائز اهمیت زیادی هستند. بنابراین با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر میکروارگانیسم‌ها و ضرورت شناسایی و معرفی ترکیبات جدید مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات ضد میکروبی عصاره‌های چای سبز و سیاه انجام گرفت.

اخیراً پژوهش‌های متعددی با هدف شناسایی و معرفی مواد ضد میکروبی با منشأ گیاهی انجام شده‌است، گیاهان ترکیباتی با ساختار مولکولی پیچیده می‌سازند که برخی از آن‌ها با خواص ضد میکروبی گیاهی مرتبط هستند. آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدها، پلی ترپنوئیدها، ترکیبات آروماتیک و سزکوئی ترپن‌ها و ترکیبات فنلی از جمله این

متابولیت‌های ثانویه هستند که خواص ضد میکروبی دارند. چالش جدید، رشد روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه های باکتریایی است. ترکیبات ضد میکروبی گیاهی، می تواند جایگزین مناسبی برای درمان این آلودگی ها باشد.

تودا و همکاران (۱۹۸۹) نشان دادند که مصرف روزانه چای سبز منجر به از بین رفتن میکروارگانیسم های بیماری زا همچون *استافیلوکوکوس اورئوس*، *ویبریو پارا همولیتیکا*، *کلستریدیوم پرفرنژنس* و *باسیلوس سرئوس* می شود (Toda et al., 1989). ساکاناکا و همکاران (۲۰۰۰) فعالیت مهارکنندگی رشد اسپورهای باکتریایی توسط پلی فنل های چای را مورد بررسی قرار دادند. اپی گالاکاتچین جزء اصلی پلی فنل های چای فعالیت شدیدی در برابر اسپورهای باکتریایی از خود نشان داد (Sakanaka et al., 2000).

بیماری نواری باکتریایی گندم یکی از مهم ترین بیماری های باکتریایی بذر زاد گندم در نواحی گرم و مرطوب است که به وسیله باکتری *زانتوموناس ترانسلوسنس* ایجاد می شود. بیگی و علیزاده (۱۳۸۲) اثر ضد میکروبی عصاره گیاهان مختلف از جمله سیر، اسپند، اکلیل کوهی، جaro و داتوره را با روش انتشار در چاهک بررسی کردند. نتایج نشان داد که عصاره های بررسی شده، اثرات ضد باکتریایی تقریباً یکسانی در برابر باکتری های مورد آزمایش دارا هستند (Beyki & Alizadeh, 2006). چان و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره های آبی چای سبز، چای سیاه و چای کوهی به این نتیجه رسیدند که این عصاره ها اثرات مهاری بر باکتری گرم مثبت دارند اما بر باکتری گرم منفی اثر مهاری ندارند (Chan et al., 2011). نادری و همکاران (۲۰۱۱) در آزمایشی اثر عصاره متانولی چای سیاه و سبز را بر روی باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* (عامل پوسیدگی دندان) بررسی نمودند. نتایج نشان داد هر دو عصاره چای سبز و سیاه ایرانی در غلظت های ۱۰۰ تا ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر اثرات ضد باکتریایی دارند و فعالیت ضد باکتریایی چای سیاه ایرانی علیه این باکتری بیشتر است (Naderi et al., 2011). مهتا و همکاران (۲۰۱۶) آزمایشی برای ارزیابی و مقایسه فعالیت ضد باکتریایی عصاره های مختلف چای سبز و سیاه علیه گونه های باکتریایی انجام دادند. فعالیت ضد باکتریایی عصاره های آبی، متانولی، اتانولی و استونی چای سبز و سیاه با روش انتشار در آگار بر روی باکتری های *شریشیاکلی*، *استافیلوکوک اورئوس* و *سودوموناس آئروژنوزا* بررسی شد. عصاره های چای سبز بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را نسبت به عصاره های چای سیاه داشتند. عصاره ی آبی چای سبز و عصاره متانولی چای سیاه، بیشترین تأثیر را داشتند (Mehta et al., 2016). شاجانا و گیتا (۲۰۱۷) به بررسی و مقایسه اثرات ضد میکروبی چای سیاه، سبز و سفید بر *استرپتوکوکوس موتانس* پرداختند. در این تحقیق پتانسیل فعالیت ضد میکروبی عصاره های آبی برگ بررسی شد. آزمایش حداقل غلظت مهاری علیه باکتری *استرپتوکوک* انجام شد. *استرپتوکوکوس موتانس* آغازگر و دلیل اصلی بیماری های دندان در سطح جهان است. نتایج نشان داد عصاره چای سبز، سیاه و سفید خواص ضد میکروبی منحصر به فردی دارند (Shagana & Geetha, 2017). فخاری و همکاران (۲۰۱۵) اثرات ضد میکروبی عصاره چای در برابر هشت نوع از باکتری را با تکنیک میکرودايلوشن ارزیابی کردند. نتیجه این بررسی نشان داد که عصاره های چای سبز و سیاه بالاترین محتوای فنلی و

فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشته و یک رابطه مثبت قوی بین محتوای فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در چای قرمز و سبز مشاهده گردید. همه‌ی عصاره‌های چای میکروارگانیزم‌های مختلف را مهار کردند. با این‌وجود باکتری‌های گرم منفی بیشترین مقاومت را به اثرات مهاری عصاره‌های چای نشان دادند. عصاره‌های چای غیر تخمیری بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثرات مهاری علیه باکتری‌ها را نشان دادند. عصاره‌های چای در غلظت‌های مختلف رشد میکروب‌ها را مهار کرده و چای سفید و سبز کمترین مقدار MIC (کمترین غلظت مهارکنندگی) علیه باکتری‌های مورد مطالعه را داشتند (Fakheri *et al.* 2015). نیستانی (۱۳۸۵) اثر مهاری عصاره چای‌سبز و سیاه را بر رشد باکتری اشریشیاکلی بیماری‌زا در محیط آزمایشگاه بررسی کردند. یافته‌ها نشان داد که توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی چای‌سبز در مقایسه با چای سیاه به‌طرز معنی داری بالاتر است و اثرات مهاری چای مستقیماً به توان آنتی‌اکسیدانی آن مربوط است (Neyestani, 2007). نیستانی (۱۳۸۶) اثر مهاری چای سیاه بر رشد باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* و مقایسه‌ی آن با چای‌سبز در محیط آزمایشگاه را بررسی نمودند. ملاحظه شد که توان آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی چای‌سبز در مقایسه با عصاره‌ی چای سیاه به‌طور معنی‌داری بالاتر است. اثر مهاری چای مستقیماً به توان آنتی‌اکسیدانی آن مربوط می‌شود و پلی‌فنل‌های چای با تولید پراکسید هیدروژن به‌صورت پرو اکسیدان عمل کرده و از این طریق، اثر مهاری خود را بر رشد باکتری اعمال می‌کنند. تحقیقات نشان داده که پلی‌فنل‌های گیاهی یا تانن‌ها از طریق اتواکسیداسیون و تولید پراکسید هیدروژن، اثر مهاری خود را روی رشد یاخته اعمال می‌کنند (Neyestani *et al.* 2007).

محمودی و همکاران (۱۳۸۹) اثر ضدباکتریایی اسانس و عصاره آبی گیاهان دارویی بر باکتری‌های عامل شانکر و لکه برگ‌ی درختان میوه هسته‌دار را بررسی نمودند. شانکر و لکه برگ‌ی باکتریایی درختان میوه هسته‌دار به‌وسیله باکتری‌های *سودوموناس سیرینگیه* و *زانتوموناس/ریوریکولا* ایجاد می‌شوند. نتایج نشان دادند که بین اسانس‌ها و عصاره‌ها در بازداری از رشد باکتری‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد. با توجه به اثرات سوء سموم کشاورزی بر اکوسیستم‌های زیستی استفاده از ترکیبات ضد میکروبی بی‌خطر از جمله اسانس و عصاره‌های گیاهان دارویی امری ضروری به نظر می‌رسد (Mahmoudi *et al.* 2010).

شکل ۴ اثر مهاری عصاره‌ی چای‌سبز را در برابر سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه به‌روش انتشار در دیسک نشان می‌دهد. با افزایش غلظت عصاره در مورد هر چهار سویه باکتری قطر هاله عدم رشد افزایش نشان می‌دهد که تایید کننده این است که توانایی مهارکنندگی عصاره چای‌سبز وابسته به غلظت بوده و نسبت مستقیم با آن دارد. یعنی هرچه غلظت عصاره بیشتر می‌شود توانایی مهار رشد و اثر ضد باکتریایی آن افزایش می‌یابد. هم در غلظت‌های کم و هم در غلظت‌های زیاد عصاره چای‌سبز بیشترین اثر مهاری را در برابر *سودوموناس سیرینگیه* نشان می‌دهد. در مقابل هم در غلظت‌های کم و هم در غلظت‌های زیاد در مقایسه با چهار سویه باکتری مورد مطالعه عصاره چای‌سبز کمترین اثر مهارکنندگی رشد را در برابر *زانتوموناس کامپستریس* نشان می‌دهد.

یافته‌های این پژوهش نشان داد که عصاره‌های چای سبز در غلظت‌های مختلف به‌روش انتشار دیسک بر روی باکتری‌های گرم مثبت، منفی و باکتری‌های گیاهی اثر بازدارنده دارد. با افزایش غلظت، قطر هاله عدم رشد افزایش می‌یابد. بیشترین قطر هاله عدم رشد در هر چهار باکتری مربوط به غلظت ۱۰۰ گرم بر لیتر و کمترین مربوط به غلظت ۱۲/۵ گرم بر لیتر است.

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سبز در برابر *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس سیرینگه* با غلظت پنج میلی گرم بر لیتر به‌طور معنی‌دار سه برابر بیشتر از مهارکنندگی عصاره چای سیاه با غلظت پانزده میلی گرم در لیتر است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سبز در برابر *زانتوموناس کمپستریس* با غلظت یک میلی گرم در لیتر نشان‌می‌دهد این باکتری بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره چای سبز نشان داده و قدرت مهار کنندگی عصاره چای سبز در برابر *زانتوموناس کمپستریس* به‌طور معنی‌دار بسیار بیشتر از سه باکتری دیگر است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر *سودوموناس سیرینگه* با غلظت پنج میلی گرم بر لیتر به‌طور معنی‌دار بیشتر از مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *زانتوموناس کمپستریس* است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر *سودوموناس سیرینگه* با غلظت یک میلی گرم در لیتر نشان‌می‌دهد این باکتری بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره چای سیاه نشان داده و قدرت مهار کنندگی عصاره چای سیاه در برابر *سودوموناس سیرینگه* به‌طور معنی‌دار بسیار بیشتر از سه باکتری دیگر است. میزان MIC عصاره چای سبز در برابر سویه‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس سیرینگه* پنج میلی گرم بر میلی لیتر بوده و سه برابر قویتر از چای سیاه ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر است. بدین معنی که اثرات ضد میکروبی عصاره چای سبز در برابر این سویه‌ها نسبت به چای سیاه سه برابر بیشتر است. بیشترین اثر ضد میکروبی چای سبز با یک در برابر *زانتوموناس کمپستریس* مشاهده شد. دیگر سویه‌ها کمترین توانایی مهارکنندگی را نشان‌می‌دهد. در مورد دیگر سویه‌ها یعنی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس سیرینگه* و *زانتوموناس کمپستریس* و حداقل غلظت مهارکنندگی در یک میلی گرم بر میلی لیتر بوده و نشان دهنده توانایی مهارکنندگی تقریباً یکسان عصاره‌های چای سبز در برابر این سه سویه است. میزان MIC عصاره چای سبز بر روی سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق در مورد *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس سیرینگه* یکسان و برابر و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر است. در مورد *زانتوموناس کمپستریس* نیز حداقل غلظت مهارکنندگی در محدوده یک میلی گرم بر میلی لیتر بود که نشان دهنده توانایی مهار کنندگی نسبتاً بالای عصاره در برابر این سویه است. مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره در برابر پاتوژن‌های گیاهی و انسانی نشان‌می‌دهد که توانایی مهارکنندگی عصاره در برابر پاتوژن‌های گیاهی به‌طور نسبی و معنی‌دار بیشتر از پاتوژن‌های انسانی است. استفاده از پسماند چای سبز و چای سیاه برای کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی نیز می‌تواند به‌عنوان یک ایده پژوهشی مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این پژوهش ترکیب اصلی تشکیل دهنده عصاره چای سبز شامل کافئین (۸۲/۹۷ درصد)، و ترکیب اصلی عصاره چای سیاه نیز کافئین (۸۶/۲۵ درصد) است. کافئین چای سیاه سه و نیم درصد بیشتر از چای سبز است. کافئین در هر دو عصاره بالاترین درصد را داشته و بیشترین ترکیب است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز و سیاه قابل مقایسه با ویتامین C است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی چای سبز به‌طور معنی‌دار بیشتر از چای سیاه است. ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد در غلظت ۱۰۰ گرم در لیتر عصاره چای سیاه و چای سبز تقریباً برابر ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد غلظت ۰/۱۷۶ گرم در لیتر ویتامین C خالص است. داده‌های مرتبط با EC₅₀ نشان می‌دهد ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد چای سبز ۲۸/۸۵۷ گرم در لیتر ۱/۵۳ برابر چای سیاه ۴۴/۲۲۲ گرم بر لیتر است. یعنی خاصیت آنتی‌اکسیدانی چای سبز یک و نیم برابر چای سیاه است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سبز در برابر *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس* / *اورئوس*، *سودوموناس* سیرینگه با غلظت پنج میلی گرم بر لیتر به‌طور معنی‌دار سه برابر بیشتر از مهارکنندگی عصاره چای سیاه با غلظت پانزده میلی گرم در لیتر است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سبز در برابر *زانتوموناس* کمپستریس با غلظت یک میلی گرم در لیتر نشان می‌دهد این باکتری بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره چای سبز دارد و قدرت مهارکنندگی عصاره چای سبز در برابر *زانتوموناس* کمپستریس به‌طور معنی‌دار بسیار بیشتر از سه باکتری دیگر است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر *سودوموناس* سیرینگه با غلظت پنج میلی گرم بر لیتر به‌طور معنی‌دار بیشتر از مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس* / *اورئوس*، *زانتوموناس* کمپستریس است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر *سودوموناس* سیرینگه با غلظت یک میلی گرم در لیتر نشان می‌دهد این باکتری بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره چای سیاه نشان داده و قدرت مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر *سودوموناس* سیرینگه به‌طور معنی‌دار بسیار بیشتر از سه باکتری دیگر است.

به‌طور خلاصه خاصیت آنتی‌اکسیدانی چای سبز به‌طور معنی‌دار بیشتر از چای سیاه است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی چای سبز یک و نیم برابر چای سیاه است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سبز در برابر *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس* / *اورئوس*، *سودوموناس* سیرینگه به‌طور معنی‌دار سه برابر بیشتر از مهارکنندگی عصاره چای سیاه است. باکتری *زانتوموناس* کمپستریس بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره چای سبز نشان داده و قدرت مهارکنندگی عصاره چای سبز در برابر *زانتوموناس* کمپستریس به‌طور معنی‌دار بیشتر از سه باکتری دیگر است. باکتری *سودوموناس* سیرینگه بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره چای سیاه نشان داده و قدرت مهارکنندگی عصاره چای سیاه در برابر *سودوموناس* سیرینگه به‌طور معنی‌دار بیشتر از سه باکتری دیگر است.

سپاسگزاری

نویسندگان از همراهی و همکاری کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی خانم شهناز زارعی و کارشناس آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی آقای عادل محمدی در انجام این پژوهش کمال سپاس‌گزاری و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که در رابطه با انتشار این مقاله به‌طور کامل از اصول اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافع تجاری در این راستا وجود ندارد و نویسندگان در قبال ارائه اثر خود وجهی دریافت ننموده‌اند.

منابع

- Al-Obaidi, R. S., & Sahib, D. (2015). Determination of antioxidants activity in tea extract. *Amer. J. Biochem*, 5(3), 49-52.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H., & Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(4), 1563-1589.
- Balentine, D. A., Wiseman, S. A., & Bouwens, L. C. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 37(8), 693-704.
- Bruno, R. S., Bomser, J. A., & Ferruzzi, M. G. (2014). Antioxidant capacity of green tea (*Camellia sinensis*). In *Processing and impact on antioxidants in beverages* (pp. 33-39). Academic Press.
- Bowersox, J. (1999). Experimental staph vaccine broadly protective in animal studies. *NIH News*, 27.
- Beyki, F., & Alizadeh, A. (2006). Antibacterial effects of some herbal essential oils and plant extracts on the causal agent of bacterial leaf streak in wheat and barley. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 13(5)70-82.
- Bajpai, V. K., Kang, S. R., Xu, H. J., Lee, S. G., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2011). Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* species: a review. *Plant Pathology Journal*, 27(3), 207-224.
- Cabrera, C., Artacho, R., & Giménez, R. (2006). Beneficial effects of green tea—a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 79-99.
- Chan, E. W., Soh, E. Y., Tie, P. P., & Law, Y. P. (2011). Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Research*, 3(4), 266.
- Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., & Nishigaki, I. (2010). Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chinese medicine*, 5(1), 1-9.
- Dalluge, J. J., & Nelson, B. C. (2000). Determination of tea catechins. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 411-424.

- Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta medica*, 64(08), 711-713.
- Fakheri, B. A., Bagheri, S., & Mahdi Nezhad, N. (2015). Comparison of antimicrobial and antioxidant activities of four different tea extracts. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*, 3(3), 57-61.
- Hamilton-Miller, J. M. (1995). Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(11), 2375-2377.
- Haidarizadeh, M., Hemati, M., & Ashengroph, M. (2022). Comparison of antimicrobial effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and essential oil on plant's pathogens (*Xanthomonas compestris* and *Pseudomonas syringe*) and human's pathogens (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*). *Applied Biology*, (in press), -. doi: 10.22051/jab.2022.39594.1471
- Haidarizadeh, M., Lotfi, V. and Ghanei alvar, M. (2018). Evaluation of chemical compounds, antibacterial and allelopathic properties of cedar leaf extract (*Cupressus arizonica*). *Journal of Plant Research*, 31, (1), 72-81
- Haidarizadeh, M., Zareie, S., Ashengroph, M., and Maroofi, H. (2020). Chemical Composition and Biological effects of (*Koma*) *Ferula oopoda*. *Journal of Plant Research*, 33, (4), 854-863
- Kluytmans, J., Van, Belkum A. and Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews*.;10(3)), 505-20
- Koech, K. R., Wachira, F. N., Ngure, R. M., Wanyoko, J. K., Bii, C. C., Karori, S. M., & Kerio, L. C. (2017). Antimicrobial, synergistic and antioxidant activities of tea polyphenols. South Eastern Kenya University. (SEKU), digital repository. <http://repository.seku.ac.ke/>
- Khalaf, N. A., Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., & Farah, H. (2008). Antioxidant activity of some common plants. *Turkish Journal of Biology*, 32(1), 51-55.
- Mahmoudi, H. A. D. I., Rahnema, K., & Arabkhani, M. A. (2010). Antibacterial effect essential oil and extracts of medicinal plant on the causal agents of bacterial canker and leaf spot on the stone fruit tree. *Journal of Medicinal Plants*, 9(36), 34-42.
- Malakar, M. (2014). Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* isolated from urine and stool samples of an infected patient's in the Lakhimpur district of Assam, India.
- Mehta, A., Saxena, G., & Mani, A. (2016). Comparative analysis of antibacterial activity of aqueous, ethanolic, methanolic and acetone extracts of commercial green tea and black tea against standard bacterial strains. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(11), 145-152.
- Mori, M., Sogou, K. and Inoue, Y. (2019). Development of a selective medium and antisera for *Pseudomonas syringae* PV. *syringe* from seeds of barley and wheat. *Journal of General Plant Pathology*.;85(3)), pp.211-20.
- Naderi, N. J., Niakan, M., Fard, M. K., & Zardi, S. (2011). Antibacterial activity of Iranian green and black tea on *streptococcus mutans*: an in vitro study. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, 8(2), 55.
- Nazari, Z., Gharachorloo, M., & Elhamirad, A. H. (2016). Evaluation of the Antioxidative Effects of Black Tea Extracts. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 14(1), 23-34.

- Neyestani, T. (2007). The inhibitory effects of black and green teas (*Camellia sinensis*) on growth of pathogenic *Escherichia coli* in vitro. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 1(3), 33-38.
- Neyestani, T., & Khalaji, N. (2007). Inhibitory effects of black tea (*Camellia sinensis*) extracts on *Streptococcus pyogenes*: A comparison between black and green teas in vitro. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 2(1), 41-47.
- Sakanaka, S., Juneja, L. R., & Taniguchi, M. (2000). Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *Journal of bioscience and bioengineering*, 90(1), 81-85.
- Senanayake, S. N. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications—A review. *Journal of functional foods*, 5(4), 1529-1541.
- Shagana, J. A., & Geetha, R. (2017). Comparative analysis of antimicrobial activity of black tea, green tea and white tea extracts on *Streptococcus mutans* by tube dilution method. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(9), 1581.
- Sharangi, A. B. (2009). Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) —A review. *Food research international*, 42(5-6), 529-535.
- Singh, D., Dhar, S., & Yadava, D. K. (2011). Genetic and pathogenic variability of Indian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot disease in crucifers. *Current microbiology*, 63(6), 551-560.
- Sung, H., Nah, J., Chun, S., Park, H., Yang, S. E., & Min, W. K. (2000). In vivo antioxidant effect of green tea. *European journal of clinical nutrition*, 54(7), 527-529.
- Toda, M., Okubo, S., Ohnishi, R., & Shimamura, T. (1989). Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. *Nihon saikingaku zasshi. Japanese journal of bacteriology*, 44(4), 669-672.
- Znati, M., Filali, I., Jabrane, A., Casanova, J., Bouajila, J., & Ben Jannet, H. (2017). Chemical Composition and In Vitro Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Antigerminative Properties of the Seed Oil from the Tunisian Endemic *Ferula tunetana* Pomel ex Batt. *Chemistry & biodiversity*, 14(1), e1600116.

Comparison of chemical compounds, antioxidant and antimicrobial effects of *Camellia sinensis* black tea and green tea leaf extract on plant pathogenic bacteria (*Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*) and human pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*)

Masoud Haidarizadeh^{*1}, Fatemeh Alijani², Morahem Ashengroph³, Sajjad Atashi²

Introduction: Identifying and introducing new natural antimicrobial compounds against pathogenic agents is of concern to researchers. The present study was conducted with the aim of comparing the chemical compounds, antimicrobial and antioxidant effects of black and green tea. Methods: Aqueous and methanolic extracts of black and green tea leaves were prepared and the compounds of the methanolic extracts were identified by GC-Mass, antibacterial effects were measured by the disk diffusion method, the minimum inhibitory concentration (MIC) the antioxidant property by the DPPH method. Results and discussion: Caffeine is the main component of green and black tea extracts, and its amount is 82.97 percent and 86.25 percent in these extracts, respectively. The minimum inhibitory concentration of green tea extract against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas syringae* (5mg/L) is significantly three times higher than that of black tea extract (15 mg/L). The inhibitory capacity of green tea extract against *Xanthomonas campestris* and the inhibitory capacity of black tea extract against *Pseudomonas syringae* is significantly higher than the other bacteria. Many of the effects related to green and black tea can be considered related to the relatively high capacity of inhibiting free radicals. The results of this research showed that the free radical and antioxidant capacity of green tea (EC₅₀, 28.875) is significantly one and half times higher than black tea (EC₅₀, 44.222). The inhibitory ability of the extract against plant pathogens is relatively and significantly higher than human pathogens. Different products and perhaps the waste of black tea and green tea can be used to control harmful microorganisms.

Key words: Antibacterial, Antioxidant, Minimum Inhibitory concentration

Assistant Professor of Plant Physiology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

(*Corresponding Author: m.haidarizadeh@uok.ac.ir)

²M.Sc in Cellular and Molecular Biology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

³ Associated Professor of Microbiology, Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran



رفتار هم‌نوع خواری سوسک زردآرد (*Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758) در شرایط آزمایشگاهی

رضیه رشیدی ایل ذوله^۱، وحید اکملی^{۲*}

چکیده

مقدمه: در بسیاری از گونه‌های حشرات، هم‌نوع خواری بعنوان یک رفتار طبیعی گزارش شده است و در این رفتار حشرات کامل و لاروها، در نبود غذا از تخم و شفیره تغذیه می‌کنند. **مواد و روش‌ها:** در پژوهش حاضر هفت گروه غذایی که هر کدام حاوی مخلوطی از سبوس گندم با جو، ذرت و نخود است به عنوان محیط پرورش سوسک فراهم شد. اثر گروه‌های فوق در حضور میوه (دوره سیری) و عدم حضور میوه (دوره گرسنگی) بر رفتار هم‌نوع‌خواری انتخابی حشره کامل و لارو سوسک زرد آرد مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج و بحث:** نتایج آنالیز رفتار انتخابی سوسک‌ها نشان داد که آنها ابتدا تخم‌ها و سپس شفیره‌ها را ترجیح می‌دهند که احتمالاً به علت رفتار جستجوگرانه آنها در بستر محیط پرورش حاوی تخم و همچنین ناتوانی تخم‌ها در اجتناب از شکار است. در رفتار انتخابی لاروها مشاهده شد که آنها ابتدا به شفیره‌ها و سپس به حشرات کامل حمله می‌کنند، که احتمالاً به دلیل ناتوانی شفیره در اجتناب از شکار و داشتن بدن نرم و مرطوب است. همچنین نتایج نشان داد که فاکتور تغذیه و کیفیت رژیم غذایی تاثیر معنی داری بر هم‌نوع خواری دارد. در بررسی اثر دوره‌های گرسنگی (۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸) بر میزان هم‌نوع‌خواری حشره کامل، ملاحظه شد که حشرات با بیش از ۱۲ ساعت گرسنگی، بیشترین میزان هم‌نوع‌خواری را نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: دوره گرسنگی، رفتار انتخابی، شفیره، میلورم.

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. (*نویسنده مسئول: v_akmali@razi.ac.ir)

مقدمه

رفتار هم‌نوع‌خواری تاکنون در بیش از ۱۳۰۰ گونه جانوری ثبت شده است. این رفتار در بسیاری از بندپایان و راسته‌های حشرات از جمله سخت‌بال‌پوشان (Coleoptera) گزارش شده است که رفتاری طبیعی در این جانوران تلقی می‌شود. در این رفتار معمولاً حشرات بالغ و لاروها، از شفیره‌ها و تخم‌های بی‌حرکت تغذیه می‌کنند (Fernandez *et al.*, 2020). هم‌نوع‌خواری اندازه جمعیت را تنظیم کرده و همچنین باعث افزایش نرخ رشد، بقا و باروری می‌شود (Mastrantonio *et al.*, 2021). این رفتار به صورت یک مکانیسم خودتنظیمی عمل می‌کند، بطوری که در برخی از حشرات اجتماعی، لارو یا حشره بالغ از تخم‌های هم‌نوع، برای بهبود سرعت رشد و باروری تغذیه می‌کنند که به آن هم‌نوع‌خواری تخم می‌گویند (Jiang & Zhou, 2022). هم‌نوع‌خواری یا شکار درون گونه‌ای تقریباً در تمام گونه‌های جانوری تکامل یافته و بر ساختار و پویایی جمعیت آنها تأثیر می‌گذارد. این رفتار در شرایط استرس‌زا مانند تراکم زیاد یا کمبود غذا، افزایش یافته و به عنوان مزیت تغذیه‌ای محسوب می‌شود، هرچند خطر مرگ و میر را در بین افراد خاص (تخم یا شفیره) به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد. بطور مثال وقتی سوسک زرد آرد تحت دوره‌های گرسنگی و یا محرومیت از میوه و غذا قرار می‌گیرد رفتار هم‌نوع‌خواری و جستجو برای غذا در آن افزایش می‌یابد (Ichikawa & Kurauchi, 2009; Via, 1999).

حشرات و سایر بندپایان، بر خلاف گونه‌های مهره‌داران، چرخه‌های زندگی پیچیده‌ای دارند که در آن مراحل متوالی ممکن است به طرز چشمگیری هم از نظر ریختی و هم از نظر زیست محیطی متفاوت باشد (Fernandez *et al.*, 2020). سوسک زرد آرد با داشتن چهار مرحله مشخص در چرخه زندگی که شامل تخم، لارو (میلورم)، شفیره و حشره کامل می‌شود، دارای دگردیسی کامل است. تخم این حشره بیضی شکل، سفید رنگ و چسبناک است (Siemianowska *et al.*, 2013; Ribeiro, 2017; Van Huis *et al.*, 2013). پس از طی دوران جنینی، لاروهای ریز سفید رنگ از تخم خارج شده و مرحله لاروی شروع می‌شود (Ribeiro, 2017; Van Huis *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015). مدت زمان دوره لاروی ۵۷ روز در شرایط کنترل شده، تا ۶۲۹ روز در طبیعت متغیر است (Ribeiro, 2017; Damborsky *et al.*, 2000). وزن یک لارو بالغ (میلورم) به طور متوسط ۰/۲ گرم و طول آن ۳۵-۲۵ میلی‌متر است (Alves *et al.*, 2016). در نهایت، لاروها فرم "C" شکل می‌گیرند و با یک پوست‌اندازی به شفیره تبدیل می‌شوند (Ribeiro, 2017; Van Huis *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2016; Patterson, 2016). بعد از تکمیل مرحله شفیرگی، سوسک‌ها با اسکلتی نرم و بال‌های سفید رنگ از شفیره بیرون آمده و مرحله حشره کامل شروع می‌شود (Ribeiro, 2017; Damborsky *et al.*, 2000).

تاکنون مطالعاتی در مورد هم‌نوع‌خواری در حشرات صورت گرفته است (Richardson *et al.*, 1992; Agarwala *et al.*, 2010). بطور مثال بررسی هم‌نوع‌خواری و شکار بین‌گونه‌ای در کفشدوزک‌های *Adalia bipunctata*، *Coccinella septempunctata* و *C. undecimpunctata* نشان داده است که هم‌نوع‌خواری

بطور عمده زمانی رخ می‌دهد که طعمه کمیاب باشد، از این جهت نوعی سازگاری است که شانس بقا را افزایش می‌دهد (Agarwala et al., 1992). در مطالعه دیگری اثرات میزان نیتروژن برگ در سه سطح نرمال، کمتر از نرمال و بیش از حد نرمال بر رفتار همנוع‌خواری کرم برگ‌خوار چغندر (*Spodoptera exigua* Hübner, 1808) بررسی شده است. در این مطالعه، به لاروهای پرورش یافته بر روی برگ چغندر قند اجازه داده شد تا از شفیره‌ها همנוع‌خواری کنند، نتایج نشان داد که سطوح نیتروژن بر رفتار همנוع‌خواری اثر معناداری دارد (Zubaidi et al., 1983). همנוع‌خواری شفیره‌ها توسط لاروها در بسیاری از گونه‌های حشرات ثبت شده است. همנוع‌خواری لارو و دفاع شفیره در گونه *Zophobas atratus* Blanchard, 1845 نشان داد که لاروها از شفیره‌هایی که ناحیه شکمی آنها قبلاً فلج شده است به عنوان طعمه استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که پاسخ چرخش شکمی شفیره‌ها به عنوان یک دفاع موثر در برابر همנוع‌خواری لارو عمل می‌کند (Ichikawa & Kurauchi, 2009). همנוع‌خواری می‌تواند با بهبود نرخ رشد، بقا، طول عمر و باروری مفید باشد و نقش مهمی در تنظیم تراکم جمعیت، تثبیت روابط گیاه میزبان با حشره ایفا می‌کند. عوامل وابسته به تراکم و عوامل مستقل از تراکم مانند دمای بالای محیط بر نرخ همנוع‌خواری تاثیرگذار است (Richardson et al., 2010). در مطالعه دیگری رفتار همנוع‌خواری دو گونه از حشرات شکارگر در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفته است. این دو گونه شامل *Nabis pseudoferus* Remane, 1949 که گونه به شدت گوشت‌خوار بوده و گونه *Nesidiocoris tenuis* Reuter, 1895 همه چیزخوار است. نتایج این مطالعه نشان داده است که رفتار همנוع‌خواری در *N. pseudoferus* در طول دوره مطالعه و در همه مراحل رشد شایع بوده، در حالی که بندرت این رفتار در *N. tenuis* مشاهده شده و بطور عمده به سه مرحله اول شفیرگی محدود می‌شود. هیچ رابطه خطی بین همנוع‌خواری و شکار درون گونه‌ای با نسبت‌های مختلف اندازه همנוع‌خوار به طعمه، مشاهده نشده است (Fernandez et al., 2020). هدف از این مطالعه بررسی رفتار انتخابی و قدرت همנוع‌خواری حشرات کامل و لاروهای همנוع‌خوار، تاثیر کیفیت جیره غذایی حشره بر قدرت همנוع‌خواری و همچنین تاثیر افزایش زمان دوره‌های گرسنگی و محرومیت از میوه بر میزان همנוع‌خواری در سوسک زرد آرد است.

مواد و روش‌ها

جامعه آماری این مطالعه از حشرات پرورش داده شده در آزمایشگاه اکولوژی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی فراهم شد. آزمایش‌ها در دمای ۲۸°C و رطوبت ۶۵٪ انجام شدند. هفت جعبه پلاستیکی به ابعاد (۱۹ سانتی‌متر ارتفاع و ۳/۵ سانتی‌متر طول) که هرکدام حاوی مخلوطی از سبوس‌های گندم با جو، ذرت و نخود به عنوان محیط کشت فراهم شد و حشرات چرخه زندگی (شکل ۱) خود را در آن طی کردند. از هویج به عنوان منبع آب و رطوبت در گروه‌ها استفاده شده و برای هر گروه ۳۰ تکرار صورت گرفت. گروه‌های زیر در حضور میوه هویج (دوره سیری) و عدم حضور میوه (دوره گرسنگی)

مورد بررسی قرار گرفت: ۱- شاهد W (۴۰۰ گرم سبوس گندم)، ۲- A (۲۰۰ گرم سبوس گندم + ۲۰۰ گرم سبوس جو)، ۳- B (۳۰۰ گرم سبوس گندم + ۱۰۰ گرم سبوس جو)، ۴- C (۲۰۰ گرم سبوس گندم + ۲۰۰ گرم سبوس نخود)، ۵- D (۳۰۰ گرم سبوس گندم + ۱۰۰ گرم سبوس نخود)، ۶- E (۲۰۰ گرم سبوس گندم + ۲۰۰ گرم سبوس ذرت)، ۷- F (۳۰۰ گرم سبوس گندم + ۱۰۰ گرم سبوس جو. با مشاهده آثار ممنوع خواری که شامل آسیب وارد شده در اثر خوردن شکارچیان (همنوع‌خواران) ممنوع خواری تشخیص داده شد. در این مطالعه ممنوع خواری شامل آسیب به اندام جلویی و عقبی و خورده شدن کامل است که به صورت زیر مورد بررسی قرار گرفت.

همنوع‌خواری تخم و شفیره توسط سوسک کامل و لارو

ابتدا سوسک‌های کامل و لاروها بطور تصادفی از محیط‌های کشت (W-A-B-C-D-E-F) انتخاب شدند. برای انتخاب لاروها، از لاروهایی که در سنین پایانی قرار داشتند استفاده شد و به مدت ۲۴ ساعت تحت دوره گرسنگی (عدم دریافت میوه) قرار گرفتند. سپس رفتار انتخابی میزان تخم و شفیره خورده شده توسط سوسک کامل و شفیره و سوسک کامل خورده شده توسط لارو مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی رفتار انتخابی میزان نسبت تخم و شفیره خورده شده توسط سوسک کامل، برای هر گروه ۳۰ تکرار و در هر تکرار ۱۰ نمونه سوسک کامل (پنج نمونه از هر جنس) در داخل ظروف آزمایش قرار داده شد و سپس ۱۵ شفیره و ۲۵ تخم، در بین آنها پخش شد. همچنین در بررسی رفتار انتخابی میزان نسبت سوسک و شفیره خورده شده توسط لارو، ۳۰ عدد لارو در داخل ظروف آزمایش قرار داده شدند و در ادامه ۱۵ شفیره و ۱۰ سوسک در بین آنها توزیع گردید. بعد از سه ساعت، تعداد تخم، شفیره و سوسک‌های آسیب دیده شمارش شدند. جهت بررسی آثار حمله (همنوع‌خواری) از استریومیکروسکوپ استفاده شد و داده‌ها ثبت گردید.

مقایسه میزان همنوع‌خواری سوسک و لارو نسبت به شفیره

به منظور بررسی مقایسه میزان همنوع‌خواری بین سوسک و لارو از شفیره، از هر گروه بطور تصادفی ۳۰ سوسک و لارو انتخاب شد و در داخل ظروف آزمایش به مقدار مناسب سبوس برای پنهان کردن نمونه‌ها قرار داده شد و برای هر گروه ۳۰ تکرار فراهم شد. سپس به مدت ۱۲ ساعت تحت دوره گرسنگی (عدم دریافت میوه) قرار گرفتند. در ادامه برای هر تکرار ۱۵ شفیره توزیع شد، و به مدت سه ساعت (Ichikawa & Kurauchi, 2009) به سوسک و لاروهای همنوع‌خوار اجازه داده شد تا از شفیره تغذیه کنند. سپس تعداد شفیره‌های آسیب دیده، شمارش شد.

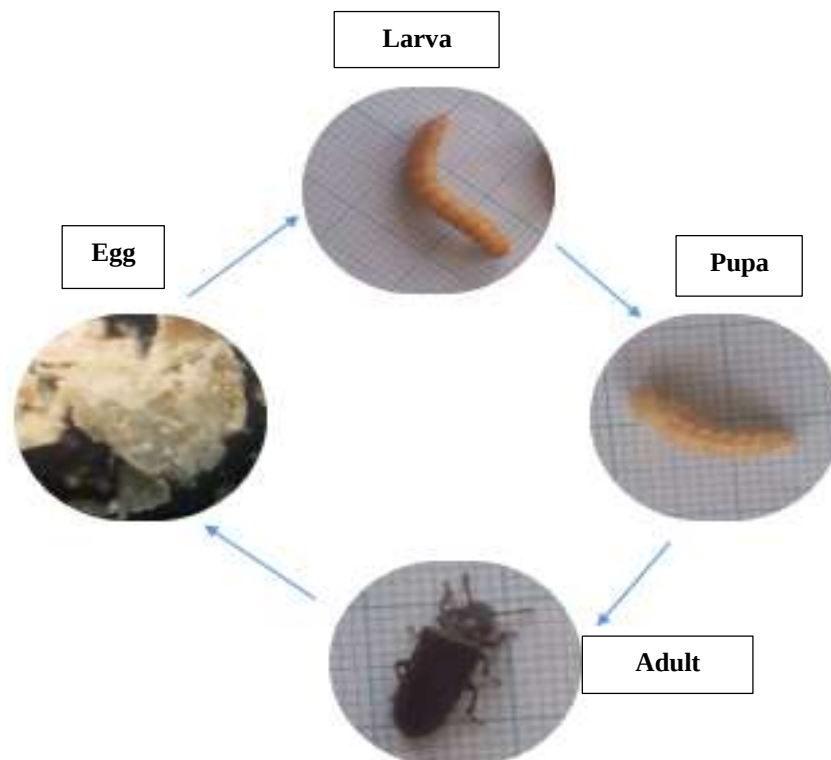
میزان همنوع‌خواری سوسک کامل از شفیره در ۴ بازه زمانی ۱۲-۲۴-۳۶-۴۸ ساعت

برای مقایسه میزان همنوع‌خواری سوسک کامل از شفیره در طول ۴ دوره گرسنگی (بازه‌های زمانی ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ ساعت) آزمایشی طراحی شد. از بین جمعیتی از سوسک‌هایی که در شرایط آزمایشگاهی رشد کردند، ۳۰ عدد سوسک بطور تصادفی انتخاب شدند و به داخل ظروف آزمایش انتقال یافتند. این آزمایش برای هر گروه در ۳۰ تکرار انجام شد. سپس سوسک‌ها

در بازه‌های زمانی فوق، تحت دوره‌های گرسنگی و محرومیت از میوه قرار گرفتند. پس از طی دوران گرسنگی در هر ظرف ۱۵ شفیله قرار داده شد و به مدت سه ساعت (طول دوره همנוع‌خواری) به سوسک‌ها اجازه داده شد تا همנוع‌خواری کنند. پس از پایان دوره زمانی انجام آزمایش، نسبت شفیله‌های آسیب دیده در ۴ بازه زمانی ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت، بررسی شد.

تحلیل آماری

داده‌های حاصل از آزمایشات با نرم افزار SPSS v. 26 آنالیز شد. آنالیز واریانس، آزمون توکی و همچنین از طرح اندازه تکراری برای آنالیز نسبت تخم به شفیله خورده شده در سوسک‌های همנוع‌خوار و نسبت سوسک به شفیله خورده شده در لاروهای همנוع‌خوار استفاده شد.



شکل ۱- چرخه زندگی سوسک زرد آرد.

Figure 1. Life cycle of yellow mealworm beetle.

نتایج

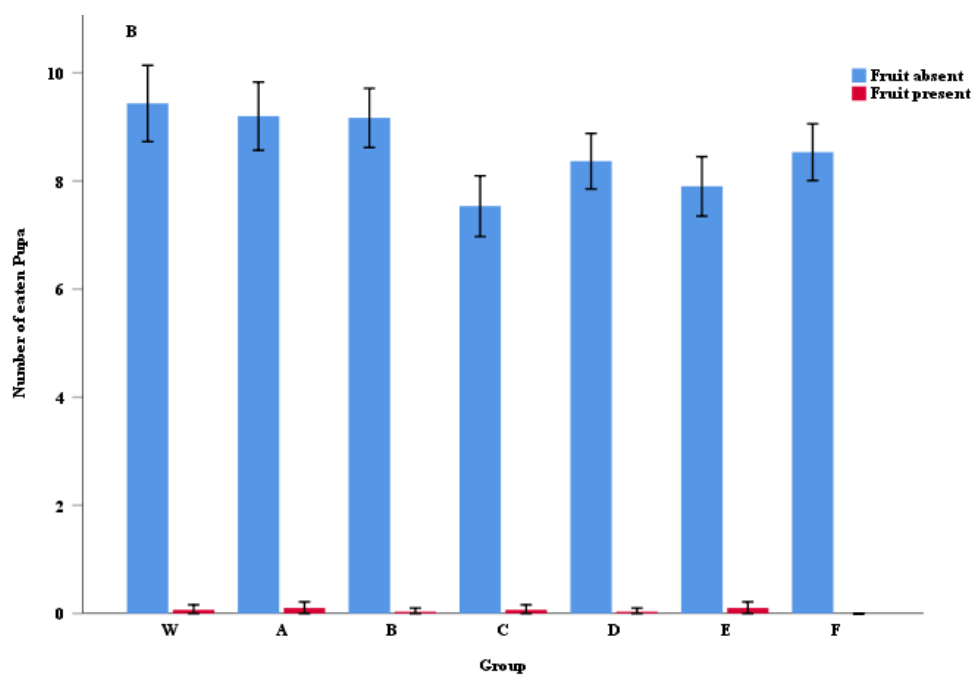
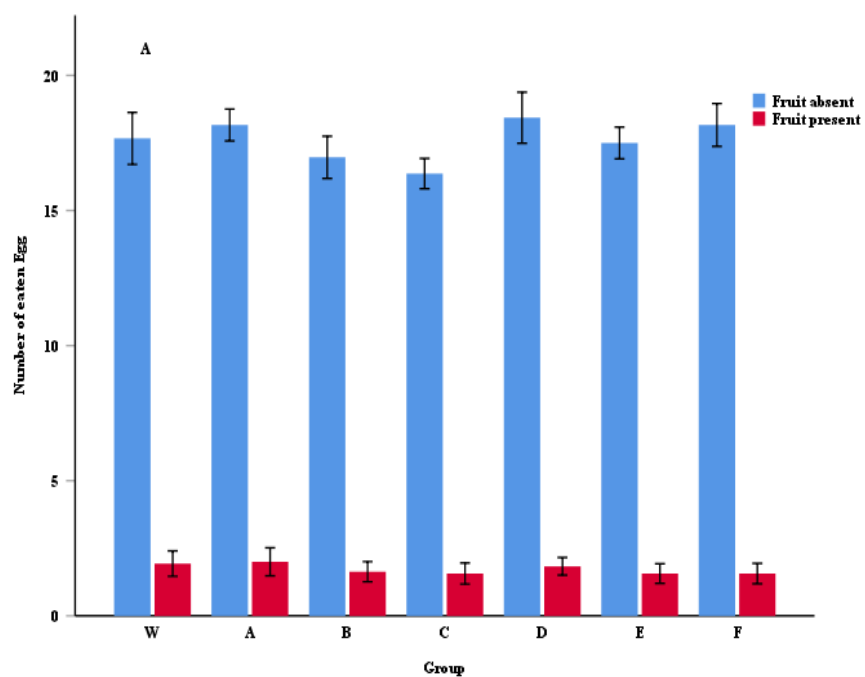
نتایج آنالیز بررسی اثر مستقل فاکتور تغذیه در بین گروه‌ها بر همנוع‌خواری تخم (F: 4.021, df:6, p-value = 0.001) و شفیله (F:6.189, df:6, p-value= 0.0001) توسط سوسک کامل تفاوت معناداری را نشان داد. در همנוع‌خواری تخم در هیچکدام از گروه‌ها با گروه شاهد تفاوت معناداری مشاهده نشد، ولی در همנוع‌خواری شفیله، تیمار C با نمونه شاهد تفاوت معناداری مشاهده شد. در بررسی اثر مستقل فاکتور عدم حضور میوه بر همנוع‌خواری تخم (F:9910.115, df:1, p-value= 0.0001) و شفیله (F:6.189, df:6, p-value= 0.0001) توسط سوسک کامل تفاوت معناداری را نشان داد.

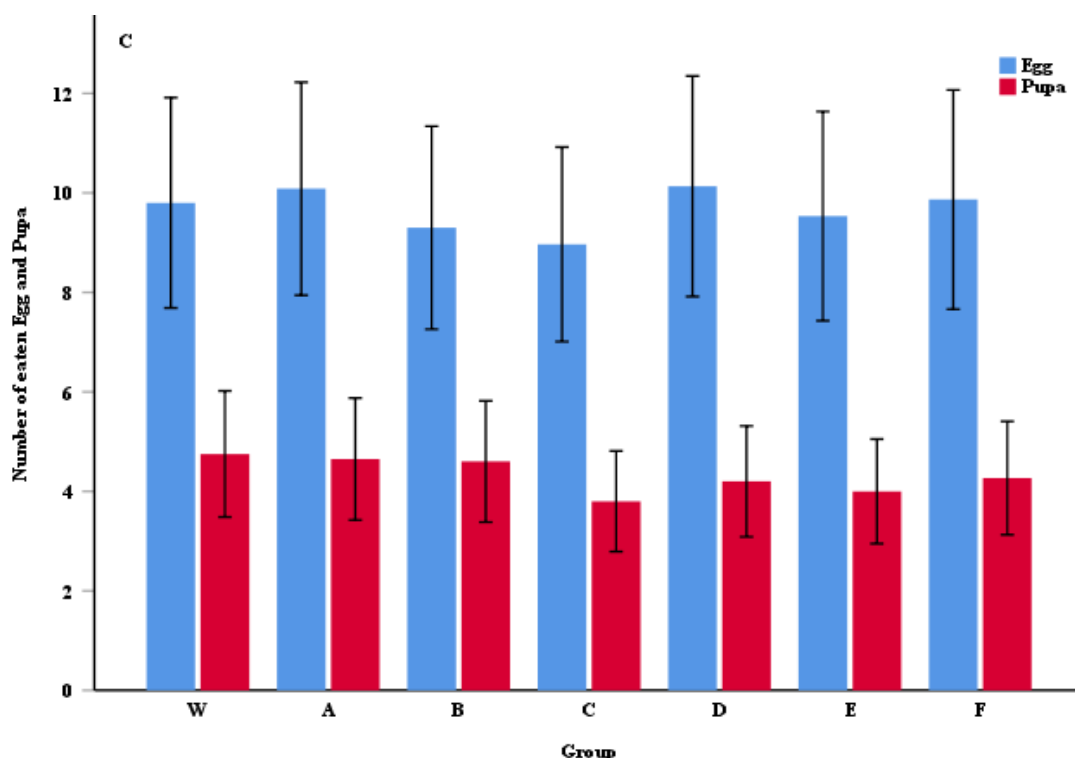
0.001) و شفیره (F:6208.444, df:1, p-value= 0.001) توسط سوسک تفاوت معنادار مشاهده شد. بیشترین و کمترین میانگین تخم و شفیره مورد هم‌نوع‌خواری شده به ترتیب در تیمارهای عدم حضور میوه و حضور میوه ثبت گردید (جدول ۱ و شکل ۴ الف و ب). در اثر تعاملی فاکتورهای تغذیه و عدم حضور میوه بر هم‌نوع‌خواری تخم (F:2.441, df:6, p-value=0.025) و شفیره (F:6.275, df:6, p-value< 0.0001) توسط سوسک تفاوت معناداری مشاهده شد. آنالیز طرح اندازه تکراری در بررسی رفتار انتخابی سوسک نسبت به هم‌نوع‌خواری تخم و شفیره، تفاوت معناداری را نشان داد (F:673.96, df:1, p-value< 0.0001). در این رفتار سوسک‌ها تمایل بیشتری به خوردن تخم‌ها نشان دادند (شکل ۲-ج).

جدول ۱- میانگین (Mean) و خطای استاندارد (SE) تعداد شفیره و تخم خورده شده توسط سوسک در حضور و عدم حضور میوه در گروه‌های غذایی مختلف

Table 1- Mean and standard error (SE) of the number of pupae and eggs eaten by the beetle in the presence and absence of fruit in different food groups

Group	Fruit as feed	Egg		p-value	Pupa		p-value
		Mean	SE		Mean	SE	
W	absent	17.67	0.47	0.001	9.43	0.34	<0.0001
	present	1.93	0.23		0.07	0.05	
A	absent	18.17	0.29	0.456	9.20	0.31	<0.0001
	present	2.00	0.25		0.10	0.06	
B	absent	16.97	0.38	0.0007	9.17	0.27	0.0008
	present	1.63	0.18		0.03	0.03	
C	absent	16.37	0.27	0.03	7.53	0.27	<0.0001
	present	1.57	0.19		0.07	0.46	
D	absent	18.43	0.16	0.0005	8.37	0.25	<0.0001
	present	1.83	0.16		0.03	0.03	
E	absent	17.50	0.29	0.01	7.90	0.27	<0.0001
	present	1.57	0.18		0.10	0.06	
F	absent	18.17	0.39	0.21	8.53	0.26	<0.0001
	present	1.57	0.18		0.00	0.00	





شکل ۲- رفتار انتخابی هم‌نوع‌خواری تخم و شفیره توسط سوسک کامل.

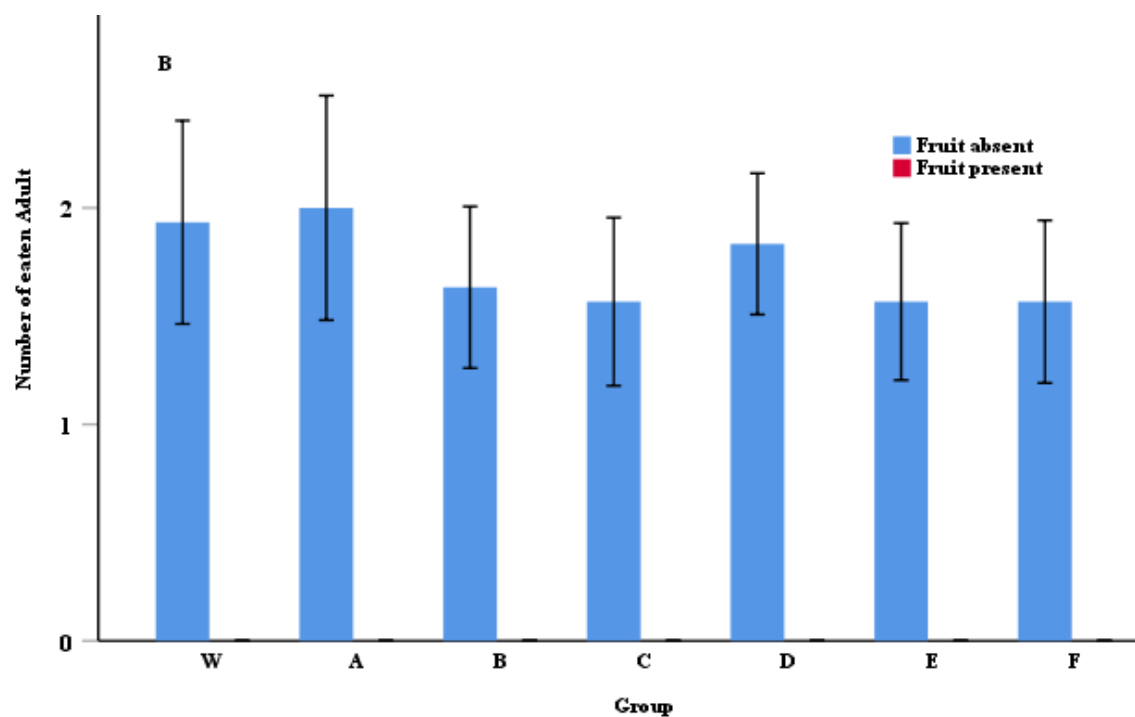
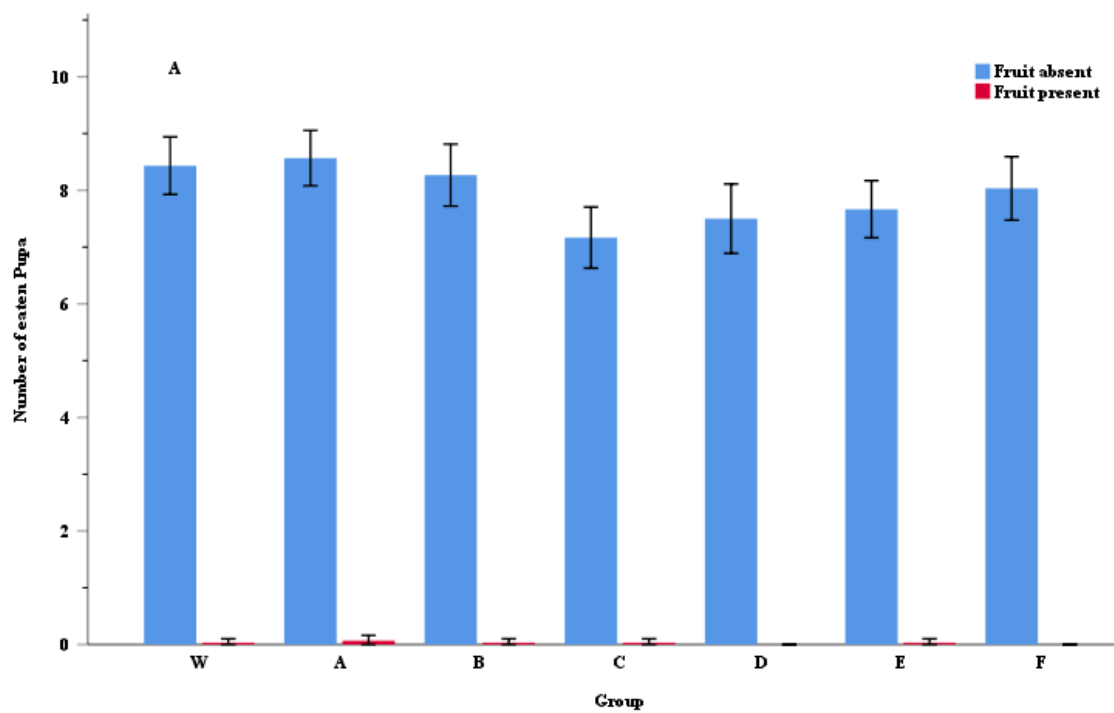
Figure 2. Selective cannibalistic behavior of eggs and pupae by beetle. 100% Wheat bran (W), 50% Wheat bran + 50% barley bran (A), 75% Wheat bran + 25% Barley bran (B), 50% Pea bran + 50% Wheat bran (C), 25% Pea bran + 75% Wheat bran (D), 50% Corn bran + 50% Wheat bran (E), and 25% Corn Bran + 75% Wheat Bran (F).

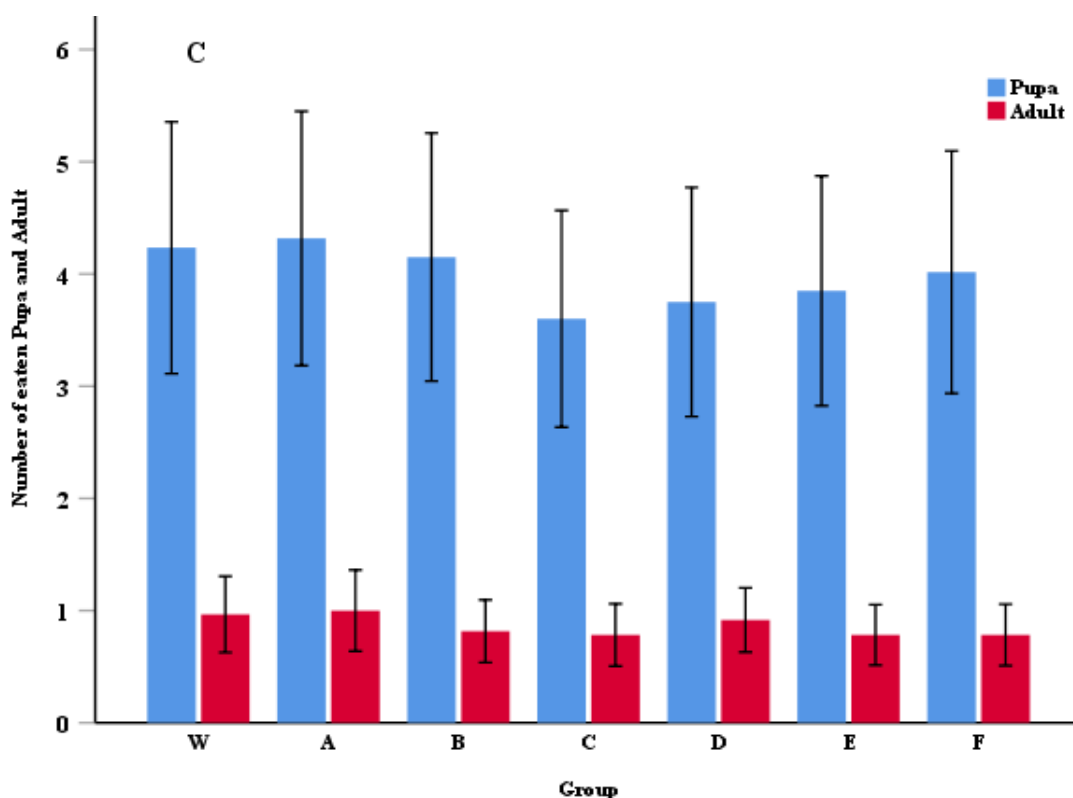
نتایج آنالیز اثر مستقل فاکتور تغذیه بر رفتار انتخابی لارو نسبت به هم‌نوع‌خواری از سوسک تفاوت معناداری را نشان نداد ($F:0.902$, $df:6$, $p\text{-value}=0.493$)، اما بین تیمارها در هم‌نوع‌خواری شفیره تفاوت معنادار مشاهده شد ($F:4.021$, $df:6$, $p\text{-value}=0.001$). اثر مستقل فاکتور عدم استفاده از میوه در هم‌نوع‌خواری سوسک ($F:528.315$, $df:1$, $p\text{-value}<0.0001$) و شفیره ($F:6280.954$, $df:1$, $p\text{-value}<0.0001$) تفاوت معناداری را نشان داد. اما اثر تعاملی این دو فاکتور در هم‌نوع‌خواری سوسک ($F:0.902$, $df:6$, $p\text{-value}=0.493$) تفاوت معناداری را نشان نداد ولی در هم‌نوع‌خواری شفیره ($F:3.709$, $df:6$, $p\text{-value}=0.001$) تفاوت معناداری مشاهده شد. در بررسی اثر فاکتور عدم حضور میوه، بیشترین و کمترین میانگین سوسک و شفیره مورد هم‌نوع‌خواری شده به ترتیب در گروه‌های عدم حضور میوه و حضور میوه ثبت گردید (جدول ۲ و شکل ۳-الف و ب). نتایج آنالیز طرح اندازه تکراری در بررسی میزان این رفتار تفاوت معناداری را نشان داد ($F:357.264$, $df:1$, $p\text{-value}<0.05$) که مبین تمایل بیشتر لاروها به خوردن شفیره است (شکل ۳-ج).

جدول ۲- میانگین (Mean) و خطای استاندارد (SE) تعداد شفیره و سوسک خورده شده توسط لارو در حضور و عدم حضور میوه در گروه های غذایی مختلف.

Table 2- Mean and standard error (SE) of the number of pupa and beetle eaten by larvae in the presence and absence of fruit in different food groups.

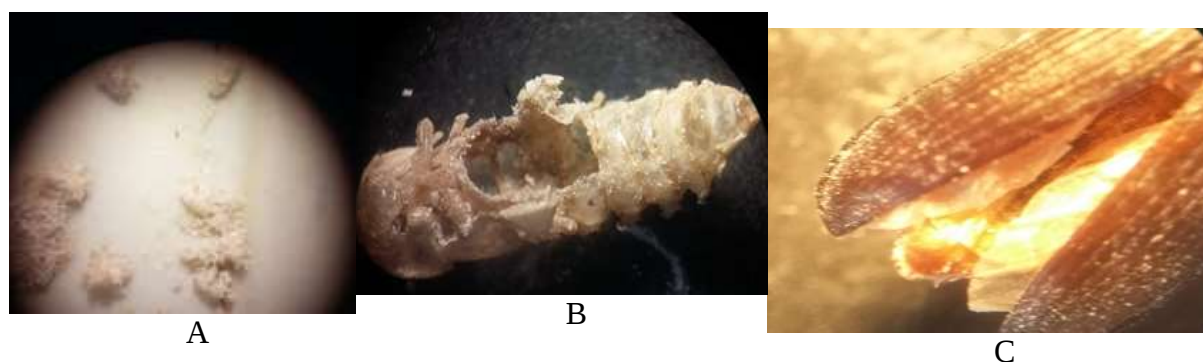
Group	Fruit as feed	Pupa			Beetle		
		Mean	SE	p-value	Mean	SE	p-value
W	absent	8.43	0.25	<0.0001	1.93	0.23	<0.0001
	present	0.03	0.03		0.00	0.00	
A	absent	8.57	0.24	<0.0001	2.00	0.25	<0.0001
	present	0.07	0.05		0.00	0.00	
B	absent	8.27	0.27	<0.0001	1.63	0.18	<0.0001
	present	0.03	0.03		0.00	0.00	
C	absent	7.17	0.26	<0.0001	1.57	0.19	<0.0001
	present	0.03	0.03		0.00	0.00	
D	absent	7.50	0.30	<0.0001	1.83	0.16	<0.0001
	present	0.00	0.00		0.00	0.00	
E	absent	7.67	0.25	<0.0001	1.57	0.18	<0.0001
	present	0.03	0.03		0.00	0.00	
F	absent	8.03	0.27	<0.0001	1.57	0.18	<0.0001
	present	0.00	0.00		0.00	0.00	





شکل ۳- رفتار انتخابی همنوغ خواری سوسک و شفیره توسط لارو.

Figure 3. Selective cannibalistic behavior of beetles and pupae by larvae. 100% Wheat bran (W), 50% Wheat bran + 50% Barley bran (A), 75% Wheat bran + 25% Barley bran (B), 50% Pea bran + 50% Wheat bran (C), 25% Pea bran + 75% Wheat bran (D), 50% Corn bran + 50% Wheat bran (E), and 25% Corn bran + 75% Wheat bran (F).



شکل ۴- همنوغ خواری در سوسک زرد آرد: تخم (A)، شفیره (B) و حشره کامل (C)

Figure 4. Cannibalism in the yellow mealworm. A: egg, B: pupa, C: beetle

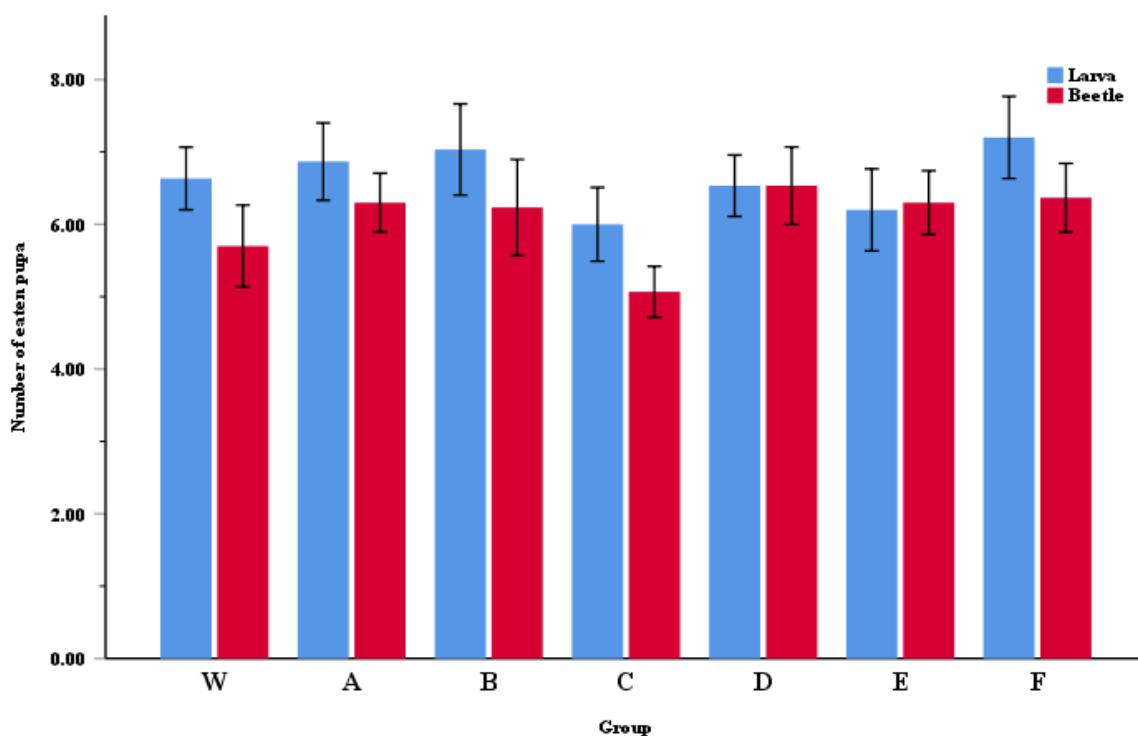
نتایج آنالیز اثر مستقل فاکتور تغذیه بر میزان همنوغ خواری حشره بالغ و لارو سوسک زرد آرد، نشان داد که تفاوت معنی داری در قدرت همنوغ خواری لارو در رژیم های غذایی مختلف وجود دارد ($F:5.62, df:1, p\text{-value}<0.0001$). بیشترین و کمترین میانگین شفیره های خورده شده به ترتیب در گروه های C و F ثبت گردید. همچنین تفاوت معنی داری در میزان خورده

شدن شفیره توسط سوسک و لارو وجود داشت ($F:17.754, df:1, p\text{-value}<0.0001$). اما در اثر تعاملی این دو فاکتور تفاوت معناداری مشاهده نشد ($F:1.527, df:1, p\text{-value}=0.168$). بیشترین و کمترین میانگین شفیره خورده شده به ترتیب در لاروها و سوسک‌ها ثبت گردید (شکل ۵ و جدول ۳).

جدول ۳- میانگین (Mean) و خطای استاندارد (SE) میزان هم‌نوع‌خواری سوسک و لارو *T. molitor* از شفیره.

Table 3- Mean and standard error (SE) of the cannibalism rate of *T. molitor* beetle and larva from the pupa.

Group	Cannibals	Mean	SE	p-value
W	larva	6.63	0.21	0.33
	beetle	5.70	0.28	
A	larva	6.87	0.26	0.16
	beetle	6.30	0.20	
B	larva	7.03	0.31	0.70
	beetle	6.23	0.32	
C	larva	6.00	0.25	0.20
	beetle	5.07	0.17	
D	larva	6.53	0.21	0.53
	beetle	6.53	0.26	
E	larva	6.20	0.28	0.13
	beetle	6.30	0.22	
F	larva	7.20	0.28	0.15
	beetle	6.37	0.23	
Total	larva	6.64	0.10	0.02
	beetle	6.07	0.10	



شکل ۵- مقایسه میزان هم‌نوع‌خواری سوسک و لارو از شفیره.

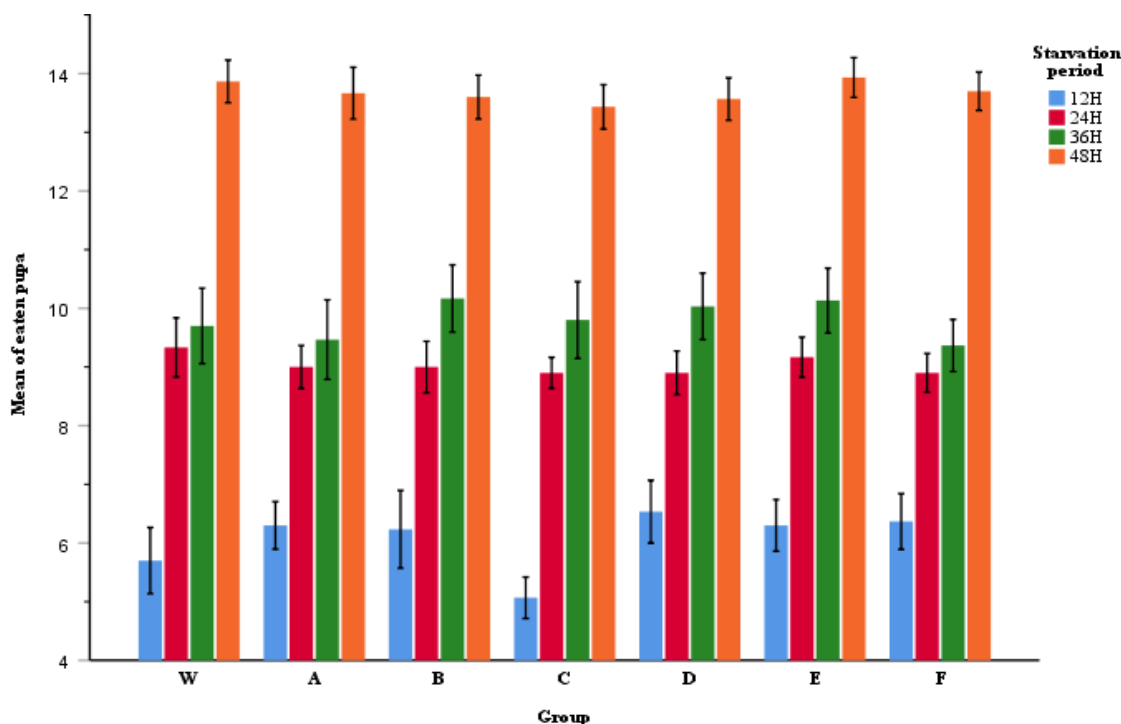
Figure 5. Comparing the cannibalism power of beetle and larva from pupae.

نتایج آنالیز اثر مستقل فاکتورهای تغذیه (F:2.587, df:1, p-value=0.017) و ۴ دوره گرسنگی (F:1302.52, df:1, p-value<0.0001)، و اثر تعاملی این دو فاکتور (F:1.8, df:1, p-value=0.021)، در بررسی میزان همנוع خواری شفیره توسط سوسک پس از طی ۴ دوره گرسنگی ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت تفاوت معناداری را نشان داد. در فاکتور تغذیه بیشترین و کمترین میانگین شفیره خورده شده در تیمارهای C و D ثبت و در فاکتور ۴ دوره گرسنگی بیشترین و کمترین میانگین شفیره خورده شده در تیمارهای ۲۴ و ۱۲ ساعت ثبت گردید (شکل ۶ و جدول ۴).

جدول ۴- میانگین (Mean) و خطای استاندارد (SE) میزان همנוع خواری شفیره توسط سوسک در دوره های گرسنگی (۱۲-۲۴-۳۶-۴۸ ساعت).

Table 4- Mean and standard error (SE) of the rate of cannibalism of pupa by beetle during starvation periods (12-24-36-48 hours).

Group	Starvation periods	Mean	SE	p-value
W	12H	5.70	0.28	<0.0001
	24H	9.33	0.25	
	36H	9.70	0.31	
	48H	13.87	0.18	
A	12H	6.30	0.20	<0.0001
	24H	9.00	0.18	
	36H	9.47	0.33	
	48H	13.67	0.22	
B	12H	6.23	0.32	<0.0001
	24H	9.00	0.21	
	36H	10.17	0.28	
	48H	13.60	0.18	
C	12H	5.07	0.17	<0.0001
	24H	8.90	0.13	
	36H	9.80	0.32	
	48H	13.43	0.18	
D	12H	6.53	0.26	<0.0001
	24H	8.90	0.18	
	36H	10.03	0.28	
	48H	13.57	0.18	
E	12H	6.30	0.22	<0.0001
	24H	9.17	0.17	
	36H	10.13	0.27	
	48H	13.93	0.17	
F	12H	6.37	0.23	<0.0001
	24H	8.90	0.16	
	36H	9.37	0.22	
	48H	13.70	0.16	
Total	12H	6.07	0.10	<0.0001
	24H	9.03	0.07	
	36H	9.81	0.11	
	48H	13.68	0.07	



شکل ۶- میزان هم‌نوع‌خواری از سفیره توسط سوسک در دوره‌های گرسنگی (۱۲-۲۴-۳۶-۴۸) ساعت.

Figure 6. The rate of cannibalism of the pupae by the beetle in the periods of starvation (12-24-36-48 h).

بحث

در مطالعه بررسی رفتار انتخابی هم‌نوع‌خواری سوسک در انتخاب طعمه، مشاهده شد که فاکتور تغذیه یعنی اثر هفت نوع گروه غذایی بر رفتار انتخابی هم‌نوع‌خواری حشره کامل موثر بوده ولی در لاروهای این حشره تاثیری دیده نشد. بنابراین نوع جیره غذایی می‌تواند تعیین کننده نوع طعمه حشره کامل در هم‌نوع‌خواری باشد. در مطالعه زبیدی و همکاران در سال ۱۹۸۳ در هم‌نوع‌خواری کرم برگ‌خوار چغندر نشان داده شده است که بین میزان نیتروژن موجود در برگ مورد استفاده حشرات کرم برگ‌خوار چغندر و هم‌نوع‌خواری لاروهای این حشرات تفاوت معنادار وجود دارد به این ترتیب که هر چه میزان نیتروژن کمتر باشد هم‌نوع‌خواری بیشتری رخ می‌دهد (Zubaidi et al., 1983) که نشان از تطابق نتایج مطالعه ی ما با آن دارد. در پژوهشی هم‌نوع‌خواری *Brontocoris tabidus* و *Podisus nigrispinus* در طی ۴ دوره گرسنگی و تغذیه با گیاه *Eucalyptus cloeziana* صورت گرفته بود، که حشرات در بازه های زمانی ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت از خوردن گیاهان *E. cloeziana* به منظور بررسی هم‌نوع‌خواری در بالغین و تخم‌ها محروم شدند. در پژوهش مذکور گزارش شد حشراتی که تحت دوره‌های ۲۴ ساعت بدون غذا بودند، هم‌نوع‌خواری بیشتری نشان دادند و وجود گیاه *E. cloeziana* باعث کاهش هم‌نوع‌خواری در تمام مراحل شد (Pires et al., 2011). در مطالعه ی حاضر نیز مشاهده شد که دوره‌های گرسنگی و حضور میوه به عنوان منبع آب و رطوبت ضروری است چون مقایسه آماری و نتایج نشان داد بین تیمارهای که تحت دوره گرسنگی قرار گرفتند با تیمارهای که میوه را دریافت کرده‌اند،

تفاوت معناداری در میانگین میزان همنوع‌خواری وجود دارد. بنابراین حضور میوه باعث کاهش همنوع‌خواری در تمام تیمارها می‌شود.

تحلیل داده‌های رفتار انتخابی میزان همنوع‌خواری از تخم نسبت به شفیره در سوسک‌های همنوع‌خوار در این مطالعه نشان داد که سوسک‌ها تمایل بیشتری به خوردن تخم‌ها دارند که با نتایج Pires و همکاران در سال ۲۰۱۱ همخوانی دارد. رفتار جستجوگرانه سوسک‌ها در بستر محیط پرورش خود، محل نگهداری تخم‌ها، همچنین عدم تحرک و داشتن پوشش نازک تخم‌ها می‌تواند از دلایل این رفتار سوسک باشد. همنوع‌خوران ترجیح می‌دهند ابتدا به تخم‌ها حمله کنند تا بالغین و احتمالاً به دلیل عدم توانایی تخم‌ها در جلوگیری از شکار شدن است.

در بررسی میزان همنوع‌خواری لارو نسبت به سوسک و شفیره‌ها مشاهده شد که لاروها تمایل بیشتری به خوردن شفیره دارند و این می‌تواند به علت داشتن بدن نرم، مرطوب و حرکت ناچیز شفیره‌ها نسبت به حشره کامل باشد. در نتایج میزان همنوع‌خواری سوسک و لارو بیشترین و کمترین میانگین شفیره خورده شده به ترتیب در لاروها و سوسک ثبت گردید که میزان همنوع‌خواری لاروها از حشره کامل بیشتر است. قاعده کلی همنوع‌خواری بر این اساس است که در آن افراد بزرگتر (مسن‌تر) نسبت به افراد کوچکتر (جوان‌تر) اعمال رفتار همنوع‌خواری بیشتری انجام می‌دهند، که البته این رفتار در بعضی از تاکسون‌ها از قاعده مذکور مستثنی هستند. مثلاً در افراد گونه *N. tenuis* وقتی کوچکتر (جوانتر) هستند نرخ همنوع‌خواری بیشتر است (Fernandez et al., 2020). همچنین کیفیت مواد غذایی حشره بر رفتار همنوع‌خواری لاروها تأثیر گذار بوده و لاروهایی که در تیمارهای حاوی درصد بیشتری از سبوس نخود و درصد کمتری از سبوس ذرت رشد یافتند، به ترتیب میزان همنوع‌خواری کمتر و بیشتری داشتند.

نتایج مطالعه حاضر در بررسی میزان همنوع‌خواری شفیره توسط سوسک پس از طی چهار دوره گرسنگی نشان داد حشراتی که بیش از ۱۲ ساعت تحت دوره محرومیت از میوه قرار می‌گیرند، میزان همنوع‌خواری بیشتری را نشان می‌دهند. بنابراین محرومیت از میوه و دوره‌های گرسنگی نباید بیش از ۱۲ ساعت باشد و برای جلوگیری از بروز همنوع‌خواری باید از قطعات میوه به عنوان منبع آب و ویتامین در پرورش حشره استفاده شود. در حقیقت با افزایش دوران گرسنگی و محرومیت سوسک از خوردن میوه، میزان همنوع‌خواری نیز افزایش می‌یابد. نوع رژیم غذایی بین گروه‌ها بر دوران گرسنگی موثر است. بطوریکه در گروه‌هایی که از ۱۰۰ درصد سبوس گندم (W) و ۵۰ درصد سبوس نخود (C) تشکیل شده‌اند و در بین گروه‌هایی که تحت دوره گرسنگی ۱۲ ساعت بودند، تعداد شفیره نسبتاً کمتری خورده شده است و نشان دهنده تأثیرگذاری کیفیت مواد غذایی حشره بر رفتار همنوع‌خواری است. همچنین اثر تعاملی طول دوره گرسنگی و نوع رژیم غذایی بر سرعت همنوع‌خواری سوسک تأثیرگذار است. افزایش همنوع‌خواری از تخم‌ها و شفیره‌ها با دوره‌های محرومیت از غذا نشان می‌دهد که گرسنگی و نبود میوه، جستجوی غذا را تحریک می‌کند و باعث بروز همنوع‌خواری برای بقای حشره می‌شود. دوره قبل از رهاسازی نباید

بیش از ۲۴ ساعت باشد و برای جلوگیری از رفتار هم‌نوع‌خواری باید از گیاه در تغذیه آنها استفاده شود (Pires *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای که اثر دوره‌های گرسنگی بر روی میزان هم‌نوع‌خواری *N. pseudoferus* بررسی شده بود، نشان داد که رفتار هم‌نوع‌خواری این گونه، در غیاب طعمه و به ویژه در مراحل رشد و در حشرات کامل ماده به شدت بالا می‌رود، ولی نرخ هم‌نوع‌خواری برای گونه همه‌چیزخوار *N. tenuis* به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر است (Fernandez *et al.*, 2020).

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه برای اولین بار رفتار هم‌نوع‌خواری سوسک زرد آرد (*Tenebrio molitor*) در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سوسک کامل و لاروها در نبود غذای کافی و عدم حضور میوه، از تخم‌ها و شفیره‌ها تغذیه می‌کنند که نوعی رفتار هم‌نوع‌خواری است. کیفیت جیره غذایی حشرات می‌تواند تعیین کننده نوع طعمه حشره کامل در هم‌نوع‌خواری باشد. وجود میوه به عنوان منبع آب و رطوبت ضروری است و باعث کاهش هم‌نوع‌خواری در این گونه می‌شود. تمایل بیشتر سوسک‌ها به خوردن تخم‌ها به علت عدم تحرک و پوشش نازک تخم‌ها و همچنین رفتار جستجوگرانه آنها در بستر محیط پرورش که محل نگهداری تخم‌ها است، می‌باشد. لاروها تمایل بیشتری به خوردن شفیره دارند که به علت داشتن بدن نرم، مرطوب و عدم تحرک شفیره‌ها نسبت به سوسک کامل است. برای جلوگیری از بروز هم‌نوع‌خواری محرومیت از میوه و دوره‌های گرسنگی نباید بیش از ۱۲ ساعت باشد و باید از قطعات میوه به عنوان منبع آب و ویتامین در پرورش حشره استفاده شود. در حقیقت با افزایش دوران گرسنگی و محرومیت سوسک از خوردن میوه، میزان هم‌نوع‌خواری نیز افزایش می‌یابد. شفیره‌ها معمولاً از ناحیه سر و سینه (بخش‌های فاقد تحرک) مورد حمله لاروها قرار می‌گیرند. برای جلوگیری از خورده شدن تخم‌ها توسط حشرات کامل می‌بایست از ظروف مخصوص پرورش استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه رازی به خاطر حمایت‌های مالی جهت انجام این مطالعه به عنوان بخشی از پایان نامه نویسنده اول تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافی ندارند.

منابع

Agarwala, B.K. and Dixon, A.F. (1992). Laboratory study of cannibalism and interspecific predation in ladybirds. *Ecological Entomology*, 17(4): 303-309.

- Alves, A.V., Sanjinez-Argandoña, E.J., Linzmeier, A.M., Cardoso, C.A.L. and Macedo, M.L.R. (2016). Food value of mealworm grown on *Acrocomia aculeata* pulp flour. PLoS One, 11(3): e0151275.
- Cotton, R.T. (1927). Notes on the biology of the mealworms *Tenebrio molitor* L. and *T. obscurus*. Fab 20, 81–86.
- Fernandez, F.J., Gamez, M., Garay, J. and Cabello, T. (2020). Do development and diet determine the degree of cannibalism in insects? To eat or not to eat conspecifics. Insects, 11(4): 242.
- Ghaly, A.E. and Alkoaik, F.N. (2009). The yellow mealworm as a novel source of protein. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 4(4): 319-331.
- Hill, D. S. (2002). Pests: class insecta. Pests of stored foodstuffs and their control, 135-315.
- Ichikawa, T. and Kurauchi, T. (2009). Larval cannibalism and pupal defense against cannibalism in two species of tenebrionid beetles. Zoological science, 26(8): 525-529.
- Jiang, D., Wen, X. and Zhou, B. (2022). Stationary distribution and extinction of a stochastic two-stage model of social insects with egg cannibalism. Applied Mathematics Letters, 132: 108100.
- Kim, S.Y., Park, J. Bin, Lee, Y.B., Yoon, H.J., Lee, K.Y. and Kim, N.J. (2015). Growth characteristics of mealworm *Tenebrio molitor* 53: 1–5.
- Mastrantonio, V., Crasta, G., Urbanelli, S. and Porretta, D. (2021). Cannibalism and necrophagy promote a resource loop and benefit larval development in insects of temporary waters. Insects, 12(7): 657.
- Damborsky, M., Bar, P. S. T., & Oscherov, M. E. (2000). Ciclo de Vida de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) en Condiciones Experimentales. Comunicaciones Cientificas yTecnologicas. UNNE 6, (UNNE 6), 35–38.
- Patterson, A.K. (2016). Chemosensitivity in mealworms and Darkling beetles (*Tenebrio molitor*) across oxygen and carbon dioxide gradients. Unpublished master's thesis, Department of Biological Sciences, Wright State University.
- Pires, E.M., Zanuncio, J.C. and Serrão, J.E. (2011). Cannibalism of *Brontocoris tabidus* and *Podisus nigrispinus* during periods of pre-release without food or fed with *Eucalyptus cloeziana* plants. Phytoparasitica, 39(1): 27-34.
- Riberio, N. T. G. M., (2017). *Tenebrio molitor* for food or feed. Rearing conditions and the effect of pesticides on its performance. Escola Superior Agraria, Politecnica de Coimbra, 1 (1): 1-70.
- Richardson, M.L., Mitchell, R.F., Reagel, P.F. and Hanks, L.M. (2010). Causes and consequences of cannibalism in noncarnivorous insects. Annual review of entomology, 55(1): 39-53.
- Siemianowska, E., Kosewska, A., Aljewicz, M., Skibniewska, K.A., Polak-Juszczak, L., Jarocki, A. and Jedras, M. (2013). Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. Agricultural Sciences, 4, 287-291.
- Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G. and Vantomme, P. (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security (No. 171). Food and agriculture organization of the United Nations.
- Via, S. (1999). Cannibalism facilitates the use of a novel environment in the flour beetle, *Tribolium castaneum*. Heredity, 82(3): 267-275.

Zubaidi, F.A. and Capinera, J.L. (1983). Application of different nitrogen levels to the host plant and cannibalistic behavior of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 12(6): 1687-1689.

Cannibalistic behavior of the yellow mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 under laboratory condition

Raziye Rashidi Ilzoleh¹, Vahid Akmal^{2*}

Received: 2022.8.22

Accepted: 2023.2.12

Abstract

Introduction: In many insect species, cannibalism has been reported as a natural behavior, and in this behavior, complete insects and larvae feed on eggs and pupae in the absence of food. **Materials and methods:** In the present study, seven diet groups, each of which contains a mixture of wheat bran with barley, corn, and chickpea, were provided as beetle breeding environments. The effect of the above diets groups in the presence of carrot (saturation period) and the absence of fruit (hunger period) on the selective cannibalism behavior of whole insects and larvae was investigated. **Results and discussion:** The results of the selective behavior analysis of beetle showed that they prefer eggs first and then pupae, which is probably due to their searching behavior in the bed of the breeding environment containing eggs, as well as the eggs' inability to avoid hunting. In the selective behavior of the larvae, it was observed that they attack the pupae first rather than the complete insects, which is probably due to the inability of the pupae to avoid prey and also having a soft and moist body. Also, the results of this research showed that the nutrition factor and diet quality have a significant effect on cannibalism. In the study of the effect of periods of starvation (12, 24, 36, 48) on the rate of cannibalism of the whole insect, it was observed that insects with more than 12 hours of starvation show the highest rate of cannibalism.

Keywords: mealworm, pupa, selective behavior, starvation period

Master's student, Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran.

Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran.

(*Responsible author: v_akmali@razi.ac.ir)



اثر تنش یخ‌زدگی بر برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و آنتی‌اکسیدانی گل‌های زینتی میمونی (*Antirrhinum majus*) و بنفشه (*Viola × wittrockiana*)

بهروز صالحی اسکندری^{۱*}، زهره نصیریان جزی^۲، جلیل عباس‌پور^۳

چکیده

مقدمه: یخ‌زدگی یکی از تنش‌های غیرزیستی است که اثرات زیانباری بر رشد و بهره‌وری گیاهان دارد. این پژوهش به منظور بررسی برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دو گیاه زینتی و مقاوم به سرما شامل گل میمونی (*Antirrhinum majus*) و بنفشه (*Viola × wittrockiana*) در شرایط تنش یخ‌زدگی انجام شد. **مواد و روش‌ها:** از کمینه دمایی دی‌ماه سه مکان مختلف گلخانه، شهر اصفهان و فریدون‌شهر (به ترتیب دماهای ۲۰، ۳- و ۱۱- درجه سانتی‌گراد) جهت اعمال تیمارهای مختلف دمایی بر روی گیاهان ۷۰ روزه کشت شده در گلدان به مدت ۱۵ روز استفاده شد. **نتایج:** اگرچه روند تغییرات نسبت کلروفیل a و b در دو گیاه متفاوت بود، اما با افزایش برودت هوا رشد طولی ساقه روند کاهشی داشت بطوری‌که در پایین‌ترین دما، طول ساقه گل میمونی و بنفشه به ترتیب ۶۳ و ۵۰ درصد نسبت به گیاهان رشد یافته در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد کاهش داشت. مقدار ترکیبات فنلی، کربوهیدرات‌های محلول و هیدروژن پراکسید روند افزایشی داشت. همچنین افزایش قابل توجهی در فعالیت آنزیم کاتالاز هر دو گیاه و آسکوربات پراکسیداز گل میمونی تحت برودت ۱۱- درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید اما فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در هیچ یک از سطوح دمای انجماد تغییر معنی‌داری نداشت. **بحث:** بنابراین به نظر می‌رسد گیاه گل میمونی و بنفشه با بکارگیری سازوکارهای تنظیم اسمزی و با توانایی‌های متفاوت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، می‌توانند در برابر تنش حاصل از انجماد مقاومت کنند که نشان‌دهنده راهکارهای مقاومتی متفاوت وابسته به ژنوتیپ آنهاست.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات فعال اسمزی، تنش سرما، رنگدانه‌های فتوسنتزی، گیاهان زینتی

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران ایمیل (*نویسنده مسئول: Behsalehi@Pnu.ac.ir)

۲- دانش‌آموخته ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳- دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی گیاهی دانشگاه اصفهان

مقدمه

گیاهان هنگامی تنش غیرزیستی سرما را می‌توانند تجربه کنند که برای مدت طولانی در معرض دمای پایین قرار گیرند. تنش یخ‌بندان یا دمای کمتر از صفر درجه برای گیاهان، به‌ویژه زمانی که گیاهان در مرحله رشد فعال هستند (در اواخر بهار یا اوایل پاییز) بسیار مضر است (Nievola et al., 2017; Hajhashemi et al., 2020). تنش سرما سبب تغییر فرآیندهای مختلف ریختی، سلولی، فیزیولوژیکی و سایر فرآیندهای بیوشیمیایی گیاهان می‌شود که کاهش رشد و نمو و بهره‌وری را در پی دارد (Yadav, 2010). بنابراین، دمای پایین یکی از بزرگترین عوامل محیطی کاهش‌دهنده محصول است که منجر به تلفات سنگین محصولات زراعی می‌شود. با توجه به تغییرات آب و هوایی، کشف راهکارهایی و اتخاذ تدابیری برای کاهش آسیب‌های وارد شده به محصولات مختلف توسط دماهای پایین برای پژوهشگران به یک چالش تبدیل شده است (Saleem et al., 2021). تنش حاصل از دمای پایین، به دو تنش سرمایی (chilling stress) و تنش یخ‌زدگی (freezing stress) تقسیم می‌شود که برای تنش سرما، دمای بین صفر و ۱۵ درجه سانتی‌گراد را در نظر می‌گیرند و تنش یخ‌زدگی را دمای کمتر از صفر درجه می‌دانند (Ding et al., 2019). دماهای پایین علاوه بر تاثیر بر رشد و نمو گیاهان، به‌صورت مشهود پراکنش جغرافیایی آنها را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. گیاهان مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر به تنش سرما حساس هستند و فاقد توانایی سازگاری با تنش سرما هستند ولی گیاهان مناطق معتدل اگر برای مدتی در معرض تنش سرما قرار گیرند قادر به تحمل دماهای یخ‌زدگی خواهند بود که اصطلاحاً به آن سازگاری به تنش سرما (Cold acclimation) می‌گویند (Sanghera et al., 2011; Ritonga & Chen, 2020).

پاسخ گیاهان زراعی به تنش دمای پایین متنوع است. بسیاری از محصولات زراعی مانند برنج (*Oryza sativa*)، ذرت (*Zea mays*)، سویا (*Glycine max*)، کتان (*Gossypium herbaceum*)، سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) و گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) به تنش سرما حساس هستند و قابلیت سازگاری به سرما را ندارند. برخلاف آن، برخی گیاهان از جمله جو دوسر (*Avena sativa*) به تنش سرما مقاوم بوده ولی به یخ‌زدگی حساس هستند. گروه سوم گیاهانی مانند گندم (*Hordeum sativa*)، جو (*Hordeum sativa*) و چاودار (*Secale cereale*) هستند که به خوبی با تنش یخ‌زدگی سازگار شده‌اند (Ritonga & Chen, 2020). با این وجود، برخی گیاهان همچون گندم زمستانه (*Triticum aestivum*)، آرابیدوسیس (*Arabidopsis*) و جو (*Hordeum vulgare*) بدون سازگاری به تنش سرما قادر به تحمل دمای یخ‌زدگی نخواهند بود (Zhao et al., 2015).

تنش سرما رشد و نمو گیاهان را به چند دلیل مختل می‌کند. اول اینکه با تاثیر بر پایداری غشاء، سبب ایجاد یکسری پاسخ‌های پایین‌دست در گیاه می‌شود (Orvar et al., 2000). سپس، ثبات پروتئین‌ها یا کمپلکس‌های پروتئینی را مختل می‌کند و فعالیت آنزیم‌ها از جمله آنزیم‌های حذف‌کننده گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) را کاهش می‌دهد. این فرآیندها منجر به ممانعت نوری، اختلال در فتوسنتز و تخریب قابل توجه غشاها می‌شود (Siddiqui & Cavicchioli, 2006; Ruelland et al., 2009). در نهایت، تنش سرما با تاثیر بر بیان ژن‌ها، سنتز پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار خواهد داد (Ruelland et al., 2009; Ding et al., 2019).

باید توجه داشت که تنش یخ‌زدگی بیش از تنش سرما به گیاهان آسیب می‌رساند و حتی ممکن است منجر به مرگ گیاه شود. در شرایط طبیعی، آسیب انجماد با ایجاد یخ در خارج سلول شروع می‌شود (Pearce, 2001). با تشکیل هسته‌ی یخ، این هسته رشد کرده و بلورهای یخی را ایجاد می‌کند که در آپوپلاست نفوذ کرده و با ایجاد تفاوت در فشار اسمزی بیرون و درون سلول، منجر به خروج آب از سلول و کم‌آبی آن می‌شود. همچنین با رشد بلور یخ، به غشا سلولی نیز آسیب وارد می‌شود (Thomashow, 1999). در جریان سازگاری گیاهان به تنش دمای پایین، اسموتیکوم‌هایی چون پرولین، قندهای محلول و مولکول‌های دیگری با وزن کم تولید می‌شوند که نقش آنها محافظت از گیاهان در برابر تخریب حاصل از سرماست (Ruelland et al., 2009).

یکی از مهمترین پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله دمای پایین، تجمع ROS است. در مورد دماهای

پایین اعتقاد بر این است که تجمع آنها به دلیل عدم تعادل در واکنش‌های اولیه (واکنش‌های نوری) و ثانویه (واکنش‌های تثبیت دی‌اکسیدکربن) فتوسنتز صورت می‌گیرد (Li et al., 2009). تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال موجب آسیب به اجزای ضروری سلول و اختلال در متابولیسم سلولی می‌شود (Siddiqui & Cavicchioli 2006; Ruelland et al. 2009). گیاهان برای کاهش اثرات مخرب گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن، سیستم دفاعی خود را فعال می‌کنند تا با فرآیند خنثی‌سازی، پتانسیل آسیب‌زایی آنها را کاهش دهند. این سیستم کارآمد شامل سازوکارهای آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی است که این دو باهمدیگر به عنوان یک سیستم موثر سم‌زدا عمل می‌کنند. سیستم غیرآنزیمی شامل فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، ترکیبات فنلیک، توکوفرول، گلوکاتیون و آسکورات بوده و پاسخ آنتی‌اکسیدان آنزیمی شامل محدودده وسیعی از آنزیم‌ها از جمله سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و آنزیم‌های چرخه آسکورات-گلوکاتیون از جمله آسکورات پراکسیداز (APX) گلوکاتیون رودکتاز (GR)، منو دهیدروآسکورات ردکتاز (MDHAR) و دهیدروآسکورات ردکتاز (DHAR) می‌شود (Rajput et al., 2021). گل میمونی (*Antirrhinum majus*) از گیاهان زینتی مناطق معتدل مدیترانه‌ای است که گل‌دهی آن به سرمای بهاره وابسته است (Noto & Romano 1988). بنفشه (*Viola × wittrockiana*) گیاهی زینتی با گل‌های زیبا و مقاوم به سرماست (Deljou et al., 2016). اثر تیمارهای مختلف یخ‌زدگی بر گیاه بنفشه (*Viola gracilis* L) نشان داد کاهش دما منجر به کاهش رشد و افزایش نشت الکترولیت این گیاه می‌شود و مرگ این گیاه در دماهای پایین‌تر از ۱۸- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (Nezami et al., 2011). در پژوهش دیگر رابطه تنش سرما و تنش خشکی در گیاه بنفشه (*Viola × wittrockiana*) بررسی شد، ظرفیت زراعی ۶۰ درصد در دمای صفر درجه با افزایش ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان منجر به افزایش رشد رویشی و افزایش مقاومت به تنش یخ‌زدگی این گیاه می‌گردد (Oraee et al., 2022). هدف از این تحقیق ارزیابی واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاهان زینتی بنفشه و گل میمونی به یخ‌زدگی است که منجر به درک بهتر نقش سازگاری، در مقاومت آنها به یخ‌زدگی می‌شود و بخشی از مکانسیم‌های اختصاصی تحمل به یخ‌زدگی در این گیاهان مشخص می‌گردد.

مواد و روش‌ها

بذرهای گل‌های زینتی مقاوم به سرما بنفشه و گل میمونی از موسسه پاکان بذر خریداری شد. قبل از جوانه‌زنی بذرها (در اواسط مهرماه)، سطوح آن‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی و سپس چندین بار با آب معمولی شستشو شدند. پس از جوانه‌زنی و رشد بذرها در سینی کشت حاوی پیت ماس، سه گیاهچه یکسان به گلدان‌های پلاستیکی حاوی پیت ماس، خاک معمولی، پرلیت و خاک برگ با نسبت‌های برابر منتقل و در گلخانه‌ای با دمای 25 ± 5 درجه سانتی‌گراد (با نور طبیعی) نگهداری شدند. پس از ۵۰ روز گیاهان برای سازگاری با تنش سرما (در اواخر آذرماه) در محیط بیرون گلخانه (شهر اصفهان) با دمای $6/2 \pm 8/4$ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و در نهایت گیاهچه‌ها ۷۰ روزه در اوایل دی‌ماه بمدت ۱۵ روز در سه مکان مختلف شامل محیط گلخانه (25 ± 5 درجه سانتی‌گراد)، مزرعه کنار گلخانه (شهر اصفهان) با ارتفاع ۱۵۵۰ متر از سطح دریا و مزرعه واقع در فریدون‌شهر (با ارتفاع ۲۴۹۰ متر از سطح دریا) قرار گرفتند. کمینه دما ثبت شده برای این مکان‌ها در این مدت ۲۰، ۳/۴- و ۱۰/۵- درجه‌سانتی‌گراد بود و نمودارها براساس این کمینه دمایی ترسیم شدند، به‌نحوی که دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد و مابقی تیمارها نسبت به آن ارزیابی گردید. آزمایش‌ها بر اساس طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی (برای هر تیمار با سه تکرار) صورت گرفت.

محاسبه میزان رشد: پس از ۱۵ روز گلدان‌های حاوی گیاه به آزمایشگاه منتقل شده و طول ساقه هر گیاه در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری و برحسب سانتی‌متر ثبت شد که به عنوان معیاری برای اندازه‌گیری رشد مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری نسبت کلروفیل a و b: برای اندازه‌گیری نسبت کلروفیل a به b، قطعاتی از چهارمین برگ (از راس) گیاهان به طور تصادفی جدا شد سپس ۵۰ میلی‌گرم از بافت برگ گیاهان وزن و با استون ۸۰ درصد در هاون به‌طور کامل ساییده و حجم آن با استون به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل سانتریفیوژ شد و از محلول فوقانی برای اندازه‌گیری

کلروفیل استفاده شد. جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد (Arnon, 1949) و کلروفیل a و b طبق روابط ۱ و ۲ محاسبه و مقدار رنگی‌های فتوسنتزی برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و از تقسیم میزان کلروفیل a به b نسبت آنها ارائه گردید.

$$\text{Chl } b(\text{mg/g}) = (22.9A_{645} - 4.68A_{663}) \times \frac{V}{1000} \times \frac{1}{W} \quad \text{رابطه ۱:}$$

$$\text{Chl } a(\text{mg/g}) = (12.7A_{663} - 2.69A_{645}) \times \frac{V}{1000} \times \frac{1}{W} \quad \text{رابطه ۲:}$$

در رابطه ۱ و ۲، A، V و W به ترتیب، میزان جذب نوری عصاره در طول موج مورد مطالعه، حجم نهایی عصاره و وزن برگ است.

اندازه‌گیری محتوای ترکیبات فنلی: محتوای فنل کل از روش Velioğlu و همکاران (۱۹۹۸) محاسبه شد. مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از چهارمین برگ (از راس) هر تیمار را با ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد حاوی اسید کلریدریک ۱ درصد سائیده و به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس مخلوط حاضر در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و از محلول رویی و با استفاده از معرف فولین جهت تعیین ترکیبات فنلی کل استفاده شد (Velioğlu et al., 1998). برای محاسبه غلظت ترکیبات فنلی کل با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک طبق رابطه ۳، غلظت ترکیبات فنلی بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر گزارش شد.

$$R^2 = 0.9699 \text{ و } Y = 0.0299X + 0.1056 \quad \text{رابطه ۳:}$$

در این رابطه، Y، X و R به ترتیب، میزان جذب نوری عصاره در طول موج ۲۲۵ نانومتر، میزان ترکیبات فنلی و ضریب اطمینان منحنی می‌باشد.

سنجش کربوهیدرات‌های محلول: اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول در آب (Water Soluble Content; WSC)

به روش Dubois و همکاران (۱۹۵۶) (Abou-Shanab et al., 2003)، با استفاده از بافت تازه برگ به روش فنل-اسیدسولفوریک انجام پذیرفت. بدین منظور ۱ گرم بافت برگ توزین شد و با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس مخلوط حاضر در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک افزوده شد و با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از گلوکز میزان قند برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تر، طبق رابطه ۴ گزارش شد.

رابطه ۴: $X = \frac{A}{W}$ در این رابطه، X، A و W به ترتیب، کربوهیدرات‌های محلول در آب برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تر، میزان قند بر اساس منحنی استاندارد و وزن برگ تر می‌باشد.

محاسبه محتوای پراکسید هیدروژن: برای سنجش پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۰/۵ گرم بافت برگ توزین شد و با تری-کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد (w/v) درون هاون چینی بر روی یخ کاملاً ساییده شدند. عصاره حاصل با استفاده از سانتریفوژ یخچال دار به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ، ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد. مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با استفاده از ضریب خاموشی $2.8 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ و رابطه ۵ محاسبه شد (Sergiev et al., 1997).

رابطه ۵: $A = \epsilon bc$ در این رابطه، A، ϵ ، b و c به ترتیب، میزان جذب نوری عصاره، ضریب خاموشی، میزان پراکسید هیدروژن و عرض کوت که یک سانتی‌متر بود.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: برای استخراج عصاره گیاهی، ۰/۱ گرم از بافت تر اندام هوایی به

همراه ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج فسفات ۵۰ میلی‌مولار (با اسیدیته ۷/۸) حاوی پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVP) ۲ درصد، اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار و دی‌تیول تری‌تول (DDT) ۱ میلی‌مولار، در هاون سرد ساییده شد. محلول

حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): سنجش فعالیت آنزیم CAT با استفاده از روش Aebi (۱۹۸۳) انجام شد. مخلوط واکنش جهت سنجش آنزیم کاتالاز، شامل ۹۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) حاوی ۱۰ میلی‌مولار هیدروژن پراکسید و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت آنزیم کاتالاز به صورت جذب کاهشی در مدت زمان ۱ دقیقه و در طول موج ۲۴۰ نانومتر ثبت و توسط ضریب خاموشی $0.036 \text{ m M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ، طبق رابطه ۵ محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): سنجش فعالیت این آنزیم با استفاده از روش Asada (۱۹۸۷) انجام شد. مخلوط واکنش جهت سنجش فعالیت این آنزیم، شامل ۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) حاوی ۰/۲ میلی‌مولار EDTA و ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربات سدیم بود که به آن ۵۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۴ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراجی افزوده شد. فعالیت APX طی ۱ دقیقه و در طول موج ۲۹۰ نانومتر ثبت و توسط ضریب خاموشی $2/8 \text{ m M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ، طبق رابطه ۵ محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POD): برای سنجش میزان فعالیت آنزیم POD، از مخلوط واکنش استفاده شد که شامل ۸۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۱۰۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۰/۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراجی بود. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در گروه شاهد و تیمار بر اساس تغییرات جذب نور توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۳۶ نانومتر برای مدت یک دقیقه ثبت و توسط ضریب خاموشی $25/5 \text{ m M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ، طبق رابطه ۵ محاسبه شد (Plewa et al., 1991). فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین براساس تغییرات واحد جذب در دقیقه محاسبه گردید.

محاسبه‌های آماری: کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزار SPSS 26 انجام شد. نتایج با استفاده از Tow-way ANOVA با دو عامل اصلی گیاهان زینتی و سرما تحلیل شدند. در شکل‌ها، ستون‌ها نماینده میانگین ۳ تکرار و میله‌های عمودی نشان دهنده خطای معیار ($\pm SE$) می‌باشند. مقایسه میانگین‌ها با بکارگیری آزمون چند دامنه‌ای دانکن با ضریب اطمینان ۹۵ درصد انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

نتایج آنالیز واریانس اثر دما، گیاه و برهمکنش آنها در جدول ۱ نشان داد که دما، تمام شاخص‌های اندازه‌گیری شده را بجز نسبت کلروفیل a/b و فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تاثیر قرار داد ($P < 0.05$)، تاثیر گیاه نیز همانند دما بود، هرچند بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز تاثیر نداشت ($P > 0.05$). برهمکنش دما و گیاه نیز همانند تاثیر گیاه بود البته برخلاف عدم تاثیر دو عامل اصلی دما و گیاه بر نسبت کلروفیل a/b و محتوای فنل کل برهمکنش آنها بر این شاخص‌ها معنی‌دار شد ($P < 0.05$).

مطابق شکل ۱- A، با کاهش دما، طول ساقه در هر دو گیاه مورد مطالعه نسبت به گروه شاهد (۲۰ درجه‌سانتی‌گراد) روند کاهشی معنی‌داری را نشان داد. این کاهش در دمای ۳- و ۱۱- در گل میمونی به ترتیب مقادیر ۱۸/۸ و ۳۷/۵ درصد بود ($P < 0.05$) و در گیاه بنفشه کاهش معنی‌دار ۲۱/۴ و ۵۰ درصدی در مقایسه با گیاه شاهد (دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد) داشت. با توجه به این‌که روند کاهش طول در هر دو گیاه با کاهش دما مشابه بود بنابراین طبق جدول ۱ برهمکنش‌های آنها (گیاه × سرما) معنی‌دار نشد ($P > 0.05$).

نسبت کلروفیل a به b در گل میمونی در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد (۲۰ درجه‌سانتی‌گراد) داشت ($P < 0.05$) ولی در پایین‌ترین دما (۱۱- درجه سانتی‌گراد) این نسبت تغییر معنی‌داری نداشت و با گروه

شاهد در یک سطح قرار گرفت. نسبت کلروفیل a به b در گل بنفشه با افزایش برودت هوا نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) ولی اختلاف معنی‌داری بین دمای ۳- و ۱۱- درجه سانتی‌گراد مشاهده نشد (شکل ۱-B). با توجه به پاسخ متفاوت دو گیاه به افزایش برودت دما بنابراین طبق جدول ۱ برهمکنش‌های آنها (گیاه $\times$ یخ‌زدگی) معنی‌دار شد ($P < 0.05$).

جدول ۱- آنالیز واریانس (مجموع مربعات) اثر دما، گیاه و برهمکنش اولیه آن‌ها بر طول ساقه، نسبت کلروفیل a به b، کربوهیدرات‌ها، فنل کل، میزان پراکسید هیدروژن و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گایاکول پراکسیداز (POD).

Table 1. The analysis of variance (Sum of square) of the effect of temperature, plant and their interaction on stem length, the ratio of chlorophyll a to b, on total phenolic, carbohydrate so, hydrogen peroxide (H_2O_2) and activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (POD).

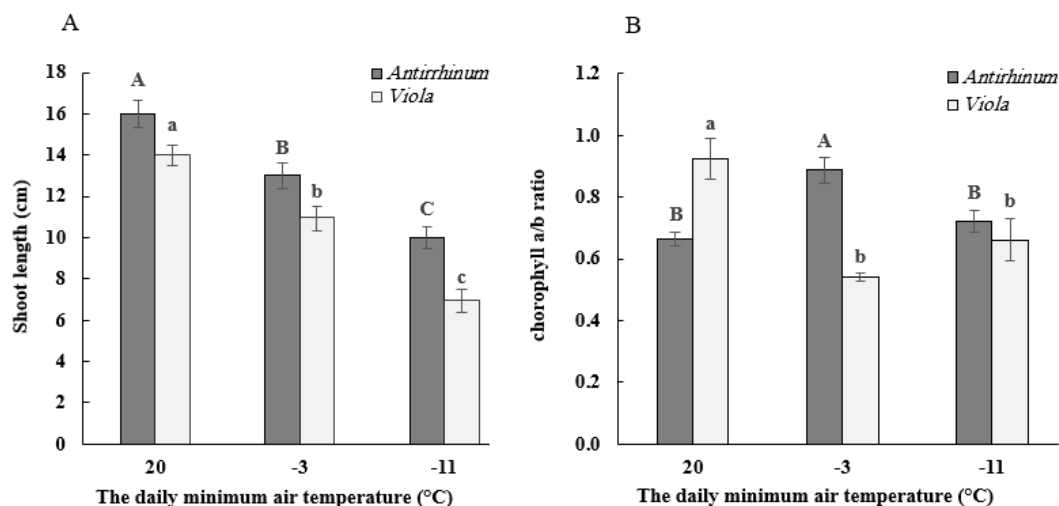
مجموع مربعات (Sum of square)									
Sources of variations	Degrees of freedom	POD activity	APX activity	CAT activity	Hydrogen peroxide	soluble carbohydrates	Total phenolic	Chl. a to b ratio	Shoot length
Cold	2	0.023 ^{ns}	0.00*	2.88***	0.27***	2.84***	0.22***	0.05 ^{ns}	127***
Plant	1	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.11***	0.014***	6.5***	0.006***	0.01 ^{ns}	24.5**
Cold $\times$ Plant	2	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.001***	0.005*	0.342***	0.001 ^{ns}	0.4***	1 ^{ns}
Error		0.009	0.000	0.008	0.001	0.002	0.000	0.009	1
The coefficient of variation		6.1	2.3	6.9	15.1	2.9	6.2	4.4	6.2

ns, **, *** و ***: بترتیب نشان‌دهنده معنی دار نبودن، معنی‌دار در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد، معنی‌دار در سطح احتمال کمتر از ۱ درصد و معنی‌دار در سطح احتمال کمتر از ۰/۱ درصد

درصد و معنی‌دار در سطح احتمال کمتر از ۰/۱ درصد
ns, *, ** and ***: non-significant, significant at probability level 5%, 1% and 0.1% respectively

نتایج حاصل از تنش یخ‌زدگی بر تغییرات محتوای فنل کل در برگ گل میمونی و بنفشه نشان داد که کاهش دما میزان محتوای فنل کل در برگ هر دو گیاه را افزایش داد (شکل ۲-A). افزایش فنل کل در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد برای گل میمونی ۱/۹ برابر و در بالاترین سطح تنش (دمای ۱۱- سانتی‌گراد) به ۲/۴ برابر گیاهان کشت داده شده در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد رسید. در گل بنفشه نیز به ترتیب در دمای ۳- و ۱۱- درجه سانتی‌گراد افزایش ۱/۷ و ۲ برابری محتوای فنل کل در مقایسه با گروه شاهد دیده شد ($P < 0.05$). همچنین با توجه به پاسخ مشابه فنل کل در هر دو گیاه نسبت به تنش، برهمکنش آن‌ها با تنش یخ‌زدگی (گیاه $\times$ یخ‌زدگی) معنی‌دار نشد (جدول ۱).

میزان قندهای محلول در اندام‌های هوایی هر دو گیاه با کاهش دمای هوا روندی افزایشی داشت بطوری‌که میزان کربوهیدرات‌های محلول گل میمونی در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد، ۲/۸ برابر میزان کربوهیدرات‌های محلول این گیاه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود و در پایین‌ترین دما (۱۱- درجه سانتی‌گراد) این افزایش به ۳/۳ برابر رسید. گیاه بنفشه نیز در نتیجه اعمال سرمای ۳- و ۱۱- درجه سانتی‌گراد به ترتیب افزایش معنی‌دار ۱۱/۴ و ۳۸/۱ درصدی کربوهیدرات‌های محلول را نسبت به دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد داشت (شکل ۲-B). با توجه به روند افزایشی متفاوت کربوهیدرات‌های محلول در هر دو گیاه تحت تنش یخ‌زدگی، اثر تقابل گیاه و یخ‌زدگی معنی‌دار شد (جدول ۱).

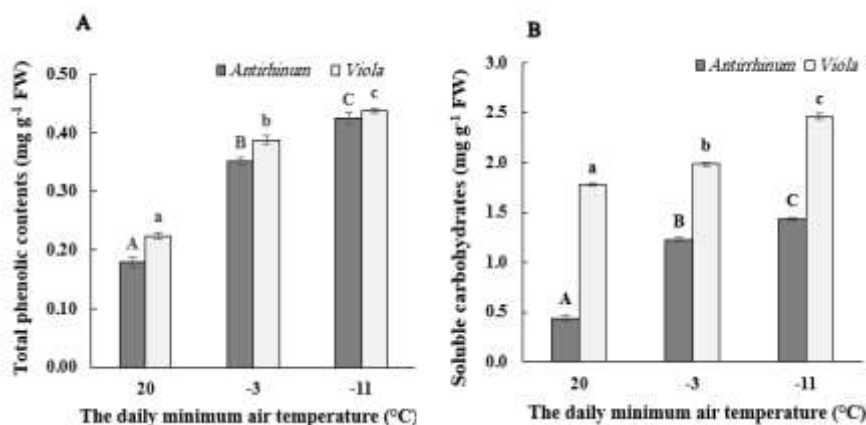


شکل ۱- اثر دماهای مختلف بر طول اندام‌های هوایی (A) و نسبت کلروفیل a / b (B) در گل میمونی و بنفشه. داده‌ها، میانگین $\pm$ خطای استاندارد از سه تکرار است. حروف مشابه در هر ستون (حروف کوچک و بزرگ به ترتیب برای گیاه بنفشه و میمون) بر اساس آزمون دانکن نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) می باشد.

Fig. 1- The effect of different temperatures on shoot length (A) and the ratio of chlorophyll a to b (B) in snapdragon (*Antirrhinum majus*) and viola (*Viola × witrockiana*). Data are mean $\pm$ SE of three replicates ($n = 3$). The presence of similar letters, in each column, (Lowercase letters for viola and uppercase letters for snapdragon), indicate no statistical significant difference based on Duncan's test ($P > 0.05$).

در نتیجه تنش یخ‌زدگی در دمای ۳- درجه‌سانتی‌گراد، افزایش معنی‌داری در محتوای آب اکسیژنه (پراکسید هیدروژن) هر دو گیاه در مقایسه با گروه شاهد (۲۰ درجه‌سانتی‌گراد) مشاهده شد ($P < 0.05$) بطوری‌که این افزایش به ترتیب در گل میمونی و بنفشه ۱۳/۱ و ۶/۲ برابر نمونه‌های شاهد هر یک از گیاهان بود که در دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد رشد یافته بودند (شکل ۳- A). بیشترین مقدار پراکسید هیدروژن در تنش دمایی ۱۱- درجه‌سانتی‌گراد مشاهده شد که منجر به افزایش ۲۹/۶ برابری این ماده در گیاه گل میمونی شد. در گیاه بنفشه مقدار پراکسید هیدروژن گیاهان قرار گرفته در دمای ۱۱- حدود ۸/۹۶ برابر گیاهان شاهد بود ($P < 0.05$). با توجه به الگوی متفاوت افزایش میزان پراکسید هیدروژن دو گیاه نسبت به تنش یخ‌زدگی، اثر هر کدام از عوامل و برهمکنش آن‌ها (گیاه $\times$ یخ‌زدگی) معنی‌دار شد (جدول ۱).

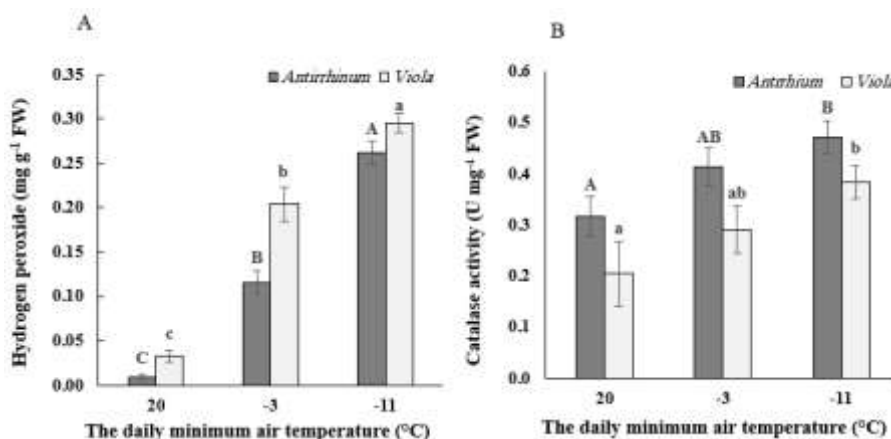
مطابق شکل ۳- B، با کاهش دما تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو گیاه مورد مطالعه نسبت به گروه شاهد (۲۰ درجه‌سانتی‌گراد) روند افزایشی نشان داد. این افزایش در دمای ۳- و ۱۱- درجه‌سانتی‌گراد در گیاه میمونی به ترتیب مقادیر ۳۰/۳ و ۴۸/۶ درصد بود و در گیاه بنفشه، افزایش ۴۲/۱ و ۸۷/۹ درصدی در مقایسه با گیاهان شاهد رشد یافته در دمای ۲۰ درجه‌سانتی‌گراد داشت که تغییرات افزایش فعالیت آنزیم در هر دو گیاه فقط در تیمار ۱۱- درجه‌سانتی‌گراد معنی‌دار بود ($P < 0.05$). با توجه به این‌که روند افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز با کاهش دما در هر دو گیاه متفاوت بود بنابراین طبق جدول ۱ اثر هر کدام از عوامل (یخ‌زدگی و گیاه) و برهمکنش‌های آنها معنی‌دار شد.



شکل ۲- اثر دماهای مختلف بر محتوی فنل کل (A) و محتوی کربوهیدرات محلول (B) در گل میمونی و بنفشه. داده‌ها میانگین $\pm$ خطای استاندارد از سه تکرار است. حروف مشابه در هر ستون (حروف کوچک و بزرگ به ترتیب برای گیاه بنفشه و میمون) بر اساس آزمون دانکن نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) می باشد.

Fig. 2. The effect of different temperatures on total phenolic (A) and carbohydrate content (B) in snapdragon (*Antirrhinum majus*) and viola (*Viola x wittrockiana*). Data are mean $\pm$ SE of three replicates ($n = 3$). The presence of similar letters, in each column, (Lowercase letters for viola and uppercase letters for snapdragon), indicate no statistical significant difference based on Duncan's test ($P > 0.05$).

نتایج حاصل از تنش حاصل از برودت دما بر تغییرات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ گل میمونی و بنفشه در شکل A-۴ نشان داده شده است. افزایش فعالیت این آنزیم در دمای -۳ درجه سانتی‌گراد برای هیچ کدام از گیاهان مورد بررسی نسبت به تیمار شاهد (۲۰ درجه سانتی‌گراد) معنی‌دار نشد ($P > 0.05$). اما در بالاترین سطح تنش (دمای -۱۱ - سانتی‌گراد) نسبت به گروه شاهد در گل میمونی افزایش ۱۹/۸ درصدی مشاهده شد ($P < 0.05$). با توجه به پاسخ مشابه هر دو گیاه نسبت به تنش یخ‌زدگی، اثر گیاه در تقابل با سرما معنی‌دار نشد (جدول ۱). مطابق شکل B-۴، فعالیت آنزیم پراکسیداز در اندام‌های هوایی هر دو گیاه با کاهش دمای هوا تغییر معنی‌دار مشاهده نشد به طوری که تمام تیمارها در یک سطح قرار گرفتند ($P > 0.05$). با توجه به روند مشابه هر دو گیاه نسبت به تنش یخ‌زدگی، اثر گیاه، یخ‌زدگی و تقابل یخ‌زدگی و گیاه معنی‌دار نشد (جدول ۱).

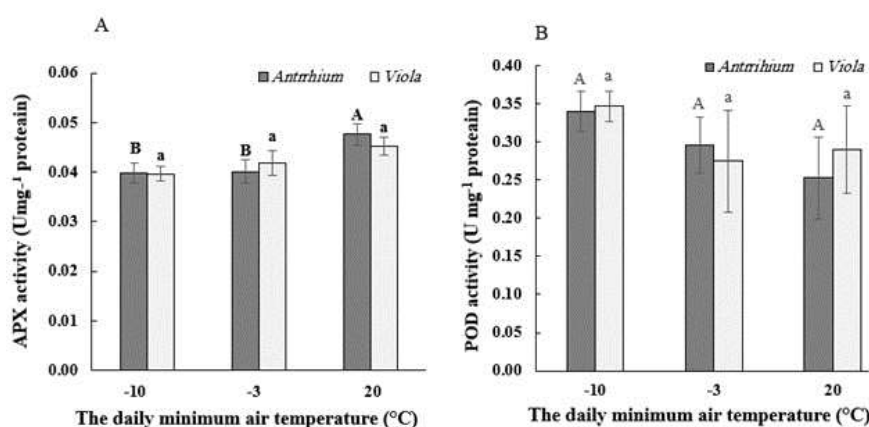


شکل ۳- اثر دماهای مختلف بر میزان پراکسید هیدروژن (A) و فعالیت آنزیم کاتالاز (B) در گل میمونی و بنفشه. داده‌ها میانگین $\pm$ خطای استاندارد از سه تکرار است. حروف مشابه در هر ستون (حروف کوچک و بزرگ به ترتیب برای گیاه بنفشه و میمون) بر اساس آزمون دانکن نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) می باشد.

Fig. 3. The effect of different temperatures on hydrogen peroxide (H₂O₂) content (A) and activity of catalase (B) in snapdragon (*Antirrhinum majus*) and viola (*Viola x wittrockiana*). Data are mean $\pm$ SE of three replicates ($n = 3$). The presence of similar letters, in each column, (Lowercase letters for viola and uppercase letters for Snapdragon), indicate no statistical significant difference based on Duncan's test ($P > 0.05$).

بحث

رشد و نمو گیاهان تابع شرایط بهینه محیطی است به گونه‌ای که انحراف از این شرایط می‌تواند باعث ایجاد تنش در آنها شود. یکی از شرایط محیطی نامساعد، دمای پایین است که رشد، نمو و توزیع جغرافیایی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. علاوه بر این دماهای پایین می‌تواند تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی زیادی در گیاهان ایجاد کند (Hereme et al., 2021). نتایج این پژوهش نشان داد که با کاهش دمای محیط (در حد یخ‌زدگی)، رشد طولی ساقه دو گیاه گل میمونی و بنفشه به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. کاهش رشد طولی گیاهان در نتیجه تنش یخ‌زدگی پیش از این نیز گزارش شده است. به‌عنوان مثال، تنش یخ‌زدگی بر روی دو اکوتیپ گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare* L.) منجر به کاهش طول ساقه این اکوتیپ‌ها شده است (Rashed Mohassel et al., 2009). مهمترین واکنش گیاهان به تنش دمای پایین در رشد آنها نمایان می‌گردد. دمای پایین با ممانعت از رشد سلول‌ها، رشد ریشه و ساقه را کاهش می‌دهد (Pouramir-Dashtman et al., 2014). گیاهان برای دستیابی به مقاومت لازم در برابر سرما، باید رشد خود را در طول مدت سازگاری با سرما متوقف کنند. در چنین شرایطی، گیاهان دارای تشکیلات ریختی فشرده می‌شوند و انواع گیاهان زمستانه معمولاً دارای برگ‌های رُزت (طوقه‌ای) می‌گردند (Rashed Mohassel et al., 2009). کاهش طولی اندام‌های هوایی در گیاه تراریخت گل اطلسی (*Petunia spp*) که ژن‌های مقاوم کننده در برابر یخ‌زدگی را دریافت کرده بود نیز مشاهده شد بطوری‌که این تغییرات، مقاومت آنها را به تنش دمای پایین افزایش داد (Walworth et al., 2014). برخلاف رشد طولی، تغییرات نسبت کلروفیل a به b در گل میمونی و بنفشه متفاوت بود. در گل میمونی تحت تنش دمایی ۳- درجه سانتی‌گراد افزایش نسبت کلروفیل a به b دیده شد درحالی‌که هر دو دمای زیر صفر (۳- و ۱۱- درجه سانتی‌گراد) سبب کاهش این نسبت در گیاه بنفشه شد. کاهش نسبت کلروفیل a به b در گیاهانی که در معرض تنش سرما قرار گرفته‌اند دیده شده است اما این کاهش در گیاهانی که فرآیند سازگاری در آنها ایجاد شده بود در مقایسه با گیاهانی که بدون سازگار شدن، در معرض سرما قرار گرفته‌اند کمتر بوده است (Shen et al., 2021). تغییرات میزان کلروفیل بسته به گونه گیاهی و شدت تنش دمای پایین می‌تواند متفاوت باشد. برخی مطالعات افزایش میزان کلروفیل (Yu et al., 2020) و برخی دیگر کاهش (Rehman & Tanti, 2021) را نشان داده‌اند. کاهش نسبت کلروفیل a به b در گیاه بنفشه ممکن است نشان دهنده حساسیت بیشتر کلروفیل a در دماهای زیر صفر در دستگاه فتوسنتزی این گیاه باشد درحالی‌که بالا بودن این نسبت در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد در گیاه میمونی احتمالاً نشان‌دهنده ممانعت نوری فتوسیستم I (PSI) توسط سرما است (Kalisz et al., 2016).



شکل ۴- اثر دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (A) و گایاکول پراکسیداز (B) در گل میمونی و بنفشه. داده‌ها میانگین $\pm$ خطای استاندارد از سه تکرار است. حروف مشابه در هر سری (حروف کوچک و بزرگ به ترتیب برای گیاه بنفشه و میمون) بر اساس آزمون دانکن نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) می‌باشد.

Fig. 4. The effect of different temperatures on activity of APX and POD in snapdragon (*Antirrhinum majus*) and viola (*Viola x wittrockiana*). Data are mean $\pm$ SE of three replicates ($n = 3$). The presence of similar letters, in each column, (Lowercase letters for viola and uppercase letters for Snapdragon), indicate no statistical significant difference based on Duncan's test ($P > 0.05$).

محتوای ترکیبات فنلی هر دو گیاه با افزایش تنش به تدریج افزایش یافت. مشابه با نتایج این پژوهش، افزایش ترکیبات فنلی تحت تنش یخ‌زدگی در گیاه *Haberlea rhodopensis* نیز گزارش شده است (Georgieva et al., 2021). به خوبی مشخص شده است که مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانویید که در بیوسنتز ترکیبات فنلی نقش دارد، در نتیجه تنش‌های محیطی منجر به تجمع ترکیبات فنلی مختلف می‌شود (Sharma et al., 2019). ترکیبات فنلی در گیاهان، آنتی‌اکسیدان‌های قدرتمندی هستند که با از بین بردن گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، تحت تنش‌های غیرزیستی، نقش مهمی در مقاوم‌سازی آنها ایفاء می‌کنند (Bistgani et al., 2019). همچنین مشخص شده است تحت تنش دمایی پایین، تولید ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد، سپس این ترکیبات به دیواره سلولی به‌عنوان سوپرین یا لیگنین اضافه می‌شوند. رسوب سوپرین و لیگنین مقاومت گیاهان در برابر دماهای پایین افزایش می‌دهد (Chalker-Scott & Fuchigami, 2018) و قدرت کش‌سانی دیواره سلولی را کاهش داده در نهایت منجر به کاهش رشد می‌شود (Solecka, 1997) که با یافته‌های قبلی ما در مورد کاهش وزن خشک این گیاهان در تنش یخ‌زدگی مطابقت دارد (Salehi-Eskandari et al., 2022). بنابراین افزایش مقدار ترکیبات فنلی در گیاه میمونی و بنفشه در اثر دماهای انجماد احتمالاً با ایفاء نقش آنتی‌اکسیدانی آنها مرتبط است که موجب کاهش گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر و مقاوم‌سازی آنها می‌شود تا تحمل این گیاهان به سرمای شدید را افزایش دهد. افزایش بیشتر ترکیبات فنلی در دمای ۱۱- نسبت به ۳- درجه سانتی‌گراد در هر دو گیاه، شاهد دیگری بر نقش آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات برای مقابله با آثار مخرب دماهای انجماد است. دماهای انجماد (۱۱- و ۳- درجه سانتی‌گراد) موجب افزایش معنی‌دار کربوهیدرات‌های محلول در دو گیاه مورد مطالعه شد. یکی از بارزترین تغییرات بیوشیمیایی در طول سازگاری با سرما، تجمع قندهای محلول در سلول‌ها است. قندهای محلول به‌عنوان اسمولیت، املاح سازگار، مولکول سیگنال‌دهنده، اسکلت کربن و ذخایر انرژی در بافت‌های گیاهی در زمستان عمل می‌کنند (Couée et al., 2006; Guy et al., 2008). در طول فصل زمستان، قندهای محلول گیاهانی که در معرض دمای پایین قرار می‌گیرند افزایش می‌یابد و سپس در بهار کاهش می‌یابند زیرا آنها در این فصل در حال سازگاری نیستند (Siminovitch, 1981).

در این مطالعه دماهای زیر صفر، سبب افزایش شدید محتوای هیدروژن‌پراکسید در هر دو گیاه زینتی شد به‌طوری که این مقدار در سرمای ۱۱- به اوج خود رسید. به‌طور مشابه، افزایش محتوای هیدروژن‌پراکسید در دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به سرمای نخود (*Cicer arietinum* L.) که در معرض دماهای انجماد قرار گرفته بوده‌اند نیز مشاهده شده است اما به دلیل تولید کمتر هیدروژن‌پراکسید در ژنوتیپ مقاوم به سرما چنین استنباط شده بود که تولید کمتر این گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS)، رابطه مستقیمی با بقاء ژنوتیپ‌های گیاه نخود در شرایط تنش یخ‌زدگی دارد (Soureshjani et al., 2021). پیشنهاد شده است که هیدروژن‌پراکسید اثر دوگانه دارد زیرا در غلظت‌های کم به‌عنوان یک سیگنال (پیام) برای القاء سنتز آنزیم‌های مهارکننده ROS عمل می‌کند و از طرفی دیگر با تجمع در مقادیر بالا می‌تواند اثر زیان‌باری بر اجزای سلولی داشته باشد (Quan et al., 2008). دمای انجماد باعث تجمع ROS و افزایش فعالیت آنزیم‌های مهارکننده آنها می‌شود که در این شرایط افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برای حذف هیدروژن‌پراکسید تجمع یافته کافی نیست (Arslan et al., 2018). بنابراین به‌نظر می‌رسد تولید هیدروژن‌پراکسید در دمای انجماد با ظرفیت ارتقاء یافته آنتی‌اکسیدانی گیاه میمونی و بنفشه مطابقت نداشته و در نتیجه تجمع آن رخ داده است.

بین تحمل به تنش یخ‌زدگی و یک سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمد ارتباط تنگاتنگی وجود دارد (Kaur et al., 2009). گیاهان مقاوم به سرما به‌دلیل داشتن محتوای آنتی‌اکسیدان آنزیمی قوی‌تر می‌توانند با کاهش تولید ROS و پراکسیداسیون لیپیدی، بقاء خود را افزایش دهند (Soureshjani et al., 2021). در این مطالعه بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز نشان داد که قرارگیری گیاه بنفشه در معرض دماهای انجماد (۱۱- و ۳- درجه سانتی‌گراد) تنها سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای ۱۱- درجه سانتی‌گراد شده است و دو آنزیم دیگر در هر دو شرایط دمایی تغییر معنی‌داری نداشته‌اند. این نتایج نشان داد آنزیم کاتالاز مسئول اصلی کاهش هیدروژن‌پراکسید در سرمای ۱۱- درجه سانتی‌گراد گیاه بنفشه است و از این نظر با یافته‌هایی که هماهنگی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با یکدیگر در ایجاد مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو را نشان می‌دهند (Zhang et al., 2017)، در تضاد است. مقایسه فعالیت کاتالاز در بین ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه، نقش این آنزیم را در ایجاد مقاومت به سرما در ژنوتیپ‌های مقاوم تایید شده است (Janda et al., 2007; Soureshjani et al., 2021).

(*al.*, 2021). در گیاه میمونی افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در دمای ۱۱- درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. با توجه به مطالعات انجام شده، افزایش فعالیت کاتالاز ممکن است با حذف سریع هیدروژن پراکسید، گیاهان را از آسیب اکسیداتیو محافظت کند. همچنین مشخص شده است که افزایش سطح هیدروژن پراکسید به دلیل انجماد، می‌تواند از طریق فعالیت ترکیبی کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز کاهش یابد (Lee *et al.*, 2004; Pfeiffer *et al.*, 2013). با این وجود، افزایش زیاد هیدروژن پراکسید با افزایش برودت، حاکی از آن است که علی‌رغم افزایش فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی برای کاهش هیدروژن پراکسید، میزان این گونه‌های اکسیژن فعال همچنان در گیاه گل میمونی و بنفشه بالاست. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که سرمای ۳- درجه سانتی‌گراد تأثیری معنی‌داری در القاء فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در هر دو گیاه ندارد. بنابراین در این سطح از تنش یخ‌زدگی، پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی این دو گیاه شامل این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نبوده و احتمالاً در این دما سایر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی وارد عمل شده‌اند. باید توجه داشت که کاتالاز نسبت به آسکوربات پراکسیداز میل ترکیبی کمتری به هیدروژن پراکسید دارد. بنابراین در مقادیر بالای هیدروژن پراکسید حذف این گونه واکنش‌گر اکسیژن عمدتاً توسط کاتالاز انجام می‌شود در حالی که آسکوربات پراکسیداز در غلظت‌های کمتر وارد عمل می‌شود (Sofa *et al.*, 2015). همچنین بر اساس مطالعات قبلی، مشخص شده است که تحت تنش یخ‌زدگی تغییرات فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهان مختلف و حتی در بین ارقام یک گونه می‌تواند متفاوت و گاهی متضاد باشد (Tajvar *et al.*, 2011; Pfeiffer *et al.*, 2013). در این پژوهش برخلاف مطالعات پیشین (Tajvar *et al.*, 2011)، تغییر معنی‌داری در فعالیت گایاکول پراکسیداز در هر دو گیاه و هر دو سطح تنش یخ‌زدگی رخ نداد که این احتمالاً نشان از عدم مشارکت این آنزیم در پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی دو گیاه مورد مطالعه در این شرایط تنشی دارد.

نتیجه‌گیری

تنش یخ‌زدگی، رشد طولی گیاهان زینتی را کاهش داد اما اثرات متفاوتی بر نسبت کلروفیل a و b در دو گیاه در اولین سطح تنش (۳- درجه سانتی‌گراد) داشت. الگوی افزایشی مشابهی در مقدار ترکیبات فنلی و کربوهیدرات‌های محلول با افزایش برودت در دو گیاه دیده شد. افزایش ترکیبات فنلی علاوه بر از خاصیت اکسیدانسی، با چوبی و چوب‌پنبه‌ای شدن دیواره‌ها و کاهش کش‌سانی آنها در نهایت منجر به کاهش رشد می‌شود که از مکانیسم‌های اصلی مقاومت در برابر انجماد است و افزایش کربوهیدرات‌های محلول بیانگر نقش تنظیم اسمزی در ایجاد مقاومت در این گیاهان برای مواجهه با دماهای انجماد است. افزایش شدید محتوای هیدروژن پراکسید در دو گیاه نشان دهنده تنش اکسیداتیو تحت شرایط دمایی زیر صفر است و پاسخ سیستم-آنتی‌اکسیدان آنزیمی در این گیاهان شامل افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز در بنفشه و کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گل میمونی در دمای ۱۱- درجه سانتی‌گراد است که نشان‌دهنده سازوکار متفاوت این دو گیاه زینتی در مقابل تنش یخبندان است.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور استان اصفهان به دلیل حمایت مالی از این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

عدم تعارض منافع

نویسندگان در انتشار این مقاله علمی پژوهشی از هرگونه سرقت ادبی و جعل نداشته و انتشار این مقاله برای نویسندگان فاقد منفعت مالی و تجاری است. این مقاله قبلاً در مجله دیگر منتشر نشده و تا مشخص شدن نظر نهایی داوران و مدیر مجله به جای دیگری ارسال نخواهد شد.

منابع

Abou-Shanab, R., J. Angle, T. Delorme, R. Chaney, P. Van Berkum, H. Moawad, Ghanem, K. and Ghazlan, H. (2003) Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. New Phytologist 158: 219-224.

- Aebi, H. (1983) Catalase. Methods of enzymatic analysis.
- Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.
- Arslan, Ö., Eyidoğan, F. and Ekmekci, Y. (2018) Freezing tolerance of chickpea: biochemical and molecular changes at vegetative stage. Biologia Plantarum 62: 140-148.
- Asada, K. (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. Photoinhibition 227-287.
- Bistgani, Z.E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F. and Morshedloo, M.R. (2019) Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. Industrial Crops and Products 135: 311-320.
- Chalker-Scott, L. and Fuchigami, L.H. (2018) The role of phenolic compounds in plant stress responses. In: Paul HL (ed) Low temperature stress physiology in crops. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp 27-40.
- Couée, I., C. Sulmon, Gouesbet, G. and El Amrani, A. (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 57: 449-459.
- Deljou, A., Hosseini-Vasoukolaei, M., Goudarzi, S., Falahatian, S., Mirzaie-Asl, A., Hosseini-Vasoukolaei, N. and Shad, M.A.A. (2016) Differential gene expression in response to cold stress in *Viola wittrockiana*. BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology 97: 87-94.
- Ding, Y., Shi, Y. and Yang, S. (2019) Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. New Phytologist 222: 1690-1704.
- Georgieva, K., Mihailova, G., Gigova, L., Dagnon, S., Simova-Stoilova, L. and Velitchkova, M. (2021) The role of antioxidant defense in freezing tolerance of resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. Physiology and Molecular Biology of Plants 27: 1119-1133.
- Guy, C., Kaplan, F., Kopka, J., Selbig, J. and Hinch, D.K. (2008) Metabolomics of temperature stress. Physiologia Plantarum 132: 220-235.
- Hajhashemi, S., Brestic, M., Landi, M. and Skalicky, M. (2020) Resistance of *Fritillaria imperialis* to freezing stress through gene expression, osmotic adjustment and antioxidants. Scientific Reports, 10: 1-13.
- Hereme, R., Galleguillos, C., Morales-Navarro, S. and Molina-Montenegro, M.A. (2021) What if the cold days return? Epigenetic mechanisms in plants to cold tolerance. Planta 254: 1-11.
- Janda, T., Szalai, G., Leskő, K., Yordanova, R., Apostol, S. and Popova, L.P. (2007) Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. Phytochemistry 68: 1674-1682.
- Kalisz, A., Jezdinsky, A., Pokluda, R., Sękara, A., Grabowska, A. and Gil, J. (2016) Impacts of chilling on photosynthesis and chlorophyll pigment content in juvenile basil cultivars. Horticulture, Environment, and Biotechnology 57(4):330-309.
- Karimzadeh Soureshjani, H., Nezami, A., Nabati, J., Oskoueian, E. and Ahmadi-Lahijani, M.J. (2022) The Physiological, Biochemical, and Molecular Modifications of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seedlings Under Freezing Stress. Journal of Plant Growth Regulation 41(3):1109-1124.
- Kaur, S., Gupta, A. K., Kaur, N., Sandhu, J. S. and Gupta, S. K. (2009). Antioxidative enzymes and sucrose synthase contribute to cold stress tolerance in chickpea. Journal of Agronomy and Crop Science, 195(5): 393-397.
- Lee, J., Koo, N. and Min, D. B. (2004) Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 3: 21-33.
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B.B. and Niyogi, K.K. (2009) Sensing and responding to excess light. Annual Review of Plant Biology 60: 239-260.
- Nezami, A., Keykha, A.F., Mousavi, M.J., Izadi, E., Nezami, S., Yousef, S. M. (2011) Effect of freezing stress on viola (*Viola gracilis* L.) under laboratory conditions. Journal of Agroecology 3(4): 430-438. (In Persian).
- Nievol, C.C., Carvalho, C.P., Carvalho, V. and Rodrigues, E. (2017) Rapid responses of plants to temperature changes. Temperature 4: 371-405.
- Noto, G. and Romano, D. (1988) Timing of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) in cold greenhouse cultivation. Acta Horticulturae 246: 175-182.
- Oraee, A., Tehranifar, A., Nezami, A., Shoor, M. (2019) Evaluation of biochemical and morphophysiological responses of *Viola*× *wittrockiana* to drought and cold stress. Journal of Plant Process and Function 8 (32): 103-120.
- Orvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F. and Dhindsa, R.S. (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. The Plant Journal 23:785-794.
- Pearce, R. S. (2001) Plant freezing and damage. Annals of Botany 87: 417-424.
- Pfeiffer, T., Štolfa, I., Žanić, M., Pavičić, N., Cesar, V. and Lepeduš, H. (2013) Oxidative stress in leaves of two olive cultivars under freezing conditions. Acta Biologica Hungarica 64: 341-351.
- Plewa, M. J., Smith, S. R. and Wagner, E. D. (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 247: 57-64.

- Pouramir-Dashtman, F., Khajeh-Hosseini, M. and Esfahani, M. (2014) Alleviating harmful effects of chilling stress on rice seedling via application of spermidine as seed priming factor. *African Journal of Agricultural Research* 9: 1412-1418.
- Quan, L.J., Zhang, B., Shi, W.W. and Li, H.Y. (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 2-18.
- Rajput, V.D., Singh, R.K., Verma, K.K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F.R., Meena, M., Gour, V.S., Minkina, T., Sushkova, S. and Mandzhieva, S. (2021) Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology* 10: 267.
- Rashed Mohassel, M.H., Nezami, A., Bagheri, A., Hajmohammadnia, K. and Bannayan, M. (2009) Evaluation of freezing tolerance of two fennel (*Foeniculum vulgare* L.) ecotypes under controlled conditions. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 15: 131-140.
- Rehman, M. and Tanti, B. (2021) Screening of boro rice varieties of Assam, India to estimate their potential resistance to cold and heat stresses. *Vegetos* 34: 540-554.
- Ritonga, F. N. and Chen, S. (2020) Physiological and molecular mechanism involved in cold stress tolerance in plants. *Plants* 9: 560.
- Ruelland, E., M.-N. Vaultier, A. Zachowski, and Hurry, V. (2009) Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research* 49: 35-150.
- Saleem, M., Fariduddin, Q. and T, Janda. (2021) Multifaceted role of salicylic acid in combating cold stress in plants: a review. *Journal of Plant Growth Regulation* 40: 464-485.
- Salehi-Eskandari, B., Nasirian Jazi, Z., Abbaspour, J. and Daneshmand, F. (2022) Some growth and biochemical changes of viola (*Viola × wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*) ornamental plants to freezing stress. *Journal of Plant Process and Function* 11 (48): 249-262 (In Persian)
- Sanghera, G.S., Wani, S.H., Hussain, W. and Singh, N.B. (2011) Engineering cold stress tolerance in crop plants. *Current Genomics* 12: 30.
- Sergieiev, I., Alexieva, V. and Karanov, E. (1997) Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences* 51(3): 121-124.
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M. and Zheng, B. (2019) Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* 24: 2452.
- Shen, Z.J., Qin, Y.Y., Luo, M.R., Li, Z., Ma, D.N., Wang, W.H. and Zheng, H.L. (2021) Proteome analysis reveals a systematic response of cold-acclimated seedlings of an exotic mangrove plant *Sonneratia apetala* to chilling stress. *Journal of Proteomics* 248: 104349.
- Siddiqui, K. S. and Cavicchioli, R. (2006) Cold-adapted enzymes. *Annual review of biochemistry* 75: 403-433.
- Siminovitch, D. (1981) Common and disparate elements in the processes of adaptation of herbaceous and woody plants to freezing-a perspective. *Cryobiology* 18: 166-185.
- Solecka, D. (1997) Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum* 19(3): 257-268.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M. and Vitti, A. (2015) Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 13561-13578.
- Tajvar, Y., Ghazvini, R.F., Hamidoghli, Y. and Sajedi, R.H. (2011) Antioxidant changes of Thomson navel orange (*Citrus sinensis*) on three rootstocks under low temperature stress. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 52: 576-580.
- Thomashow, M. F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 50: 571-599.
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4113-4117.
- Walworth, A. E., Song, G.q. and Warner, R. M. (2014) Ectopic AtCBF3 expression improves freezing tolerance and promotes compact growth habit in petunia. *Molecular Breeding* 33: 731-741.
- Yadav, S. K. (2010) Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30: 515-527.
- Yu, P., Jiang, N., Fu, W., Zheng, G., Li, G., Feng, B., Chen, T., Ma, J., Li, H., Tao, L. and Fu, G. (2020) ATP hydrolysis determines cold tolerance by regulating available energy for glutathione synthesis in rice seedling plants. *Rice* 13: 1-16.
- Zhang, Y.P., Xu, S., Yang, S.J. and Chen, Y.Y. (2017) Melatonin alleviates cold-induced oxidative damage by regulation of ascorbate-glutathione and proline metabolism in melon seedlings (*Cucumis melo* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 92: 313-324.
- Zhao, C., Lang, Z. and Zhu, J.K. (2015) Cold responsive gene transcription becomes more complex. *Trends in Plant Science* 20: 466-468

Effect of freezing stress on some physiological and enzymatic responses of ornamental plants, viola (*Viola × wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*)

Behrooz Salehi-Eskandari ^{1*}, Zohre Nasirian Jazi², Jalil Abbaspour³

Received: 2022.08.19

Accepted: 2023.02.12

Abstract

Introduction: Freezing is one of the abiotic stresses that has harmful effects on plant growth and productivity. This study was performed to investigate some physiological and biochemical responses of two ornamental and cold-resistant plants, including the viola (*Viola × wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*) under freezing stress. **Materials and methods:** To apply different temperature treatments on 70-days-old plants, the minimum temperature in January was used in three different places, including the greenhouse, the city of Isfahan and Fereydunshahr (temperatures of 20, 3- and -11 °C, respectively) for 15 days. **Results:** Changes in the chlorophyll a/b ratio were differences in the two plants with increasing freezing stress, but shoot length gradually decreased and at the lowest temperature in viola and snapdragon plants were 63 and 50% of their controls (20 °C), respectively. The content of phenolic compounds, soluble carbohydrates and hydrogen peroxide also increased. In addition, a significant increase in catalase activity was observed in both plants under freezing temperatures, while the increase in ascorbate peroxidase activity was significant only in snapdragon at -11 °C. However, no significant change in the activity of guaiacol peroxidase was found in two plants under freezing temperatures. **Discussion:** Therefore, it seems that snapdragon and violet plants can withstand freezing stress by using osmotic regulation mechanisms as well as different abilities of antioxidant enzymes, which indicate different resistance strategies depending on their genotype.

Keywords: Cold stress, ornamental plants, osmoticum, photosynthesis pigments

Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

2. Graduated from MSc in biochemistry, Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

Graduated from PhD in Plant Physiology, University of Isfahan

E-mail of corresponding author*: Behsalehi@pnu.ac.ir



بررسی اثرات افزودن هم‌زمان آل‌فا توکوفرول (ویتامین E) و کربن نانوتیوب‌های چند دیواره عامل دار (MWCNT) بر خواص مکانیکی و زیست سازگاری ماتریس پلیمری پلی اتیلن با وزن مولکولی بسیار بالا (UHMWPE) با هدف کاربرد در تعویض مفاصل

محسن فکوری^۱، محمد تقی خراسانی^{۲*}، مهدی کمالی دولت‌آبادی^۴

چکیده

مقدمه: پلی اتیلن با وزن مولکولی فوق‌العاده بالا (UHMWPE) به علت خواص فیزیکی و شیمیایی فوق‌العاده، طی سه دهه‌ی اخیر به‌عنوان ماده انتخابی در پروتزهای تعویض مفاصل استفاده شده است. با این وجود، سایش و اکسیداسیون این پلیمر در درازمدت منجر به استئولیز (تخریب استخوان) و محدود کردن طول عمر این پروتز می‌شود. یکی از روش‌های موثر جهت جلوگیری از اکسیداسیون، استفاده از α -توکوفرول در ماتریس UHMWPE است. اما حضور این افزودنی به تنهایی باعث بهبود عملکرد مکانیکی UHMWPE نمی‌شود. از طرف دیگر استفاده از نانوتیوب‌های کربنی چند دیواره (MWCNTs) به دلیل خواص استثنایی مانند مدول الاستیک و نسبت سطح به حجم بالا، نشان داده شده است که می‌توانند موجب بهبود خواص مکانیکی شوند. با این وجود پیدا کردن مقادیر بهینه استفاده از MWCNTs و ویتامین E به صورت هم‌زمان جهت بهبود خواص مکانیکی این پلیمر بسیار حیاتی و مهم است. **روش‌ها:** در این پژوهش جهت بررسی و مقایسه تأثیر نانوتیوب‌های کربنی بر خواص کامپوزیت UHMWPE حاوی ویتامین E، دو کامپوزیت، یکی حاوی ۰٫۲ درصد وزنی ویتامین E و دیگری حاوی ۰٫۲۵ درصد وزنی ویتامین E به همراه ۰٫۵ درصد وزنی MWCNT تولید شدند. **نتایج و بحث:** طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (FTIR) افزایش پیک‌های مشخصه‌ی کامپوزیت PE-E/CNT را نسبت به کامپوزیت PE-E گزارش داد. گرماسنجی روبشی تفاضلی (DSC) افزایش حدود ۷ درصدی بلورینگی را در کامپوزیت PE-E/CNT گزارش داد. آنالیز حرارتی مکانیکی (DMTA) نیز بهبود خواص الاستیک را در کامپوزیت PE-E/CNT نسبت به کامپوزیت حاوی ویتامین E نشان داد. نتایج آزمون بررسی سمیت (MTT assay) زیست سازگاری کامل کامپوزیت‌های تولید شده را نشان داد. نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده‌ی بهبود خواص مکانیکی و زیست سازگاری کامل بستر پلیمری در حضور هم‌زمان ویتامین E و کربن نانوتیوب بود.

واژه‌های کلیدی: کامپوزیت UHMWPE/Vitamin E، کامپوزیت UHMWPE/Vitamin E/MWCNT، مفاصل مصنوعی

^۱ دانشجوی دکتری، گروه بیومتریال، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، مشکین‌دشت، کرج، ایران

^۲ گروه مهندسی پزشکی (بیومتریال)، دانشکده فنی مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ دانشیار، گروه پلیمرهای زیست‌سازگار و پلیمرهای طبیعی، پژوهشکده علوم پلیمر، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول: m.khorasani@gmail.com)

^۴ استادیار، گروه مهندسی نساجی، دانشکده فنی مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* این مقاله مستخرج از پایان‌نامه ارشد با عنوان "بررسی تأثیر اختلاط ویتامین E و نانوتیوب‌های کربنی چند دیواره (MWCNTs) بر خواص مکانیکی و زیست سازگاری کامپوزیت زمینه پلی اتیلن با وزن مولکولی بسیار بالا (UHMWPE)" مصوب دانشکده فنی مهندسی دانشگاه علوم و تحقیقات است. اساتید راهنما به ترتیب: دکتر محمد تقی خراسانی، دکتر مهدی کمالی دولت‌آبادی

مقدمه

پلی اتیلن با وزن مولکولی فوق‌العاده بالا (UHMWPE) به دلیل عملکرد موفقیت‌آمیزی که طی سه دهه‌ی اخیر به‌عنوان ماده انتخابی جهت استفاده به‌عنوان جزء مفصلی داشته کاملاً شناخته شده است (Davidson *et al.*, 1988). با این حال سایش اجزای این پلیمر به‌عنوان یک مشکل بزرگ در نظر گرفته می‌شود که منجر به استئولیز (تخریب استخوان) و محدود کردن طول عمر این پروتز می‌شود (Paladugu & P.S., 2022). نشان داده شده است که اکسیداسیون در UHMWPE موجب افزایش نرخ سایش این پلیمر و ایجاد مقدار زیادی محصول ناشی از سایش در اطراف پروتز می‌شود (Aliyu *et al.*, 2021). ایجاد پیوند عرضی از طریق پرتو گاما با موفقیت ثابت شده است که باعث بهبود چشمگیر مقاومت سایشی این پلیمر در مقایسه با نمونه‌ی بدون تشعشع آن می‌شود. ایجاد پیوند عرضی با تابش پرتو گاما، باعث افزایش چگالی پیوندهای عرضی در فاز آمورف پلیمر، کاهش تحرک زنجیره و در نتیجه کاهش تغییر شکل پلاستیک می‌شود (Wen *et al.*, 2022). با این حال، به دلیل شکسته شدن پیوندهای C-H و C-C پلی اتیلن در طول فرآیند تابش پرتو، رادیکال‌های آزاد ناخواسته، تولید می‌شوند. در فاز آمورف پلیمر، این رادیکال‌های آزاد با یکدیگر پیوند می‌خورند و پیوندهای عرضی جدید ایجاد می‌کنند، اما در فاز کریستالی، رادیکال‌های آزاد تولید شده به دام می‌افتند و منجر به تخریب اکسیداسیون بلند مدت در UHMWPE می‌شوند. بنابراین، نیاز اساسی جهت بهبود مقاومت به اکسیداسیون و خواص مکانیکی UHMWPE در کاربردهای مفصلی وجود دارد. در حال حاضر بعد از ایجاد پیوند عرضی توسط اشعه‌ی گاما در UHMWPE، ذوب به عنوان یک روش عملیات حرارتی جهت کاهش میزان رادیکال آزاد انجام می‌شود. با این حال، عملیات ذوب منجر به کاهش بلورینگی UHMWPE می‌شود، که این موضوع بر خواص مکانیکی تأثیر منفی می‌گذارد و استحکام خستگی و چقرمگی شکست را کاهش می‌دهد (Muratoglu *et al.*, 2003). یکی از روش‌های موثر برای جلوگیری از اکسیداسیون، استفاده از ویتامین E (α -توکوفرول) در ماتریس UHMWPE است (Gaziano, 1994). ویتامین E یک چربی طبیعی است که دارای دو سر به نام‌های کرومن و فتیل است. سر (دم) کرومن وظیفه‌ی جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد و سر دیگر فتیل خاصیت چربی دوستی دارد (Dolezel & Adamirova, 1982). در واقع ویتامین E از طریق سر چربی دوست فتیل، می‌تواند با پلی اتیلن پیوند برقرار کند (Oral *et al.*, 2007). لذا در صورت استفاده به عنوان فیلر می‌تواند با رادیکال‌های آزاد موجود در UHMWPE واکنش نشان دهد؛ بنابراین ویتامین E از تخریب اکسیداسیون UHMWPE جلوگیری و مقاومت به اکسیداسیون آن را افزایش می‌دهد (Costa *et al.*, 1998). در بعضی از مطالعات انجام شده استفاده از آلفا توکوفرول به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در آزمون‌های سمیت سلولی، تکثیر، فعالیت‌های میتوکندری و سلامت غشای سلول تأثیر مثبتی نداشته است (Kurtz & Kurtz, 2009). یکی از عیوب ویتامین E که با UHMWPE ترکیب می‌شود، مقدار غلظت بهینه‌ی آن جهت بهبود خواص اکسیداسیونی است، همچنین ویتامین E به تنهایی نمی‌تواند خواص مکانیکی UHMWPE را بهبود ببخشد (Oral *et al.*, 2008). با توجه به موارد ذکر شده هنوز محققان به ترکیب ایده آلی از ویتامین E نرسیده‌اند (Oral *et al.*, 2005). جهت

بهبود خواص مکانیکی، یکی از پرارجاع‌ترین فیلرها در پلیمرها نانوتیوب‌های کربنی چند دیواره (MWCNT) هستند. این فیلرها به دلیل خواص استثنایی مانند مدول الاستیک بالا، استحکام کششی، چقرمگی شکست، رسانایی الکتریکی و حرارتی استثنایی و نسبت سطح به حجم عالی موردتوجه هستند (Do Amaral Montanheiro *et al.*, 2015). اگرچه حجم زیادی از متون علمی در مورد اثر نانوتیوب‌های کربنی بر عملکرد مکانیکی کامپوزیت‌های UHMWPE منتشر شده است، اما تحقیقات بسیار محدودی در مورد تأثیر هم‌زمان استفاده از نانوتیوب کربنی همراه با ویتامین E بر خواص مکانیکی آن‌ها انجام شده است؛ به طور مثال، در پژوهش ملک و امامی (Melk & Emami, 2018) کامپوزیت‌هایی با غلظت‌های ۰٫۵، ۰٫۷، ۱ و ۲ درصد وزنی MWCNTs و ۱۰۰۰ ppm ویتامین E تولید و خواص حرارتی و مکانیکی آن‌ها بررسی شد و نشان داده شد اضافه کردن نانو تیوب‌های کربنی تغییری در خواص مکانیکی کامپوزیت‌ها ایجاد نکرده است که احتمالاً این موضوع می‌تواند به دلیل غلظت بالای استفاده از نانو ذرات کربنی باشد چرا که، نانو ذرات کربنی انرژی سطحی بسیار بالایی دارند و هر چه غلظت (مقدار) استفاده از آنها بیشتر شود احتمال آگلومره شدن (گلوله ای شدن) و در نتیجه کاهش خواص وجود دارد. لازم به ذکر است در پژوهش مذکور خواص مکانیکی بیشتر از بعد چقرمگی و اندازه‌گیری سختی میکرو ساختاری مورد بررسی قرار گرفته است و با توجه به اینکه پژوهش دیگری در این زمینه صورت نپذیرفته، نیاز است پژوهش‌های عمیق‌تری در زمینه‌ی بررسی خواص مکانیکی این کامپوزیت‌ها انجام پذیرد، مضافاً مطلوب است غلظت بهینه‌ای از نانو تیوب‌های کربنی که بتواند بر روی ویژگی‌هایی نظیر درصد کریستالی تأثیر مثبت بگذارد نیز مورد بررسی قرار گیرد. همچنین از سوی دیگر طبق بررسی‌های انجام شده توسط نویسندگان، تاکنون پژوهشی خواص زیست‌سازگاری این کامپوزیت‌های هیبرید را بررسی نکرده است، که با توجه به کاربرد این کامپوزیت‌ها در داخل بدن و سطوح مفصلی، بررسی رفتار زیستی این کامپوزیت‌ها امری مهم و حیاتی به شمار می‌رود.

هدف از این پژوهش بررسی اثرات افزودن ویتامین E به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان و کربن نانوتیوب‌های چند دیواره به‌عنوان فاز تقویت‌کننده، بر خواص مکانیکی مانند رفتار ویسکو الاستیک، مدول یانگ، اتلاف و تغییرات کریستالی و در نهایت بررسی زیست‌سازگاری آن‌ها جهت کاربردهای ارتوپدیک است. در این راستا جهت انجام مقایسه و بررسی تأثیرات افزودن نانوتیوب‌های کربنی، دو کامپوزیت، یکی حاوی نانو ذرات کربنی و ویتامین E به صورت هم‌زمان (UHMWPE/Vitamin E) و دیگری حاوی ویتامین E (E/MWCNT) تولید شد و نتایج زیستی و مکانیکی آن‌ها با یکدیگر مقایسه شد.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده

پودر UHMWPE-Gur 1020 که به‌عنوان پودر پلی‌اتیلن با درجه‌ی پزشکی در صنعت ارتوپدی استفاده می‌شود (Sobajima *et al.*, 2020) از شرکت Ticona GmbH (آلمان)، منطبق بر استاندارد (American Society for Testing and Materials, 2004) استفاده شد. دی - ال آلفا توکوفرول استات (ویتامین E) از شرکت Zheijiang Medicine Co.,Ltd با خلوص بالای ۹۹/۹۹ درصد و مقدار فلزات سنگین کمتر از ۰/۰۰۱ درصد است تهیه شد. در بررسی چشمی این ماده، ویسکوز، شفاف، کهربایی رنگ، روغنی و مایع بود. نانوتیوب‌های کربنی چند دیواره عامل دار شده با گروه‌های کربوکسیل (MWCNT-COOH) تولید شده به روش رسوب‌دهی شیمیایی بخار (Chemical vapour deposition) از شرکت Neutrino (چین) مورد استفاده قرار گرفت. این ماده دارای خلوص بالای ۹۵ درصد، قطر بیرونی کمتر از ۸ نانومتر و طول ۱۰ الی ۳۰ نانومتر بود. همچنین حلال مورد استفاده اتانول خالص (۹۹/۹۹ درصد) تولید شرکت امرتات شیمی (ایران) بود.

روش تهیه‌ی نانوکامپوزیت

جهت تولید نمونه‌ها ابتدا مقدار مشخص از پودر نانوتیوب کربنی چند دیواره (مطابق با جدول ۱) را از طریق ترازوی آزمایشگاهی بادقت بالا وزن کرده و با ۵۰ میلی‌لیتر حلال آلی (اتانول خالص ۹۹/۹۹ درصد) اختلاط کرده و در ادامه برای به‌دست‌آوردن ترکیب همگن و یکنواخت از نانوتیوب‌های کربنی، محلول به مدت ۱۵ دقیقه با فرکانس ۴۵ مگا هرتز التراسونیک شد (Melk & Emami, 2018). در مرحله‌ی بعد به مایع التراسونیک شده، مقدار مشخص از ویتامین E/ نانوتیوب کربنی چند دیواره (مطابق جدول ۱) اضافه شد و محلول به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰ rpm توسط همزن مغناطیسی هم زده شد. در انتها محلول به دست آمده همراه با ۳۰ گرم پودر UHMWPE خالص و ۱۰۸ گرم گلوله‌های زیرکونیایی با قطر ۵ میلی‌لیتر به نحوی که ثلث حجم ظرف آسیاب سیاره‌ای (حجم کل ظرف ۲۵۰ میلی‌لیتر) خالی باشد، درون ظرف آسیاب ریخته شد تا از این طریق محلول فوق‌الذکر به صورت یکنواخت درون حجم ذرات پلیمر نفوذ کرده و یک پودر یکنواخت ایجاد شود. در این تحقیق از آسیاب گلوله‌ای سیاره‌ای مدل AS2-600 شرکت بنیان فراگیر صنعت مهربین استفاده شد. طبق تحقیقات صورت گرفته برای نیل به این مقصود می‌بایست پارامترهای دستگاه مانند مدت زمان آسیاب (۲ ساعت) و سرعت آسیاب (۴۰۰ rpm) به درستی انتخاب شود (Enqvist, 2013). در ادامه دوغاب به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت با دمای 60°C جهت تبخیر حلال اضافه در اون (Oven) قرار گرفت. در نهایت، پودر به‌دست‌آمده با استفاده از دستگاه قالب‌گیری فشاری در دمای 190°C و تحت فشار ۵ مگاپاسکال به مدت ۳۰ دقیقه قالب‌گیری و پرس شد (Fonseca *et al.*, 2011). بر اساس گزارش Fonseca و

همکاران (Fonseca *et al.*, 2011) در مرحله‌ی اولیه، بدون اعمال فشار به پودر درون قالب تا 190°C حرارت داده شد. در مرحله‌ی بعد، به نمونه‌ی شکل گرفته، ۱۵ مگاپاسکال نیرو وارد شد و سپس نیرو برداشته شد (۰ مگاپاسکال)، این کار پنج مرتبه و هر بار به مدت ۹۰ ثانیه تکرار شد. در این حین دما تا 190°C حفظ شد. در طول آخرین چرخه، فشار اعمال شده در ۱۵ مگاپاسکال به مدت ۳۰ دقیقه در 190°C حفظ شد. سپس نمونه‌ها با چرخاندن آب به داخل قالب تا دمای اتاق خنک شدند. در این تحقیق نمونه‌ها به صورت قرص‌های دایره‌ای شکل با قطر حدود ۷ سانتی‌متر و ضخامت ۲ میلی‌متر تولید شدند.

استریلیزاسیون و کشت سلولی

نمونه‌های تولید شده قبل از انجام بررسی‌های زیست‌سازگاری، نیاز به فرایند استریلیزاسیون دارند؛ لذا نمونه‌ها تحت اشعه‌ی گاما با دوز 25kGy توسط سازمان انرژی اتمی قرار گرفتند.

در این پروژه برای بررسی عدم سمیت سلولی از روش کشت MTT Assay توسط سلول‌های فیبروبلاست MG-63 (NCBI C555) تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران استفاده شد. پس از دی‌فریز کردن سلول‌ها، آن‌ها را به فلاسک حاوی محیط کشت RPMI شامل FBS ۱۰ درصد منتقل کرده و سپس فلاسک را در انکوباتور در دمای 37°C ، رطوبت ۹۰ درصد و غلظت اکسیژن ۵ درصد قرار داده شدند (محیط کشت هر ۳ الی ۴ روز تعویض گردید).

به‌منظور بررسی سمیت نمونه‌ها و تأثیر آن‌ها بر رشد و تکثیر سلول‌ها، فرایند عصاره‌گیری بر اساس استاندارد ایزو ۵-۱۰۹۹۳ انجام شد که طی آن به هر نمونه استریل به‌ازای هر ۳ سانتی‌متر مربع سطح، مقدار یک میلی‌لیتر محیط کشت افزوده گردید. سپس بعد از گذشت ۳ روز محیط کشت خارج و به سلول‌ها افزوده شد. مقدار مشخصی محیط کشت (RPMI) نیز به‌عنوان شاهد (کنترل مثبت) در نظر گرفته شد (Standard, 2009).

به‌طور خلاصه، 1×10^4 سلول همراه با 100 میکرولیتر محیط کشت درون هر یک از چاهک‌های پلیت کشت سلولی ریخته شد، سپس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از آن، محیط کشت خارج شد و 90 میکرولیتر از عصاره‌ی هر نمونه همراه با 10 میکرولیتر FBS به هر چاهک کشت اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در انکوباتور و در معرض عصاره قرار گرفتند. سپس عصاره‌ها برداشته شد و 100 میکرولیتر MTT با غلظت 0.5 mg/ml (سیگما) به هر چاهک اضافه شد.

پس از ۴ ساعت محلول خارج شد و ایزوپروپانول (سیگما) برای حل کردن بلورهای بنفش به هر چاهک اضافه شد. در نهایت غلظت محلول در ایزوپروپانول توسط الایزا ریدر (Elisa (STAT FAX 2100, USA) در طول موج 570 نانومتر اندازه‌گیری شد.

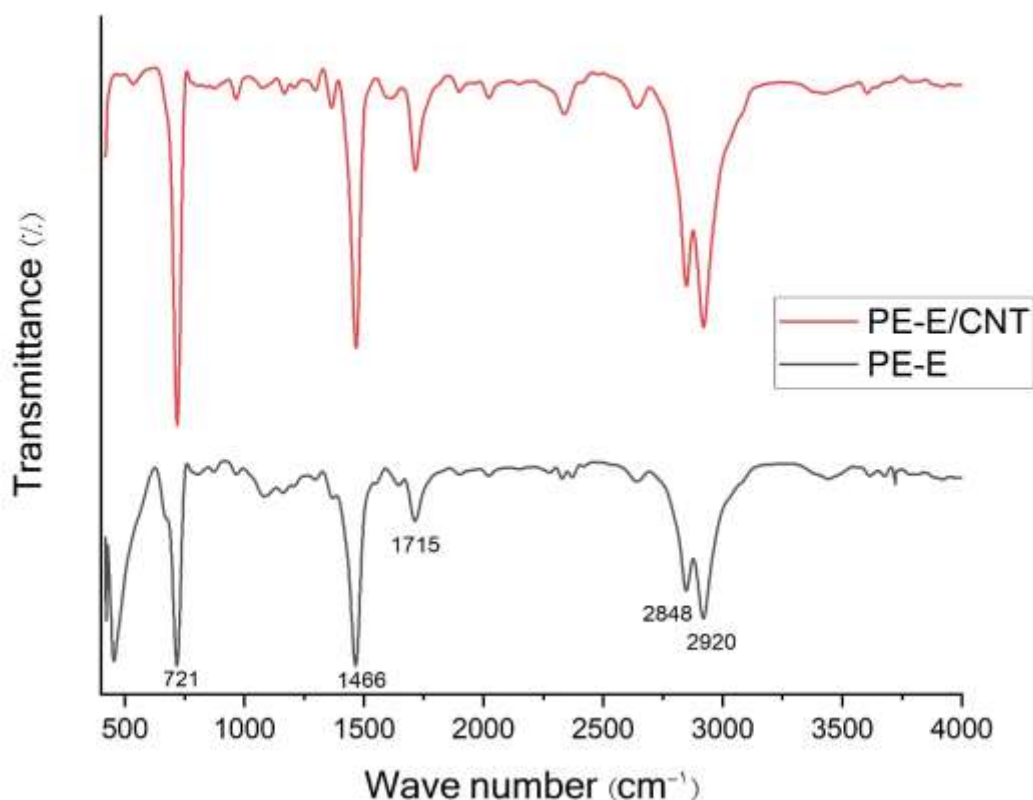
جدول ۱- مشخصات کامپوزیت‌های تولید شده
Table 1. Specifications of produced composites

Composition	Sample Name	Abbreviation
0.2% by weight alpha-tocopherol (2000 ppm) + 99.8% by weight UHMWPE powder	UHMWPE/Vitamin E composite	PE-E
0.5 % by weight MWCNT and 0.25% by weight (ppm 2500) vitamin E + 99.8% by weight UHMWPE powder	UHMWPE/Vitamin E/ MWCNT composite	PE-E/CNT

نتایج و بحث

تفسیر آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)

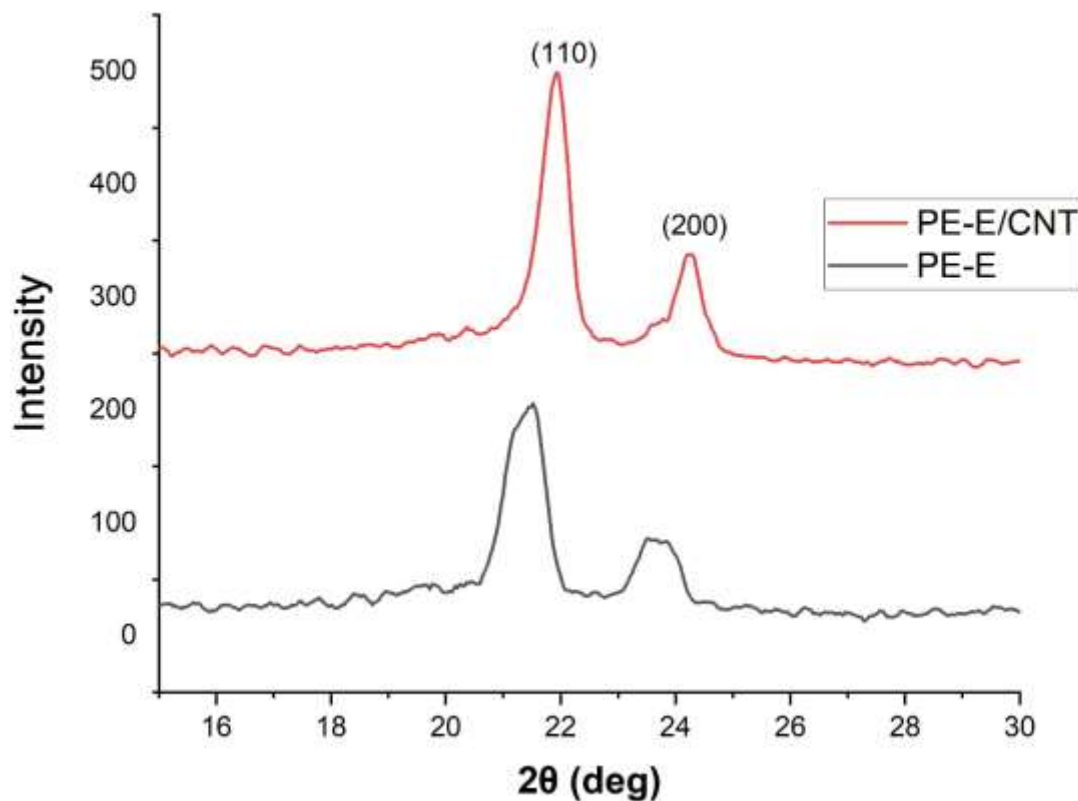
جهت بررسی نوع و قدرت پیوندهای شیمیایی نمونه‌های تولید شده، از دستگاه FTIR مدل DMA 80- direct mercury analyzer (ایتالیا) در طول موج $4000-400\text{ cm}^{-1}$ با دقت 2 cm^{-1} استفاده شد. لازم به ذکر است تمام طیف‌ها در حالت عبوری گرفته شد. باتوجه به شکل ۱ از پیک‌های شاخص که در هر دو کامپوزیت قابل مشاهده است، از چپ به راست می‌توان به پیک‌های 720 cm^{-1} مربوط به پیوند C-H خمشی (ارتعاش لرزان)، پیک 1466 cm^{-1} مربوط به ارتعاش خمشی پیوند C-H، پیک 1715 cm^{-1} مربوط به پیوند قوی C=O خمشی و پیک‌های 2848 cm^{-1} و 2920 cm^{-1} به ترتیب مربوط ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن پیوند C-H اشاره نمود. شدت پیک 720 cm^{-1} نمایانگر زنجیره‌ی عریض و درجه‌ی پلیمریزاسیون ماتریس UHMWPE است (Pang et al., 2015). شدت تمامی پیک‌ها (قدرت پیوندها) در کامپوزیت PE-E/CNT که شامل حضور هم‌زمان ویتامین E و نانوتیوب‌های کربنی است، نسبت به کامپوزیت حاوی ویتامین E (PE-E) افزایش محسوسی پیدا کرده است.



شکل ۱- طیف FTIR کامپوزیت PE-E/CNT و PE-E
Figure 1. FTIR spectrum of PE-E/CNT and PE-E composites

تفسیر آزمون پراش اشعه X (XRD)

آزمون XRD توسط دستگاه with Seifert 3003 pts (آلمان) با استفاده از آند مس و $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=1.542 \text{ \AA}$) به‌منظور بررسی فاز و تغییرات شدت پیک‌ها جهت انجام مقایسه بین نمونه‌های تولید شده و میزان بلورینگی انجام شد. UHMWPE یک پلیمر نیمه کریستالی است که از دوفاز اصلی آمورف و کریستالی تشکیل شده است. فاز کریستالی شامل دو پیک شارپ (110) در $2\theta=21.5^\circ$ و (200) در $2\theta=24^\circ$ است (Khalil et al., 2019). (110) مربوط به فاز کریستالی پایدار ارترومبیک و (200) مربوط به فاز هگزاگونال است. با توجه به شکل ۲، در کامپوزیت حاوی نانوتیوب‌های کربنی PE-E/CNT، پیک‌های کریستالی ماتریس UHMWPE نسبت به کامپوزیت PE-E افزایش شدت قابل توجهی داشتند که این موضوع نشان از افزایش میزان بلورینگی کامپوزیت PE-E/CNT نسبت به PE-E دارد.



شکل ۲- منحنی XRD کامپوزیت‌های تولید شده
Figure 2. X-ray diffraction curve of produced composites

تفسیر آزمون گرماسنجی روبشی تفاضلی (DSC)

آزمون DSC توسط دستگاه Setaram Instrumentation (فرانسه) در بازه‌ی دمایی 25°C تا 200°C با نرخ گرمایش $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ جهت بررسی دمای ذوب، آنتالپی و محاسبه‌ی درصد بلورینگی نمونه‌ها (از طریق معادله ۱) انجام پذیرفت (Andjelić & Richard, 2001):

$$X_c = \frac{\Delta H}{\Delta H_{100}} \times 100$$

معادله ۱- محاسبه‌ی درصد بلورینگی (Andjelić & Richard, 2001)

Equation 1. Calculation of crystallinity percentage (Andjelić & Richard, 2001)

در معادله‌ی بالا ΔH آنتالپی پلیمر و ΔH_{100} آنتالپی ذوب UHMWPE ۱۰۰ درصد کریستالی است که طبق تحقیقات قبلی ۲۹۰ ژول بر گرم در نظر گرفته می‌شود (Andjelić & Richard, 2001). معمولاً بسیاری از خواص شیمیایی و مکانیکی (مانند مدول یانگ، تنش تسلیم، استحکام، خستگی و...) پلیمرها تحت تاثیر درصد بلورینگی است (Bourell et al., 2014).

درصد بلورینگی در پلیمرها را می‌توان با روش‌های مختلفی مانند روش گرماسنجی روبشی تفاضلی، پراش پرتو X و ... اندازه‌گیری نمود. عمدتاً به این دلیل که هر آزمون پارامترهای فیزیکی و ساختارهای مورفولوژیکی متفاوتی را اندازه‌گیری می‌کند، هر کدام نتایج متفاوتی گزارش می‌دهند (Zhu *et al.*, 2015). طبق جدول ۲ دمای ذوب برای کامپوزیت PE-E/CNT و PE-E به ترتیب ۱۳۵/۶ و ۱۳۴/۹ و درصد بلورینگی به ترتیب ۵۳/۱ و ۴۹/۸ درصد گزارش شده است. این نتایج نشان از افزایش ۷ درصدی بلورینگی در کامپوزیت PE-E/CNT نسبت به کامپوزیت ویتامین E دارد، اما دمای ذوب تغییر محسوسی را نشان نداد. این موضوع احتمالاً به واسطه ی غلظت بسیار کم نانوتیوب کربنی در ماتریس پلیمری است که نتوانسته است ویژگی هدایت گرمایی بالای ذاتی خود را نشان داده و موجب کاهش دمای ذوب کامپوزیت PE-E/CNT شود.

جدول ۲- نتایج آزمون DSC

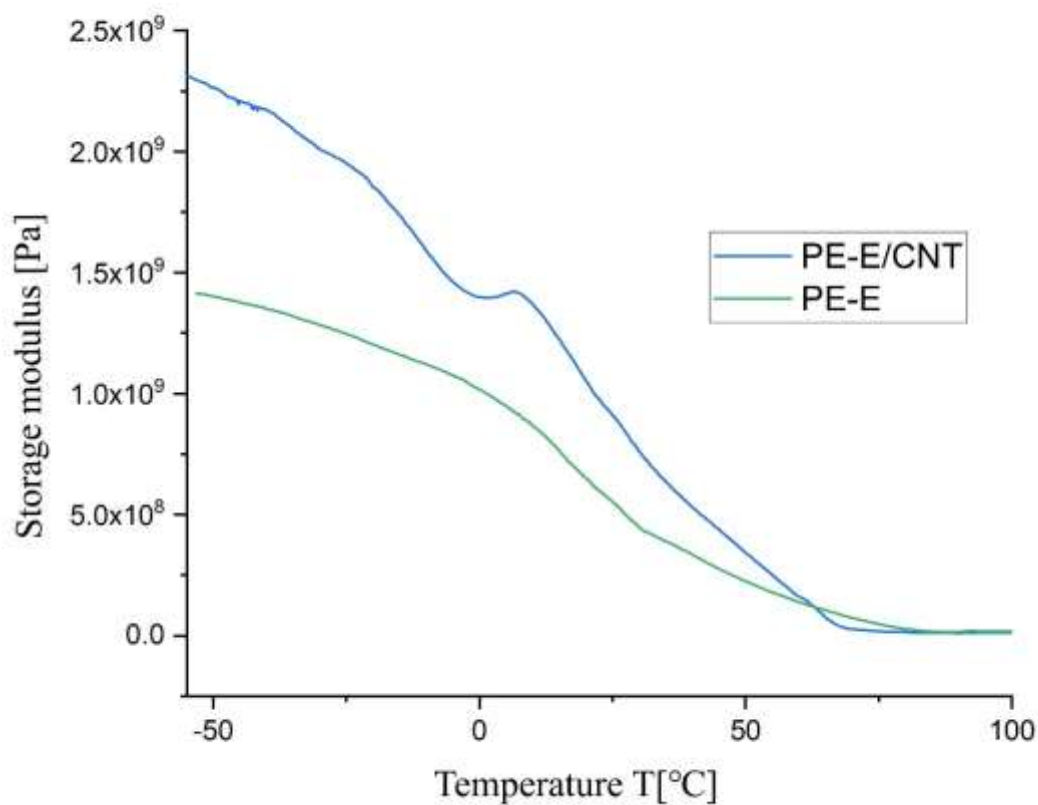
Table 2. Differential scanning calorimetry results

	Samples	
	PE-E/CNT	PE-E
Melting Enthalpy (J/g)	154.10	144.60
Xc (%)	53.13	49.86
Melting temperature °C	135.61	134.90

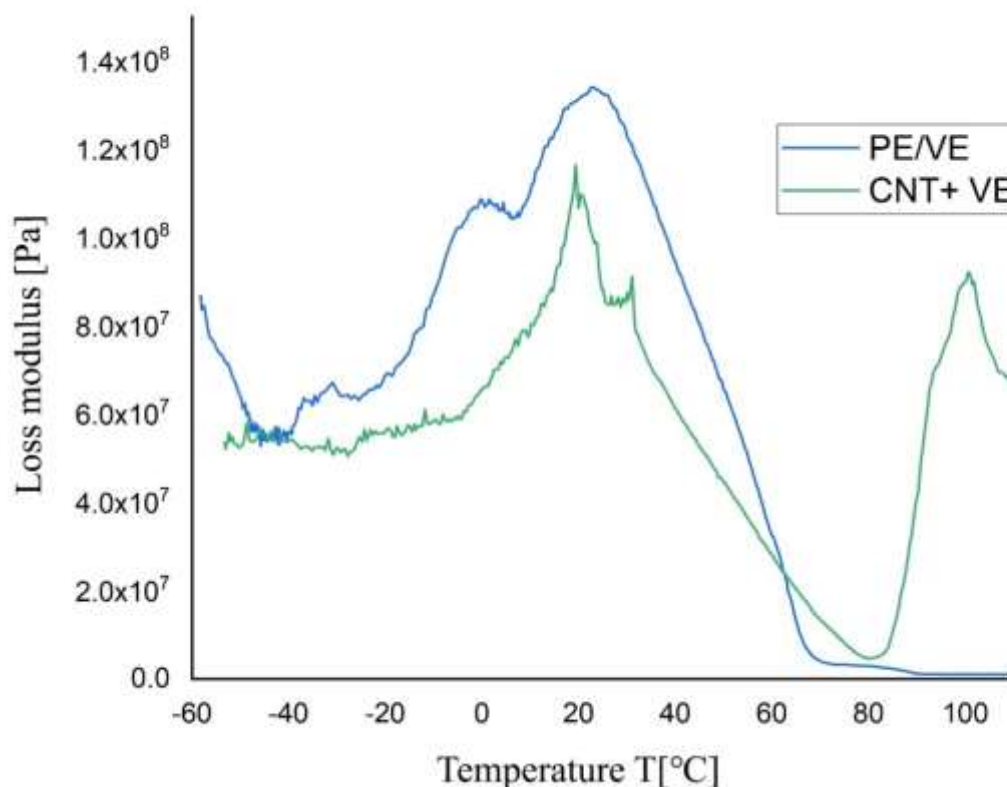
تفسیر آنالیز حرارتی مکانیکی دینامیکی (DMTA)

آزمون DMTA توسط دستگاه Triton Technology Ltd., TTDMA model (انگلیس)، جهت بررسی تغییرات در مدول ذخیره الاستیک (E')، مدول اتلاف (E'') و $\tan\delta$ (E'/E'') انجام پذیرفت. این تست در بازه‌ی دمایی 60°C الی 150°C و با نرخ گرمایش $3^\circ\text{C}/\text{min}$ جهت بررسی خواص ویسکوالاستیک نمونه‌ها انجام پذیرفت. آنالیز حرارتی مکانیکی دینامیکی جهت بررسی خواص ویسکوالاستیک و رئولوژیکی کامپوزیت‌های تولیدی انجام شد. تحلیل منحنی مدول ذخیره‌سازی و $\tan\delta$ در تعیین عملکرد نمونه‌های تحت تنش و دما بسیار مفید است. باتوجه‌به شکل ۳، روند منحنی مدول ذخیره‌ی کامپوزیت PE-E/CNT تقریباً در تمام بازه‌های دمایی نسبت به منحنی کامپوزیت PE-E، بالاتر قرار دارد که این موضوع نشان‌دهنده‌ی افزایش مدول ذخیره و سختی، در کامپوزیت PE-E/CNT نسبت به کامپوزیت حاوی ویتامین E است، در واقع می‌توان گفت که نانوتیوب کربنی نقش تقویت‌کنندگی خود را به‌خوبی در ماتریس پلیمری ایفا کرده است و سبب بهبود مدول الاستیک شده است. نتایج مدول اتلاف کامپوزیت‌های تولید شده در شکل ۴ نشان می‌دهد که تا دمای 60°C ، مدول اتلاف کامپوزیت PE-E بالاتر از

کامپوزیت PE-E/CNT است. در واقع این موضوع بیان‌گر این نکته است که در دمایی که به صورت عملی این کامپوزیت‌ها مورد استفاده‌ی پزشکی قرار می‌گیرند، میزان اتلاف و هدررفت انرژی (احتمال ایجاد تغییر شکل پلاستیک) در کامپوزیت حاوی نانوتیوب کربنی به شکل محسوسی کمتر از کامپوزیت ویتامین E است.



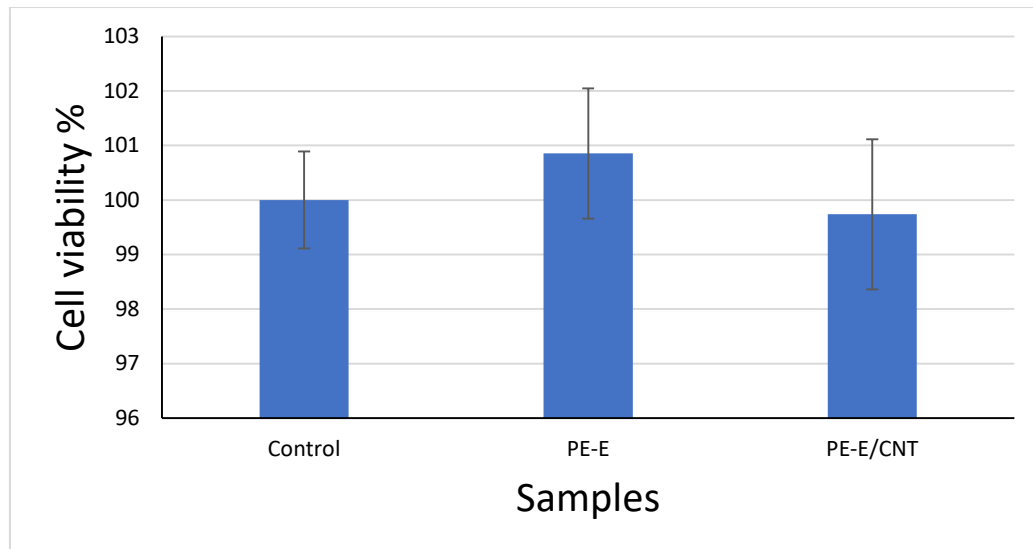
شکل ۳- منحنی مدول ذخیره‌ی الاستیک
Figure 3. Elastic storage modulus curve



شکل ۴- منحنی مربوط مدول اتلاف کامپوزیت‌های تولید شده
Figure 4. loss modulus curves of the produced composites

تفسیر آزمون کشت سلولی و بررسی سمیت (MTT assay)

در روش کشت سلولی، عملکرد زنده مانی سلول‌ها از طریق مقایسه آن‌ها با کنترل منفی بررسی می‌شود. کنترل منفی نمونه‌ای است که کاملاً با سلول‌ها سازگار است و با نمونه‌های اصلی کشت می‌شود (Khorasani *et al.*, 2005; Hassanein *et al.*, 2020). با توجه به شکل ۵، میزان زنده مانی سلول‌ها در کامپوزیت PE-E/CNT و PE-E به ترتیب ۱۰۰/۸ و ۹۹/۷ گزارش شده است، که با توجه به این نتایج، میزان زنده مانی سلول‌ها در کامپوزیت PE-E/CNT کمی بالاتر از نمونه ی کنترل (محیط کشت) گزارش شده است که این پدیده به دلیل خاصیت زیست فعالی بیشتر عصاره ی کامپوزیت مذکور، از نظر تکثیر سلولی و زنده مانی سلول‌ها نسبت به نمونه ی کنترل که صرفاً محیط کشت دست نخورده است، اتفاق افتاده است. با توجه به نتایج، هر دو کامپوزیت تولید شده زیست سازگاری کامل را از خود نشان داده‌اند و تفاوت محسوسی بین نتایج آن‌ها قابل مشاهده نیست که این نتایج نسبت به تحقیق Zavala و همکاران (Zavala *et al.*, 2021) افزایش حدود ۱۰ درصدی زنده مانی سلولی را در کامپوزیت حاوی نانو ذرات کربنی نشان می‌دهد.



شکل ۵- نمودار میزان زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست از طریق آزمون MTT (نوارهای خطا در سطح ۹۵ درصد ترسیم شده‌اند)

Figure 5. viability percentage of Fibroblast cells in MTT test

پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که ترکیب ویتامین E با پلیمر UHMWPE می‌تواند از اکسایش پلیمر در بلندمدت محافظت کند، اما از طرف دیگر استفاده از ویتامین E موجب کاهش مقاومت مکانیکی پلیمر می‌شود (Affatato *et al.*, 2012). در این راستا پژوهش‌های مختلفی جهت بهبود خواص مکانیکی پلیمر UHMWPE با اضافه کردن نانوتیوب‌های گرافن، الماس و ... انجام پذیرفته است (Pang *et al.*, 2017; Fathi *et al.*, 2017). از آن جایی که نانوتیوب‌های کربنی (CNT) در مقایسه با سایر مواد کربنی که در کامپوزیت‌های پلیمری استفاده می‌شوند، خواص مکانیکی منحصربه‌فرد، مانند سطح به حجم عالی، مدول یانگ بالا و ... دارند (Aguiar *et al.*, 2022; del Prado *et al.*, 2018)، در این پژوهش با هدف بهبود خواص مکانیکی پلیمر UHMWPE ترکیب شده با ویتامین E (جهت کاربردهای ارتوپدیک و جایگزینی مفاصل مصنوعی)، از نانوتیوب‌های کربنی چند دیواره به‌عنوان فاز تقویت‌کننده استفاده شد تا بتوان به صورت همزمان هم از خواص آنتی اکسیدانی ویتامین E جهت کاهش اکسیداسیون و هم از خواص منحصر به فرد نانو تیوب‌های کربنی چند دیواره جهت بهبود خواص مکانیکی بهره جست (Patil *et al.*, 2020). دو کامپوزیت یکی حاوی ویتامین E و دیگری حاوی ویتامین E و نانوتیوب‌های کربنی (به صورت هم‌زمان)، به روش اختلاط تر (Wet) و به وسیله قالب‌گیری فشاری (همراه با دما) تولید شدند و در ادامه مقایسه‌ای بین خواص مکانیکی و زیست سازگاری آن‌ها انجام شد. طیف‌های آزمون FTIR در هر دو کامپوزیت، پیک‌های مشخصه‌ی پلیمر UHMWPE را نشان داد. همچنین تمام پیک‌های مشخصه کامپوزیت PE-E/CNT، نسبت به کامپوزیت PE-E افزایش محسوسی را تجربه کردند. در واقع این نتایج موید، پخش همگون و موفق نانوتیوب کربنی درون ماتریس UHMWPE و افزایش قدرت پیوندی در کامپوزیت حاوی نانوتیوب کربنی نسبت به کامپوزیت E بود (Costa *et al.*, 2001). تحلیل و بررسی منحنی‌های آزمون XRD جزئیاتی را

در مورد بلورینگی، ترکیب فازی و ... در پلیمرهای نیمه کریستالی ارائه می‌دهد (Khalil *et al.*, 2019). الگوی XRD یک ماده کاملاً کریستالی مجموعه‌ای از قله‌های تیز است که هر یک بازتابی از یکی از سطوح مختلف کریستالوگرافی را نشان می‌دهد. طبق نتایج به‌دست‌آمده با توجه به افزایش شدت فازهای کریستالی UHMWPE (ارترومبیک و هگزاگونال) در کامپوزیت کربنی نسبت به کامپوزیت ویتامین E می‌توان انتظار عملکرد بهتر این کامپوزیت در محیط مفصلی داشت. نتایج مشابه آزمون XRD در آزمون گرماسنجی روبشی تفاضلی نیز مشاهده شد. نتایج DSC نشان از افزایش ۷ درصدی در بلورینگی کامپوزیت PE-E/CNT نسبت به کامپوزیت PE-E داشت که این موضوع موجب کاهش تحرک زنجیره و در نتیجه کاهش تغییر شکل پلاستیک در کامپوزیت می‌شود که این موضوع در پژوهش آن و همکاران (Eun *et al.*, 2022) که افزایش ۱۰ درصدی در آنتالپی کامپوزیت حاوی نانو تیوب کربنی را گزارش دادند، نیز مشاهده شد. از سویی دیگر این نتایج برخلاف تحقیق ملک و امامی (Melk & Emami, 2018) بهبود محسوس بلورینگی کامپوزیت‌های حاوی MWCNTs را نشان داد. زیرا در این پژوهش همانطور که در قسمت مقدمه اشاره شد، به دلیل انرژی سطحی بالای MWCNTs و احتمال آگلومره شدن آن، در این تحقیق سعی شد از غلظت‌های بهینه و به مراتب کم‌تری از نانو تیوب‌های کربنی استفاده شود. همچنین نشان داده شد که اضافه کردن نانو تیوب‌های کربنی بر دمای ذوب کامپوزیت اثر محسوسی نگذشته است. نتایج آزمون DMTA نیز نشان از کاهش مدول اتلاف یا همان خاصیت ویسکوز در کامپوزیت PE-E/CNT نسبت به کامپوزیت PE-E داشت. همچنین از طرف دیگر نیز مدول ذخیره‌ی (الاستیسیته) کامپوزیت PE-E/CNT نسبت به کامپوزیت PE-E، افزایش محسوسی را نشان داد، که در پژوهش ونگ و همکاران (Wang *et al.*, 2020) نیز افزودن نانو ذرات کربنی موجب افزایش چشم‌گیر مدول الاستیک در کامپوزیت زمینه UHMWPE شده است. از آن جایی که این پژوهش با هدف کاربرد ارتوپدیک و سطح مفصلی انجام شده است، انتظار این است که نمونه‌های تولیدی بتوانند به خوبی در مقابل نیروهای مکرر و سایشی محیط مفصلی تاب آورند که با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از طریق آنالیز DMTA می‌توان انتظار نیل به چنین مهمی را داشت. در نهایت از طریق آزمون کشت سلولی و بررسی سمیت سلولی میزان درصد زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست که در تماس با عصاره‌ی نمونه‌ها بودند بررسی شد و نتایج نشان از زیست‌سازگاری کامل نمونه‌های تولید شده داشت، که این موضوع در تحقیقات پیشین نیز مشاهده شده است (Amoli *et al.*, 2012; Singh & Verma, 2021). همچنین در تحقیقی که توسط آوکی و سایتو (Aoki & Saito, 2020) به صورت مجزا و تخصصی بر روی زیست‌سازگاری و سرطان‌زایی نانو تیوب‌های کربنی چند دیواره انجام شد، نشان داده شد این نانو تیوب‌ها کاملاً ایمن هستند و گواه علمی مبنی بر سمیت و سرطان‌زا بودن این نانو تیوب‌های کربنی وجود ندارد. البته لازم به ذکر است که برای اولین بار در این مقاله بررسی زیست‌سازگاری کامپوزیت‌های دو تایی حاوی MWCNTs و ویتامین E مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری کلی

توانایی جایگزینی مفاصل طبیعی بیمار یا آسیب‌دیده با پروتزهای مصنوعی به‌منظور کاهش درد و ناتوانی یکی از موفقیت‌های بزرگ در مهندسی و پزشکی در ۵۰ سال گذشته بوده است. اگرچه UHMWPE به مدت پنج دهه به‌عنوان محبوب‌ترین ماده مصنوعی جایگزین در کاربردهای بالینی مورد استفاده قرار گرفته است، تحقیقات مستمری برای بهبود عملکرد این ماده انجام شده است تا عمر مفید آن بیش‌تر شود. این پژوهش با رویکرد بهبود خواص مکانیکی و بررسی زیست سازگاری جزء پلیمری پروتزهای تعویض مفاصل با استفاده از ویتامین E به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی و نانوتیوب‌های کربنی چند دیواره به‌عنوان فاز تقویت‌کننده انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های مختلف نشان‌دهنده‌ی بهبود خواص مکانیکی بستر پلیمری در حضور هم‌زمان ویتامین E و کربن نانوتیوب بود و همچنین نشان داده شد که این کامپوزیت‌ها از نظر سمیت سلولی، کاملاً زیست‌سازگار هستند.

عدم تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌کنند که هیچ تضادی در منافع ندارند و در قبال ارائه اثر خود وجهی دریافت ننموده‌اند.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه ارشد با عنوان "بررسی تأثیر اختلاط ویتامین E و نانوتیوب‌های کربنی چند دیواره (MWCNTs) بر خواص مکانیکی و زیست سازگاری کامپوزیت زمینه پلی‌اتیلن با وزن مولکولی بسیار بالا (UHMWPE)" مصوب دانشکده فنی مهندسی دانشگاه علوم و تحقیقات است و نویسندگان این مقاله مراتب تشکر خود را از حمایت‌های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه، اعلام می‌دارند.

منابع

- Affatato, S., Bracco, P., Costa, L., Villa, T., Quaglini, V. and Toni, A. (2012). In vitro wear performance of standard, crosslinked, and vitamin-E-blended UHMWPE. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100:554-560.
- Aguiar, V.O., Maru, M.M., Soares, I.T., Kapps, V., Almeida, C.M., Perez, G., Archanjo, B.S., Pita, V.J. and Marques, M.D.F.V. (2022). Effect of incorporating multi-walled carbon nanotube and graphene in UHMWPE matrix on the enhancement of thermal and mechanical properties. *Journal of Materials Science*, 17:1-13.
- Aliyu, I.K., A, M.K. and Mohammed, A.S. (2021). Wear and corrosion resistance performance of UHMWPE/GNPs nanocomposite coatings on AA2028 Al alloys. *Progress in Organic Coatings*, 151: 1-10.
- Amoli, B.M., Ramazani, S.A. and Izadi, H. (2012). Preparation of ultrahigh-molecular-weight polyethylene/carbon nanotube nanocomposites with a Ziegler–Natta catalytic system and investigation of their thermal and mechanical properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 125: 453-461.
- Andjelić, S. and Richard, R.E. (2001). Crystallization behavior of ultrahigh molecular weight polyethylene as a function of in vacuo γ -irradiation. *Macromolecules*, 34:896–906.
- American Society for Testing and Materials. (2004). Standard Specification for Ultra-high-molecular Weight Polyethylene Powder and Fabricated Form for Surgical Implants. ASTM International. 13.01: 1-9
- Aoki, K. and Saito, N. (2020). Biocompatibility and carcinogenicity of carbon nanotubes as biomaterials. *Nanomaterials*, 10:264.
- Bourell, D.L., Watt, T.J., Leigh, D.K. and Fulcher, B. (2014). Performance limitations in polymer laser sintering. *Physics Procedia*, 56:147-156.
- Costa, L., Bracco, P., Del Prever, E.B., Luda, M.P. and Trossarelli, L. (2001). Analysis of products diffused into UHMWPE prosthetic components in vivo. *Biomaterials*, 22: 307-315.
- Costa, L., Luda, M.P., Trossarelli, L., Del Prever, E.B., Crova, M. and Gallinaro, P. (1998). Oxidation in orthopaedic UHMWPE sterilized by gamma-radiation and ethylene oxide. *Biomaterials*, 19: 659-668.
- Davidson, J.A., Schwartz, G., Lynch, G. and Gir, S. (1988). Wear, creep, and frictional heating of femoral implant articulating surfaces and the effect on long-term performance--part II, friction, heating, and torque. *Journal of Biomedical Materials Research*, 22: 69-91.
- del Prado, G., Pascual, F.J., Castell, P., Molina-Manso, D., Mahillo, I., Esteban, J. and Puértolas, J.A.(2018).Influence of carbon nanotubes structures embedded in UHMWPE on bacterial adherence. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67:934-941.
- Do Amaral Montanheiro, T.L., Cristóvan, F.H., Machado, J.P.B., Tada, D.B., Durán, N. and Lemes, A.P. (2015). Effect of MWCNT functionalization on thermal and electrical properties of PHBV/MWCNT nanocomposites. *Journal of Materials Research*, 30: 55-65.
- Dolezel, B. and Adamirova, L. (1982). Method of hygienically safe stabilization of polyolefines against thermoxidative and photooxidative degradation. *Czechoslovakian Socialist Republic Patent*, 221: 403-413.
- Enqvist, E. (2013). Carbon nanofiller reinforced UHMWPE for orthopaedic applications: optimization of manufacturing parameters (Doctoral dissertation, Luleå tekniska universitet). Luleå University of Technology, Department of Engineering Sciences and Mathematics, Division of Machine Elements, 94.

- Eun, J.H., Kim, D.H., Jang, I.U., Sung, S.M., Kim, M.S., Choi, B.K., Kang, S.W., Kim, M.S. and Lee, J.S. (2022). A study on mechanical properties and thermal properties of UHMWPE/MWCNT composite fiber with MWCNT content and draw ratio. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 17:15589250221108484.
- Fathi, M., Nasrabadi, M.N. and Varshosaz, J. (2017). Characteristics of vitamin E-loaded nanofibres from dextran. *International Journal of Food Properties*, 20: 2665-2674.
- Fonseca, A., Kanagaraj, S., Oliveira, M.S. and Simões, J.A. (2011). Enhanced UHMWPE reinforced with MWCNT through mechanical ball-milling. *Defect and Diffusion Forum*, 312: 1238-1243.
- Standard, I. (2009). Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Pages 60-94 in *Biological Evaluation Of Medical Devices*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Gaziano, J.M. (1994). Natural antioxidants and cardiovascular disease: observational epidemiologic studies and randomized trials. *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*, 59: 735-739
- Hassanein, N., Bougherara, H. and Amleh, A. (2020). In-vitro evaluation of the bioactivity and the biocompatibility of a novel coated UHMWPE biomaterial for biomedical applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 101:103409.
- Khalil, Y., Hopkinson, N., Kowalski, A. and Fairclough, J.P.A. (2019). Characterisation of UHMWPE polymer powder for laser sintering. *Materials*, 12: 1-22.
- Khorasani, M.T., Zaghiyan, M. and Mirzadeh, H. (2005). Ultra high molecular weight polyethylene and polydimethylsiloxane blend as acetabular cup material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 41: 169-174.
- Kurtz, S.M. (2009). *UHMWPE Biomaterials Handbook, Ultra High Molecular Weight Polyethylene in Total Joint Replacement and Medical Devices*. 2nd edn. Academic Press 544Pp. New York.
- Melk, L. and Emami, N. (2018). Mechanical and thermal performances of UHMWPE blended vitamin E reinforced carbon nanoparticle composites. *Composites Part B: Engineering*, 146: 20-27.
- Muratoglu, O.K., Mark, A., Vittetoe, D.A., Harris, W.H. and Rubash, H.E. (2003). Polyethylene damage in total knees and use of highly crosslinked polyethylene. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 85: 7-13.
- Oral, E., Beckos, C.G., Malhi, A.S. and Muratoglu, O.K. (2008). The effects of high dose irradiation on the cross-linking of vitamin E-blended ultrahigh molecular weight polyethylene. *Biomaterials*, 29: 3557-3560.
- Oral, E., Greenbaum, E.S., Malhi, A.S., Harris, W.H. and Muratoglu, O.K. (2005) undefined. (2005). Characterization of irradiated blends of α -tocopherol and UHMWPE. *Biomaterials*, 26: 6657-6663.
- Oral, E., Wannomae, K.K., Rowell, S.L. and Muratoglu, O.K. (2007). Diffusion of vitamin E in ultra-high molecular weight polyethylene. *Biomaterials*, 28: 5225-5237.
- Paladugu, S.R.M. and PS, R. S. (2022). Influence of gamma radiation on wear and oxidation properties of cross-linked UHMWPE components used in total knee arthroplasty-a review. *Materials Today: Proceedings*, 56: 1097-1102.
- Pang, W., Ni, Z., Chen, G., Huang, G., Huang, H. and Zhao, Y. (2015). Mechanical and thermal properties of graphene oxide/ultrahigh molecular weight polyethylene nanocomposites. *RSC Advances*, 5: 63063-63072.
- Pang, W., Wu, J., Zhang, Q. and Li, G. (2017). Graphene oxide enhanced, radiation cross-linked, vitamin E stabilized oxidation resistant UHMWPE with high hardness and tensile properties. *RSC Advances*, 7: 55536-55546.

- Patil, N.A., Njuguna, J. and Kandasubramanian, B. (2020). UHMWPE for biomedical applications: Performance and functionalization. *European Polymer Journal*, 125:109529.
- Singh, D.K. and Verma, R.K. (2021). Contemporary development on the performance and functionalization of ultra high molecular weight polyethylene (UHMWPE) for biomedical implants. *Nano Life*, 11:2130009.
- Sobajima, A., Okihara, T., Moriyama, S., Nishimura, N., Osawa, T., Miyamae, K., Haniu, H., Aoki, K., Tanaka, M., Usui, Y. and Sako, K.I., Kato, H. and Saito, N. (2020). Multiwall carbon nanotube composites as artificial joint materials. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 6:7032-7040.
- Suñer, S. and Emami, N. (2014). Investigation of graphene oxide as reinforcement for orthopaedic applications. *Tribology-Materials, Surfaces and Interfaces*, 8: 1-6.
- Wang, R., Zheng, Y., Chen, L., Chen, S., Zhuo, D. and Wu, L. (2020). Fabrication of high mechanical performance UHMWPE nanocomposites with high-loading multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Applied Polymer Science*, 137:48667.
- Wen, X., Li, Z., Yang, C., Yan, K., Wu, G. and Wang, D. (2022). Electron beam irradiation assisted preparation of UHMWPE fiber with 3D cross-linked structure and outstanding creep resistance. *Radiation Physics and Chemistry*, 199: 1-10.
- Zavala, J.M.D., Gutiérrez, H.M.L., Segura-Cárdenas, E., Mamidi, N., Morales-Avalos, R., Villela-Castrejón, J. and Elías-Zúñiga, A. (2021). Manufacture and mechanical properties of knee implants using SWCNTs/UHMWPE composites. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 120:104554.
- Zhu, W., Yan, C., Shi, Y., Wen, S., Liu, J. and Shi, Y. (2015). Investigation into mechanical and microstructural properties of polypropylene manufactured by selective laser sintering in comparison with injection molding counterparts. *Materials and Design*, 82: 37-45.

Investigation on the effects of simultaneous adding of α -tocopherol (vitamin E) and Multi-walled carbon nano tubes (MWCNT) on the mechanical properties and biocompatibility of the ultra-high molecular weight polyethylene polymer matrix (UHMWPE) in joint replacements

M.Fakoori^{1,2}, M.khorasani^{3*}, M. Kamali dolat abadi⁴

Received:2022.12.14

Accepted:2023.03.05

Abstract

Introduction: Ultra high molecular weight polyethylene (UHMWPE) has been used as the material of choice in joint replacement prosthesis for the last three decades due to its excellent physical and chemical properties. However, UHMWPE's wear and oxidation in the long term leads to osteolysis and limits the lifespan of this polymer. One of the effective methods to prevent oxidation is presents of α -tocopherol in UHMWPE matrix. But the presence of this additive alone does not improve the mechanical performance of UHMWPE. On the other hand, the use of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) has been shown to improve mechanical properties due to their exceptional properties such as elastic modulus and high surface-to-volume ratio. However, finding the optimal concentration of MWCNTs and vitamin E to improve the mechanical properties of this polymer is very vital and important. **methods :** In this research, to investigate and compare the effects of carbon nanotubes on the properties of UHMWPE/vitamin E composite, two composites were produced, one containing 0.2% by weight of vitamin E and the other containing 0.25% by weight of vitamin E along with 0.5% by weight of MWCNT. **Results and Conclusion:** Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) reported an increase in the characteristic peaks of PE-E/CNT composite compared to PE-E composite. Differential scanning calorimetry (DSC) reported about 7% increase in crystallinity in PE-E/CNT composite. Dynamic thermos mechanical analysis (DMTA) also showed improved elastic properties in the PE-E/CNT composite compared to the composite containing vitamin E. Finally, results of the toxicity test (MTT assay) showed complete biocompatibility of the composites. Totally, the results showed complete biocompatibility and mechanical improvement of the polymer substrate in the presence of vitamin E and carbon nanotubes.

Keywords: *artificial joint, UHMWPE/Vitamin E composite, UHMWPE/Vitamin E/MWCNT composite*

¹ PhD candidates, Department of nanotechnology and advance materials, Biomaterials research Group, Materials and Energy Research Center, Tehran, Iran

² Biomedical Engineering (Biomaterials) Department, Islamic Azad University - Science and Research Branch, Tehran, Iran

³ Associate professor, Department of Biomaterials, Faculty of polymer science, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran *(corresponding author: m.khorasani@gmail.com)

⁴ Assistant professor, Textile Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran



نقش تنظیم‌کننده‌های رشد در بهینه‌سازی تشکیل کالوس در گیاه دارویی ریحان بنفش

(*Ocimum basilicum* L.)

مهدی کاکایی*^۱، فاطمه حاج مرادی^۲، محسن منصوری^۳، محمدعلی ابراهیمی^۴

چکیده

مقدمه و هدف: امروزه تکنیک‌های کشت بافت گیاهی به عنوان ابزاری ارزشمند جهت ایجاد تنوع ژنتیکی با هدف به‌نژادی گیاهان و همچنین تولید گیاهان عاری از ویروس کاربرد دارند. هدف از این تحقیق ارائه یک روش مؤثر بر کالوس‌زایی در گیاه ریحان بنفش است؛ لذا در این پژوهش بهینه‌سازی شرایط کشت بافت گیاه ریحان بنفش به منظور تولید کالوس، شناسایی درصد القای کالوس، نرخ رشد، سرعت رشد و محتوای آب نسبی کالوس از طریق کشت بافت انجام شد. **مواد و روش‌ها:** آزمایش بهینه‌سازی القای کالوس بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار عامل، ریز نمونه و سه سطح هورمون‌های بنزیل آدنین (BA)، اندول استیک اسید (IAA) و اندول بوتیریک اسید IBA/ اجرا گردید. **یافته‌ها:** نتایج نشان داد بالاترین درصد القای کالوس (۸۸ درصد) مربوط به محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA بود. اثر ترکیبات هورمونی بر چهار ویژگی مورد بررسی شامل، درصد کال‌زایی، سرعت رشد، محتوای آب نسبی و نرخ رشد (وزن خشک)، معنی‌دار بوده است که می‌توان در جهت انتخاب بهترین ترکیب در کالوس‌زایی و بهینه‌سازی کشت بافت و نهایتاً اهداف آتی به‌نژادی از آن استفاده نمود. همچنین اثر متقابل دو فاکتور ریزنمونه و ترکیبات هورمونی تنها بر شاخص نرخ رشد اثر معنی‌داری ($P \leq 1\%$) داشته است. **نتیجه‌گیری:** کیفیت کالوس‌های القا شده نشان‌دهنده انتخاب صحیح ریزنمونه و ترکیبات هورمونی مناسب است. بنابراین بین تولید کالوس و تنظیم‌کننده‌های رشد ارتباط مستقیم وجود دارد و با توجه به نوع گیاه مورد مطالعه و مقدار هورمون موجود در آن میزان استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در القای کالوس متفاوت خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: کالوس‌زایی، ریز نمونه، فیتوهورمون‌ها، کشت بافت.

۱. دانشیار گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران-ایران. (*نویسنده مسئول: M.Kakaei@pnu.ac.ir)

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران-ایران.

۳. کارشناس ارشد، گروه طب ایرانی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران.

۴. استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران-ایران.

مقدمه

گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*)، گیاهی علفی، یکساله و متعلق به تیره نعنائیان (*Lamiaceae*) و جنس *Ocimum* شامل ۳۰ گونه است و منشأ آن کشورهای ایران، هند و افغانستان گزارش شده است (Gohari et al., 2018). از ریحان به صورت گیاه ادویه‌ای، دارویی و سبزی تازه استفاده می‌شود. اسانس این گیاه به طور ویژه شامل فنیل پروپانویدها است که در درمان بیماری‌هایی چون سردرد، اسهال، سرفه، زگیل، کرم روده و نارسایی‌های کلیوی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مهم‌ترین ترکیبات فنیل پروپانوییدی آن شامل اوژنول، چاویکول، متیل اوژنول، متیل چاویکول، مرسیتین، فنیل سینامات و المیسین است (Azizi Abdollahi Mandoulakani, 2019). گیاهان دارویی به عنوان منبع مهمی جهت تولید دارو، نقش مهمی در سلامت انسان‌ها دارند و بسیاری از مواد دارویی با اهمیت جزو متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند (Constabel, 1990). گیاهان دارویی از جمله ارزشمندترین منابع جهت درمان بیماری‌ها بوده و هستند و حتی در گذشته هم مورد توجه بوده‌اند. در ایران و سایر کشورهای جهان، گیاهان دارویی، در طب سنتی نقش خاصی داشته‌اند و بر اساس شواهد تاریخی، ایران در این زمینه پیش‌تاز بوده است و از جمله کشورهای مطرح به شمار می‌آید (Khanfar et al., 2003).

گیاه ریحان دگرگشن بوده و در اثر تکثیر بوسیله بذر تنوع زیادی در آن ایجاد شده است بنابراین برای مصارف صنعتی به گیاهان همگن نیاز است. لذا تکنیک کشت بافت بعنوان روشی مطلوب به منظور تولید گیاهان یکنواخت قابل استفاده است (Sadeghian tehrani et al., 2010). از این جهت استفاده از روش‌های نوین کشت درون شیشه‌ای ضرورتی اجتناب ناپذیر است (Ziaei et al. 2014). یکی دیگر از کارکردهای کشت بافت و متعاقب آن کشت سلول تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشد گاهی اوقات تولید مصنوعی این مواد دشوار بوده و یا از لحاظ اقتصادی مطلوب نیست، در این شرایط استفاده از کشت بافت و کشت سلول گیاهی برای تولید متابولیت‌های ثانویه مفید است (Haghighat Hour et al., 2011; Kahrizi et al., 2022; Peyvandi et al. 2009; Ravishankar & Venkataraman 1998; Zarei et al., 2020).

در مطالعه‌ای Zinhari و همکاران (2016) در پژوهشی تحت عنوان القای کالوس و باززایی مستقیم در ریزنمونه‌های مختلف گیاه دارویی از مک (*Lepidium draba* L.) بیان نمودند که درصد کالوس‌زایی و آغازش کالوس ریزنمونه ساقه بیشتر از دیگر ریزنمونه‌ها بود، در حالی که درصد باززایی کالوس در سه ریزنمونه مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری نداشت. کشت سلول و بافت گیاهی که کشت استریل یا کشت درون شیشه‌ای نیز نام‌گذاری می‌شود ابزاری ارزشمند و مفید در مطالعات کاربردی و پایه‌ای است که با وجود محاسن بی شمار آن امروز کاربرد ویژه و زیادی در تمامی دنیا پیدا کرده است (Razavi et al., 2016). استفاده از تکنیک کشت بافت به عنوان روشی بسیار مؤثر و ارزشمند جهت ازدیاد، اصلاح عملکرد و بهبود کیفیت و تولید گیاهان یکنواخت و عاری از بیماری گزارش گردیده است (Barcelo et al., 2001; Zarei et al., 2020). کالوس توده‌ای از سلول‌های پارانشیمی بی شکل با دیواره سلولی نازک است که در شرایط طبیعی و یا در محیط درون شیشه‌ای به صورت سازمان نیافته رشد می‌کنند. بافت

کالوس بسته به گونه گیاهی ممکن است از نظر ساختمانی و چگونگی رشد با یکدیگر متفاوت باشد برخی کالوس‌ها ترد و شکننده و برخی به علت وجود لیگنین زیاد، سفت و سخت هستند (Elyasi et al., 2017). کشت کالوس از روش‌های پرکاربرد کشت بافت به منظور تولید گیاهان دارویی، تولید مثل غیرجنسی، دستکاری ژنتیکی و افزایش تنوع ژنتیکی است (Zarei et al., 2020). در تحقیقی Fahmideh و همکاران (2019)، کالوس‌زائی و اندام‌زائی از ریزنمونه‌های مختلف گیاه علف مار (از جنس *Cleome L.* و تیره *Capparidaceae*)، تحت شرایط درون شیشه‌ای بررسی کردند و بهترین ریزنمونه و تنظیم کننده رشد جهت به دست آوردن بیشترین میزان کالوس برای تولید گیاهچه را شناسایی نمودند و بیان کردند که تهیه ریزنمونه از پرچم و تمامی ترکیبات هورمونی مورد استفاده در مطالعه آن‌ها برای کالوس‌زایی مناسب است (Bigdeli et al., 2004). محققین بسیاری جهت کالوس‌زائی در محیط کشت از ریزنمونه‌های مختلف گیاهی استفاده کرده‌اند (Abbasi et al., 2016 & Abdirad et al., 2011 & Baravardi et al., 2015 & Ghotbzadeh Kermani et al., 2015 & Kahrizi and Kakaie., 2010 & Sadatnoori et al., 2014 & Zarei et al., 2020 & Zebarjadi et al., 2012). در همه این تحقیقات، فیتوهورمون‌های اکسین و سیتوکینین در کنترل فرآیندهای مختلف حیاتی از جمله رشد، نمو و تنظیم پاسخ به محرک‌های محیطی نقش ویژه‌ای دارند. مطالعه حاضر با هدف دستیابی به دانش فنی تکثیر و بهینه‌سازی شرایط ریزازدیادی گیاه ریحان بنفش از ریزنمونه‌های برگ و ساقه این گیاه و همچنین انتخاب بهترین ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد و انتخاب ریزنمونه مناسب طراحی و اجرا شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه ریز نمونه

بذر گیاه ریحان بنفش (*Ocimum basilicum L.*) مورد تحقیق از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. این آزمایش در آزمایشگاه گروه طب ایرانی، دانشگاه علوم پزشکی آجا در تهران و بخشی از آن نیز در دانشگاه پیام‌نور اسدآباد به شرح زیر انجام پذیرفت. در ابتدا با استفاده از کشت بذر در گلدان‌های حاوی کوکوپیت، پرلیت و کمپوست، گیاهان مناسب و مطلوب از نظر مورفولوژیکی جهت تهیه ریزنمونه‌های گیاهی فراهم شد. برگ‌ها و ساقه‌های سالم و بدون آسیب از گیاهان گلدانی جدا شده و به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا برگ‌ها و ساقه‌های جدا شده به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری آبشویی شدند. سپس به مدت ۷۰ ثانیه تا ۱ دقیقه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفتند. ریزنمونه‌ها در مرحله بعد به مدت ۱۰ و ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت ۲/۵ درصد ضدعفونی شدند. بعد از این مرحله، ریزنمونه‌ها دو بار به مدت سه دقیقه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

تولید کالوس

قطعاتی از ساقه و برگ به طول حدود ۰/۵ تا ۱ سانتیمتر از بخش رأسی گیاه که دارای ۱ یا ۲ برگ نسبتاً کوچک و جوانه انتهایی بود جدا نموده، ابتدا توسط آب حاوی ماده شوینده (مایع ظرفشویی) و پس توسط آب مقطر شستشوی آن‌ها

صورت پذیرفت. بعد از این مرحله قطعات جدا شده به مدت ۱۵ دقیقه به محلول ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد منتقل گردیدند. سپس قطعات با آب مقطر استریل به طور کامل شستشو داده شدند و در نهایتاً قطعات ریزنمونه به مدت ۱ دقیقه به محلول قارچ کش ویتاواکس ۲ درصد منتقل شدند و نهایتاً قطعات جدا شده با آب مقطر استریل به طور کامل شستشو داده شدند و سپس ریزنمونه‌های برگ و ساقه در محیط کشت پایه شامل نمک‌های MS (Murashige & Skooge 1962) و غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد به همراه ویتامین و ساکارز با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به عنوان منبع کربن و آگار با غلظت ۷ g/l و با pH= ۵/۸ کشت شدند. ترکیبات هورمونی مورد استفاده در محیط‌های کشت شامل دو غلظت ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر BA به عنوان منبع سیتوکینین و دو هورمون IBA و IAA، هر کدام در دو غلظت ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر استفاده شدند. برای هر سنجش، تیمارها با چهار تکرار انجام شد. نمونه‌های موجود در پتری دیش‌ها پس از کشت در اتاق رشد به مدت ۲۵ روز با دمای 25 ± 2 و روشنایی ۱۶ ساعت قرار گرفتند. ظروف کشت هر روز بررسی و تغییرات ایجاد شده یادداشت گردید. پس از ۳۰ روز از تاریخ کشت، جمع‌آوری داده‌ها از رشد کالوس‌های تشکیل شده انجام شد که صفات شامل درصد القای کالوس، نرخ رشد، سرعت رشد و محتوای آب نسبی کالوس بود.

میزان (نرخ) رشد نسبی کالوس (RGR) بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید (Lokhande et al., 2010).

$$RGR \% = (W_f - W_i) / W_i \times 100\%$$

Wi = وزن اولیه کالوس، Wf = وزن نهایی کالوس‌ها

محتوای آب نسبی کالوس‌ها (RWC) با فرمول زیر محاسبه گردید (Sun et al., 2010).

$$RWC = (FW - DW) \times 100\% / FW$$

FW = وزن تر کالوس، DW = وزن خشک کالوس

درصد القای کالوس (درصد کالوس‌زایی): برای این منظور در هر پتری دیش تعداد ریزنمونه‌هایی که تولید کالوس نموده بودند بر تعداد کل ریزنمونه‌های کشت شده تقسیم شد و نهایتاً در عدد ۱۰۰ ضرب گردید (Esfandiar et al., 2017).

سرعت رشد پینه با اندازه‌گیری قطر پینه‌ها در بازه‌های زمانی مساوی ۱۰ روزه و سپس مقایسه آن در تیمارهای مختلف بررسی گردید. برای محاسبه قطر پینه از کاغذ شطرنجی میلیمتری استفاده شد و طول و عرض پینه‌ها اندازه‌گیری و سپس با روش Compton قطر پینه تعیین شد (Compton, 1994).

آنالیز آماری

این پژوهش در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام پذیرفت و قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودار با نرم‌افزار Excel، و برای انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

بر اساس نوع ریز نمونه‌های استفاده شده در این تحقیق، تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف هورمونی در کالوس‌زائی مشاهده گردید (با چند غلظت حداقلی بررسی انجام شد و به دلیل پاسخ مناسب دو غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر، از سایر غلظت‌های دیگر استفاده نشد) (جدول ۱). القای کالوس‌زائی در ریزنمونه‌های مختلف گیاهان، تنوع بسیاری نشان داده است و بر اساس پژوهش حاضر احتمالاً غلظت‌های هورمونی در حد زیادی وابسته به ریزنمونه است. شکل ۱، مراحل مختلف القای کالوس‌زائی با شاخساره نابجا در گیاه ریحان بنفش را نشان می‌دهد.

کیفیت کالوس‌های القا شده نشان‌دهنده انتخاب صحیح ریزنمونه و ترکیبات هورمونی مناسب است. نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌های مربوط به نوع ریزنمونه و اثر ترکیبات هورمونی بر برخی صفات کالوس‌زائی در گیاه ریحان بنفش، نشان داد نوع ریزنمونه تنها بر محتوای آب نسبی کالوس مؤثر بوده و بر سایر صفات اثر معنی‌داری نداشته است (جدول ۱) و این احتمالاً به تفاوت ذاتی محتوای آب نسبی موجود در برگ و ساقه مرتبط است.

اثر ترکیبات هورمونی بر سه صفت مورد بررسی سرعت رشد، محتوای آب نسبی و نرخ رشد (وزن خشک) معنی‌داری بوده است که می‌توان در جهت انتخاب بهترین ترکیب در کالوس‌زائی و بهینه‌سازی کشت بافت و نهایتاً اهداف به‌نژادی از آن در ارتباط با صفات مذکور بهره‌مند شد.

همچنین اثر متقابل دو فاکتور ریزنمونه و ترکیبات هورمونی تنها بر شاخص نرخ رشد اثر معنی‌داری ($P \leq 1\%$) داشته و بر سایر شاخص‌های مورد مطالعه اثر معنی‌داری نداشته است. این اثر معنی‌داری بدان مفهوم است که فاکتورهای مورد مطالعه به صورت مستقل از یکدیگر عمل نمی‌کنند و وابسته به یکدیگر هستند. تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف هورمونی در کالوس‌زائی این مطالعه با نتایج طاه‌ها و همکاران (۲۰۰۸) همسو است، طاه‌ها و همکاران با تحقیق روی گیاه *gyptian* *Catharanthus roseus* (L.) بیان کردند که بر روی محیط کشت MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر کینتین، کشت‌های سوسپانسیونی از ریزنمونه‌های برگ *C. roseus* تحت شرایط نور القا شده است (Taha et al., 2008).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، جهت تولید کالوس وجود هورمون ضروری است و در محیط کشت فاقد هورمون کالوس تولید نشد. نتایج مشابه در گزارشات دیگر نیز وجود دارد (Khotaie & Karimi 2010). در این تحقیق ترکیبات مختلف هورمونی (شامل اکسین و سیتوکینین) در ارتباط با شاخص‌های مختلف وابسته به کالوس، واکنش‌های مختلفی نشان داد. اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها اصلی‌ترین فاکتور رشد در روش کشت بافت می‌باشند که نوع و غلظت موثر آنها در ریزنمونه‌های مختلف، متفاوت است (Hsia & Korban 1996; Abdirad et al., 2011).

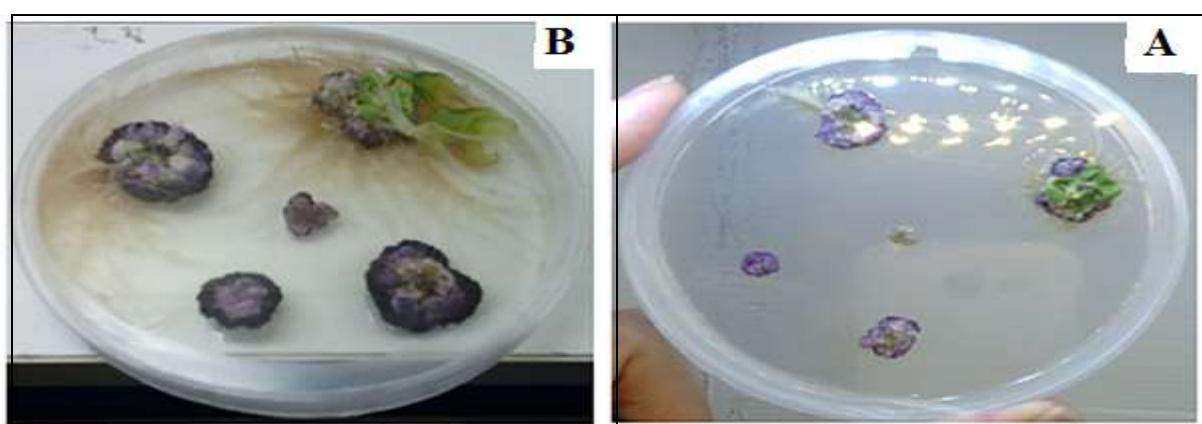
جدول ۱- تجزیه واریانس ترکیبات هورمونی و ریزنمونه بر صفات درصد کالوس‌زائی، سرعت رشد، محتوای آب نسبی و نرخ رشد

Table 1. Analysis of variance of hormonal compounds and explants on callus percentage, growth rate, relative water content and growth rate

Growth Rate (Dry weight) (mg per day)	Relative Water content (mg)	Growth Rate (mm diameter per day)	Percent of Callus Formation	df.	Source of variations
0.007 ^{ns}	0.001**	0.0001 ^{ns}	897.005 ^{ns}	1	Explant
0.085**	0.003**	0.004**	2401.172 ^{ns}	7	Growth Regulator
0.042**	0.001 ^{ns}	0.00012 ^{ns}	441.350 ^{ns}	7	× Growth regulator
0.006	0.0001	0.0001	441.885	32	Error
13.37	1.99	28.77	37.17		CV (%)

** و ns: به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد و غیرمعنی‌دار

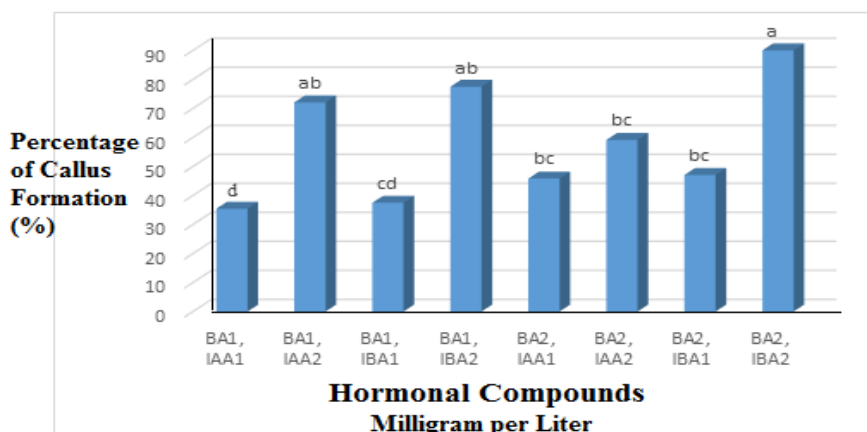
^{ns}, ** non-significant and significant at 1% level.



شکل ۱- مراحل مختلف القای کالوس‌زائی در گیاه ریحان بنفش با شاخساره نابجا مربوط به محیط کشت IAA. A) ابتدای تشکیل القای کالوس در گیاه ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.) و مشاهده رشد اولیه، B) تشکیل کامل کالوس.

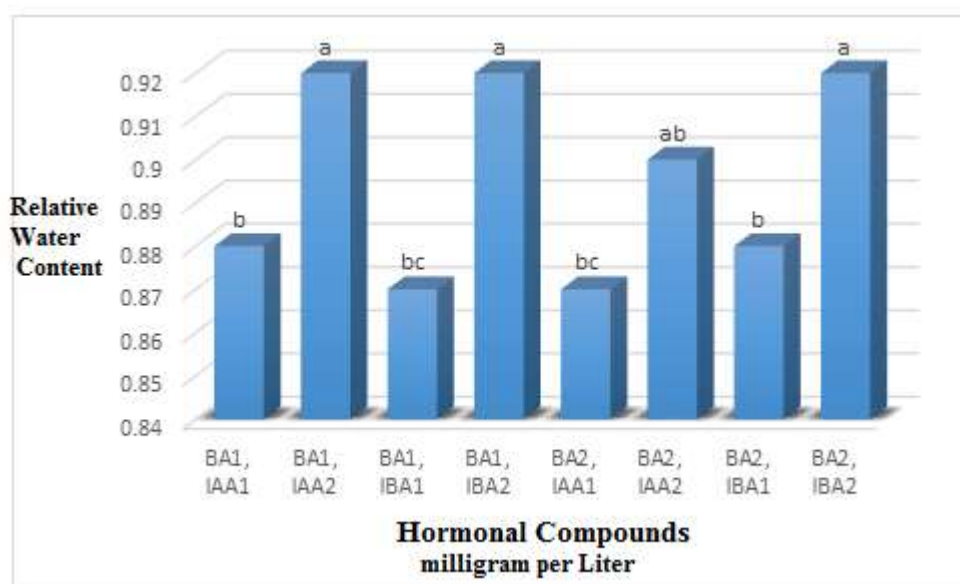
Figure 1. Different stages of callus induction in purple basil plant. a) The beginning of callus induction formation in purple basil plant and observing the initial growth, b) complete callus formation.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد بهترین ترکیب از نظر شاخص درصد کالوس‌زائی شامل ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA است (شکل ۲). کمترین درصد کالوس‌زائی مربوط به محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم BA به اضافه ۱ میلی‌گرم اندول استیک‌اسید (IAA) بوده است که بیشترین درصد کالوس‌زایی آن ۸۸ درصد و کمترین میزان برای صفت درصد کالوس‌زایی ۳۱ درصد است. در مطالعه ختایی و کریمی (۲۰۱۰)، اثر اکسین و سیتوکینین بر تولید کالوس در تاتوره را بررسی کردند و نشان دادند در حضور اندول استیک‌اسید (IAA) تولید کالوس افزایش یافته ولی اندام‌زایی مشاهده نشده که با نتایج آزمایش حاضر در خصوص گیاه دارویی ریحان بنفش هم‌سو است (Khotaie & Karime 2010).



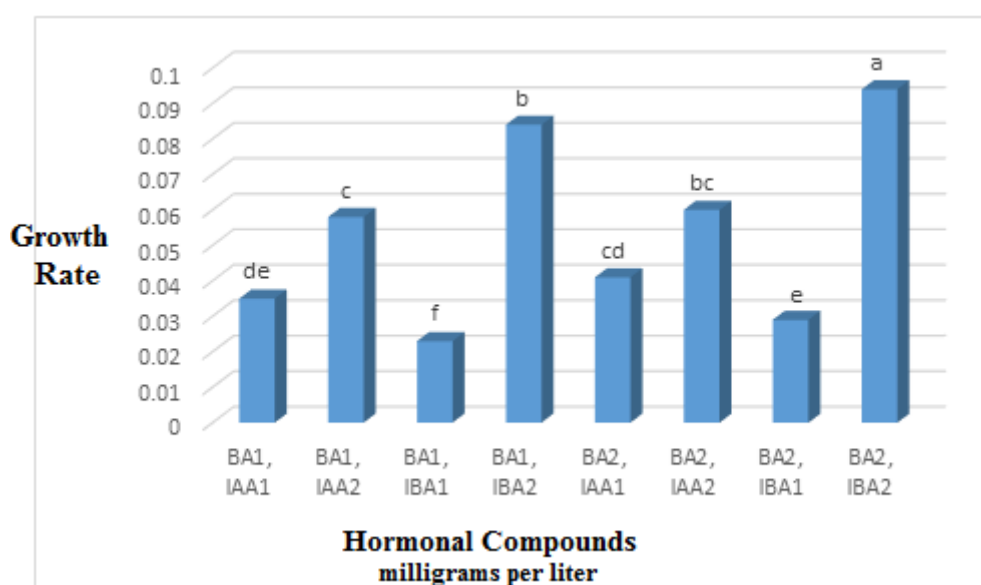
شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف BA, IBA و IAA بر درصد کالوس‌زائی گیاه ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.)
Figure 2. Effect of different concentrations of BA, IBA and IAA on the Percentage of calluses Purple Basil
 حروف انگلیسی بالای ستون‌ها نشان دهنده انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

مقایسه میانگین‌ها برای شاخص محتوای آب نسبی (شکل ۳) نشان داد بیشترین میانگین مربوط به ترکیبات هورمونی BA ۱ میلی گرم در لیتر به همراه IBA ۲ میلی گرم در لیتر و اندول استیک اسید (IAA) ۲ میلی گرم در لیتر و همچنین محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم در لیتر BA به همراه ۲ میلی گرم در لیتر IBA بوده است و کمترین میانگین محتوای آب نسبی نیز مربوط به ۱ میلی گرم در لیتر BA و ۱ میلی گرم در لیتر IBA و نیز ۲ میلی گرم در لیتر BA و یک میلی گرم در لیتر IAA است. که بیشترین درصد برای صفت محتوای آب نسبی ۹۰ درصد و کمترین آن نیز ۸۶/۵ درصد است.



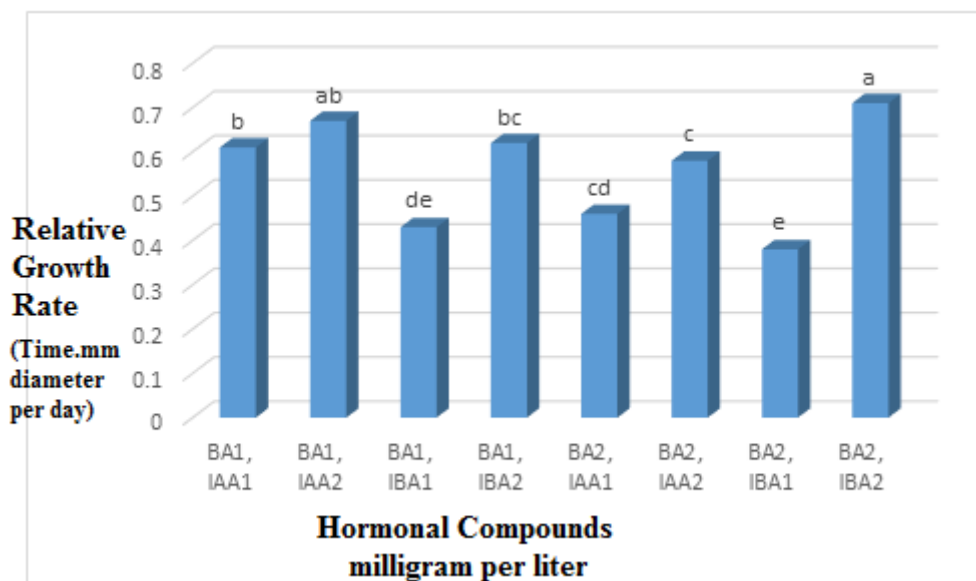
شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف BA, IBA و IAA بر محتوای آب نسبی
Figure 3. Effect of different concentration of indole butyric acid (IBA), Benzyl adenine (BA) and indole acetic acid (IAA) on the Relative water content
 حروف انگلیسی بالای ستون‌ها نشان دهنده انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

مقایسه میانگین‌ها برای شاخص سرعت رشد (شکل ۴) نشان داد بیشترین سرعت رشد مربوط به ترکیب هورمونی شامل ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است و گیاه در ترکیبات دارای IAA دارای سرعت رشد کمتری بوده است. بیشترین و کمترین میانگین مربوط به میزان BA1 و IBA1، به ترتیب ۹۰ درصد و دو درصد است. مطالعات علمی بسیاری گزارش کرده‌اند که همانند سایر تنظیم‌کننده‌های رشد غلظت‌های مناسب اکسین‌ها مانند IBA در گیاهان مختلف، متفاوت است. در ابتدای کشت ریزنمونه‌ها استفاده از اکسین کمتر ولیکن در مراحل بعد اکسین‌ها نقش ضروری دارند که این موضوع به اهمیت نقش اکسین در القای ریشه زایی و جذب مواد غذایی نسبت داده می‌شود (Filipecki *et al.*, 2005).



شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف IBA، BA و IAA بر سرعت رشد در گیاه ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.)
Figure 4. Effect of different concentration of indole butyric acid (IBA), Benzyl adenine (BA) and indole acetic acid (IAA) on the Growth rate in (*Ocimum basilicum* L.)
 حروف انگلیسی بالای ستون‌ها نشان دهنده انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین‌ها برای صفت شاخص نرخ رشد نسبی (شکل ۵) نشان داد بیشترین نرخ رشد مربوط به محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است و کمترین نرخ رشد مربوط به ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA بوده است. همانطوری که گفته شد بیشترین میانگین مربوط به ترکیب BA2 و IBA1 با میزان ۳۵٪ بود.



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف IBA, BA و IAA بر نرخ رشد نسبی در گیاه ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.)
Figure 5. Effect of different concentration of indole butyric acid (IBA) on the Relative growth rate in purple basil
 حروف انگلیسی بالای ستون‌ها نشان دهنده انجام آزمون مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشد.

مقایسه میانگین اثرمتقابل نوع ریزنمونه و ترکیبات هورمونی نیز انجام شد (جدول ۲) و نتایج نشان داد که بیشترین میانگین مربوط به ریزنمونه ساقه در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به اضافه ۲ میلی‌گرم IBA بوده است. همچنین در مجموع میانگین‌های ریزنمونه ساقه در اکثر ترکیبات هورمونی بیش از ریزنمونه برگ بوده است. رامندی و همکاران در مطالعه بهینه‌سازی کالوس‌زایی و کشت سوسپانسیون سلولی در زعفران بیان کردند که بیشترین درصد کالوس‌زایی و وزن تازه کالوس‌ها در تیمار حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر 2, 4-D و یک میلی‌گرم بر لیتر BAP به دست آمد (Ramandi et al., 2023).

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف IBA, BA و IAA بر برگ و ساقه (مقایسه میانگین اثرمتقابل نوع ریزنمونه و ترکیبات هورمونی) برای صفت نرخ رشد نسبی

BA2, IBA2	BA2, IBA1	BA2, IAA2	BA2, IAA1	BA1, IBA2	BA1, IBA1	BA1, IAA2	BA1, IAA1	Regulator
0.35 fg	0.42 ef	0.24 g	0.61 bcd	0.42 ef	0.50 de	0.62 bcd	0.62 bcd	Leaf
0.77 a	0.60 bcd	0.70 ab	0.69 ab	0.65 abc	0.56 bcd	0.54 cde	0.66 abc	Stem

هورمون‌های بنزیل آدنین (BA)، اندول استیک اسید (IAA) و اندول بوتیریک اسید IBA
 Benzyl adenine (BA), indole acetic acid (IAA) and indole butyric acid (IBA) hormones

ریزازدیادی به روش کشت بافت، امکان تولید سریع از گیاهان یکنواخت برای بسیاری از گونه را ایجاد کرده است. اثر سیتوکینین‌ها در کشت بافت بسیار قابل توجه است و معمولاً همراه با اکسین برای بهبود تقسیم سلولی و کنترل اندام‌زایی

استفاده می‌شود (Del-Poza *et al.*, 2005). اثبات گردیده است که تنظیم‌کننده‌های رشدی با یکدیگر برهمکنش داشته و می‌توانند اثرات همدیگر را ارتقا بخشند. کلاً تشکیل شاخساره چه به طور مستقیم از بافت ریزنمونه یا غیرمستقیم از کالوس، بوسیله تعادل مواد تنظیم‌کننده رشد بین اکسین و سیتوکنین تنظیم می‌گردد (Ghasemi *et al.*, 2017). در تحقیقات مشابه سعی بر آن شده تا بهترین ترکیب با مطلوب‌ترین غلظت از هورمون‌ها مورد بررسی قرار گیرد (Seydi *et al.*, 2016). تنظیم‌کنندگان رشد تأثیر زیادی بر فرآیندهای اصلی سلول از جمله شروع تقسیم سلولی و انبساط سلولی، اسیدی شدن دیواره سلول و سازمان‌دهی سلول به‌منظور ایجاد بافت کالوس و یا بافت تمایز یافته نظیر (ساقه و ریشه) ایفا می‌کنند (Gaspr *et al.*, 1996).

در مطالعه ای، بهینه‌سازی کشت کالوس گیاه دارویی اسطوخودوس بررسی شد، کالوس‌های القا شده از ریزنمونه‌های برگ کشت شده در محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم برلیتر 2, 4-D، به همراه ۱ میلی گرم بر لیتر BAP که در شرایط روشنایی اتاق رشد نگهداری شدند، بالاترین درصد کالوس‌زایی و وزن تر و خشک را در میان سایر تیمارها به خود اختصاص دادند و به عنوان بهترین کالوس‌های القا شده شناخته شدند (Kikha Akhar *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای Sadat noori و همکاران (Sadat noori *et al.*, 2012) در مورد کالوس‌زایی در گیاه زیره سیاه بیان نمودند که بیشترین درصد کالوس‌زایی (۹۳ درصد) مربوط به تیمار با ترکیب هورمونی ۵/۰ میلی گرم در لیتر کینیتین و ۱ میلی گرم در لیتر NAA است که دارای تفاوت معنی‌دار با سایر تیمارها بود. در تحقیقی Abdi rad و همکاران (Abdi rad *et al.*, 2011)، با مطالعه صفات مربوط به کالوس در گل محمدی و گل سرخ مینیاتوری، ابراز نمودند که کالوس‌های ۲۰ روزه (۲۰ روز پس از بنیان‌گذاری)، بهترین نمونه‌ها برای تشخیص بهتر نرخ رشد در دو گونه بودند و کالوس‌های ۲۰ روزه گل سرخ مینیاتور نسبت به گل محمدی حجم بیشتر و در نتیجه نرخ رشد بالاتری داشتند. در پژوهشی Peyvandi و همکاران (Peyvandi *et al.*, 2009) در مطالعه کالوس‌زایی و اندام‌زایی اسطوخودوس ابراز نمودند که در هیچکدام از محیط‌های واکشت ریشه‌زایی مشاهده نگردید. به نظر می‌رسد نوع ریزنمونه، بالغ بودن یا جوان بودن و همچنین موقعیت ریزنمونه در گیاه، که نشان از هورمون داخلی است و نیز ترکیب محیط کشت می‌تواند در فرآیندهای تقسیم سلولی و تشکیل جنین و اندام تأثیرگذار باشد.

نتیجه‌گیری کلی

گیاه دارویی ریحان بنفش حاوی روغن‌های ضروری و اسانس بازلیک است و جهت بهبود بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد.

بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد بالاترین درصد کالوس‌زایی مربوط به محیط کشت حاوی ۲ میلی گرم در لیتر IBA و ۲ میلی گرم در BA بود و در مجموع میانگین‌های ریزنمونه ساقه در اکثر ترکیبات هورمونی بیشتر از سایر ریزنمونه‌ها

بود. در حقیقت این پژوهش پایه‌ای، راه را برای گام بعدی فعالیت‌های به‌نژادی محققین گیاه ریحان بنفش هموار نمود و به عبارت دیگر نتایج بررسی پاسخ این گیاه به کالوس‌زایی در خصوص انتخاب سطوح ترکیبات هورمونی و نوع ریزنمونه مفید خواهد بود و می‌تواند نویدبخش امکان سایر فعالیت‌هایی نظیر باززایی، تکثیر، جنین‌زایی سوماتیکی، تولید بذر مصنوعی و انتقال ژن هدفمند به این گیاه ارزشمند باشد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

سپاسگزاری

از همه‌ی عزیزانی که در کلیه مراحل این کار پژوهشی همکاری نمودند مراتب قدردانی و سپاسگزاری را داریم.

References

- Abbasi H.A. Tasaodi S. Mirsoleimani M.A. and Masoudi M. 2016. Study of milkweed (*Calotropis procera*) regeneration potential *in vitro* culture conditions. J. Plant Res. 49 (4): 833-842.
- Azizi M. and Abdollahi Mandoulakani, B. 2019. Identification of SNPs in exonic regions of eugenol o-methyl transferase and chavicol omethyl transferase genes in basil. J. of Agri. Bio. 10 (1): 105-117.
- Abdirad S. Rezanejad F. and Kalantari K.F. 2011. The effect of different light Intensities on callogenesis and calli pigments content of shoot and floral explants of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa miniature*. A. B. J. 3 (1): 43-65.
- Baravardi H. Ranjbar Gh.A. Kamali F. and Abadi S. 2015. Comparison of amount of callus induction in *juniperus excelsa* on MS and WPM culture media using different concentration of NAA, 2, 4-D and Kin. J. Crop Breed. 7 (16): 149-157.
- Bigdeli M., Hashkavaii A., Rustaiyan A. 2004. A review on biological effect of Cleome L. and identification the compositions of cleome coluteoides essential Oil. J. Med. Plants, 3 (12): 9-14.
- Barcelo P. Gaunt S.R. Thorpe C. and Lazzeri P. 2001. Transformation and gene expression. In: Advances in Botanical Research, vol. 34: Biotechnology of Cereals. Shewry P.R. Lazzeri P.A. Edwards K.J. (Eds). Academic Press, London. pp. 59-126.
- Compton M.E. 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 37: 217-242.
- Constabel F. 1990. Medicinal plant biotechnology. Planta Med. 56: 421-425.
- Del-Poza J.C. Lopeza-Matas M.A. Ramirez-Parra E. and Gutierrez C. 2005. Hormonal control of the plant cell cycle. Physiol. Plant. 123: 173-183.
- Elyasi L. Mehrabi A. Seyedi M. and Safari Z. 2017. Optimization of callus culture of *Satureja Bachtiarica* L. using different explants and concentrations of growth regulators. J. Crop Breed. 8 (20): 132-124.
- Esfandiar A. Kazemitabar S.K. and Kiani, Gh. 2017. Investigation of callus induction and indirect shoot regeneration in *Chelidonium majus* L. affected by plant growth regulators. Plant Research Journal. 30 (3): 488-497.
- Fahmideh L. Sheikhi Sh. Benakashani F. and Solouk M. 2019. Callus induction and organogenesis from various explants of plant *Capparis spinosa* L. under *in vitro* conditions. J. Plant Prod. Sci. 26 (1): 75-88.
- Filipecki M. Wisniewska A. Yin Z. and Malepszy S. 2005. The heritable changes in metabolic profiles of plants regenerated in different types of *in vitro* culture. Plant Cell, Tiss. and Org. Cul. (PCTOC). 82: 349-356.
- Gaspr T. Kevers C. Penel C. Greppin H. Reid D. and Thorpe T. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 32: 272-289.
- Ghasemi Z. Masoumiasl A. and Amiri-Fahliani R. 2017. Study of direct plantlet regeneration in two populations of medicinal bitter melon (*Citrulus colosynthis* L.) using types of explants and plant growth regulators. Cell. Mol. J. (Iranian J. of Bio.). 30: 409-414.
- Ghotbzadeh Kermani S. Pourseyedi Sh. Mohamadi Gh.A. Moieni A. and Baghizadeh A. 2015. Regeneration of white top (*Cardaria draba* L.) using tissue culture. Agri. Bio. J. 7 (1): 133-154.

- Gohari Gh. Rasouli F. and Zahedi S.M. 2018. Evaluation of some growth characteristics, essential oil content and yield of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) in salinity stress condition and humic acid. appli. J. of agricultural knowledge and sustainable production. 27 (2): 160-168.
- Haghighat Hour M. Asghari Z. Rasool N.Z. 2011. Callus production and regeneration of medicinal plant *Papaver pseudo-orientale* under in vitro conditions. J. Plant Biol. 3 (10): 11-22.
- Hsia C. and Korban S.S. 1996. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*. Plant Cell, Tiss. and Org. Cul. (PCTOC). 44: 1-6.
- Khanfar M.A. Sabri S.S. Zarga M.H. and Zeller K.P. 2003. The chemical constituents of *Capparis spinosa* of Jordanian origin. Nat. Prod. Res. 17: 9-14.
- Kahrizi D. and Kakaei, M. 2010. Effect of 6-Benzylaminopurine, 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Indole-3-Butyric Acid on Micropropagation Stages of *Achillea biebersteinii*. Asian J. OF Che.22 (3): 283-2386.
- Kahrizi, D. Kakaei, M and Sourni J. 2022. Asexual (vegetative) plant embryogenesis.
- Kikha Akhar F. Khadem A. Bagheri A. and Sharifi A. 2012. Optimization of callus cultivation of *Lavandula angustifolia* Mill. Third National Conference on Agricultural Biotechnology of Iran Mashhad.
- Khotaie E. and Karimi F. 2010. Auxin and cytokinin effects on callus and organ production and total alkaloid contents in *Datura innoxia* calli. IJPB. 2 (2): 55-66. (In Persian)
- Lokhande V.H. Nikam T.D. and Penna S. 2010. Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 102: 17-25.
- Murashige T. and Skoog F.A. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15: 473-497.
- Peyvandi M. Kazemi L. and Majd A. 2009. Callogenesis and organogenesis of *Lavandula vera* DC. J Plant Sci Res. 15 (3): 54-67.
- Ravishankar G.A. and Venkataraman L.V. 1998. Rapid multiplication of plants from cultured axillary buds of *mentha piperita*. Philipp. J. Sci. 117(2): 121-129.
- Ramandi A. Qolizadegan Ehsanabad A. and Saifi A. 2023. Optimization of callus formation and cell suspension culture in saffron. Saffron Research Journal. 10 (2): 276-284.
- Razavi S.M. Ghasemian A. Mousavi Samarin S. and Arsh Neshin H. 2016. Callus induction and analysis of active Constituents Essential Oil (*Dracocephalum moldavica* L). Eco-phy. J. of Med. Plant (EJMP). 2: 88-94. (In Persian)
- Sadatnoori S.A. Mortazavian S.M.M. Ghamari Zare A. Omid M. and Hoori M. 2012. Evaluation of callus induction and somatic embryogenesis in black cumin (*Bunium persicum* Boiss.). J. Agri. Biotech. 5 (2): 69-85.
- Seydi S. Negahdar N. Taghizadeh R. Ansari M. and Kaviani B. 2016. Effect of BAP and NAA on micropropagation of *Caladium bicolor* (Aiton) Vent, an Ornamental Plant. J. Ornam. Hort. 6: 59-66.
- Sadeghian tehrani S. Kazemi tabar S.K. Ranjbar G. A. and Golchobian S. 2010. Investigation and selection of suitable culture medium for in vitro reproduction and reproduction of basil plant. National Conference of Medicinal Plants. <http://sid.ir/paper/820711/fa>.
- Sun Y.L. and Hong S.K. 2010. Effects of plant growth regulators and L-glutamic acid on shoot organogenesis in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). Plant Cell Tissue and Org. Cul. 100: 317-328.
- Taha H.S. El-Bahr M.K. and Seif-El-Nasr M.M. 2008. *In vitro* studies on egyptian *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.:1- calli production and direct shootlets regeneration and alkaloids determination. J. Appl. Sci. 4: 1017-1022.
- Zarei A. Salajeghe F. and Kamalizadeh M. 2020. Effect of different plant growth regulators, explant types and light on callogenesis traits of medicinal plant nettle (*Urtica dioica* L.). Plant Prod. 43 (2): 255-266.
- Zebarjadi A.R. Motamedi M. Taravat E. and Ismaili A. 2014. Micropropagation of medicinal purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) using cotyledon and hypocotyl segments. J. Plant Res. 26 (3): 311-319.
- Zinhari Z. Pour seyedi Sh. and Zolala J. 2016. Callus induction and direct shoot regeneration in *Lepidium draba* L. Explants. J. of Agri. Bio. 8 (2): 31-52.
- Ziaei M. Sharifi M. Naghdi Badi H. Tahsili J. and Ghorbani Nohooji M. 2014. A Review on *Ocimum basilicum* L. medicinal plant with a focus on the most important secondary compounds and its medicinal and agronomic properties. J. Med. Plant. 13 (52): 26-40.

The Role of Growth Regulators in Optimization of Callus Production in Medicinal Plant of Red Rubin Basil (*Ocimum basilicum* L.)

* Mehdi Kakaei¹, Fatemeh Hajmoradi², Mohsen Mansori³, Mohamad Ali Ebrahimi⁴

Received: 2022.09.04

Accepted: 2023.05.15

Abstract

Background and purpose: Today, plant tissue culture techniques are used as a valuable tool to create genetic diversity with the aim of breeding plants and also producing virus-free plants. The aim of this research is to present an effective method on callus formation in red rubin basil plant; therefore, in this research, optimization of tissue culture conditions of purple basil plant for callus production, identification of callus induction percentage, growth rate, growth speed and relative water content of callus was conducted through tissue culture. **Materials and Methods:** The callus induction optimization experiment was carried out as a factorial in the form of a completely randomized design with 4 factors, micro samples and three levels of Benzyl adenine (BA), indole acetic acid (IAA) and indole butyric acid (IBA) hormones. **Findings:** The results showed that the highest percentage of callus induction (88%) was related to the culture medium containing 2 mg/L IBA and 2 mg/L BA. The effect of hormonal compounds on the four investigated characteristics of callus generation percentage, growth speed, relative water content and growth rate (dry weight) had a significant effect, which can be used to select the best combination in callus formation and tissue culture optimization, and finally the future goals of the breed. Also, the interaction effect of two explant factors and hormonal compounds only had a very significant effect on the growth rate index ($P \leq 1\%$). **Conclusion:** The quality of the induced calluse indicates the correct selection of explants and suitable hormonal compounds. Therefore, there is a direct relationship between callus production and growth regulators, and also according to the type of plant studied and the amount of hormone present in it, the amount of growth regulators used in callus induction will be different.

Keyword: Callus formation, Explant, Phytohormones, Tissue Culture.

1. Associate Professor Plant Breeding, Department of Agricultural Science, Payame Noor University, Tehran-Iran.
(*Corresponding Author: M.Kakaei@pnu.ac.ir)

2. Assistant Professor biology, Department of Biology, Payame-Noor University, Tehran, Iran

3- Department of Persian Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4. Professor Biotechnology, Department of Agricultural biotechnology, Payame Noor University, Tehran-Iran.



تأثیر روش نگهداری محلول نایل رد بر شدت فلوروسانس در تشخیص لیپیدهای درون سلولی

زهرة نوروزی مطلق^۱، محمود اخوان مهدوی^{۲*}، رضا قشلاقی^۲

چکیده

مقدمه: نایل رد یک رنگ فلورسنت است که برای تعیین میزان لیپید درون سلولی استفاده می‌شود. این روش می‌تواند با دقت بالا مقادیر بسیار کم لیپید درون سلولی را شناسایی کند. اما شدت فلوروسانس نایل رد با زمان تغییر می‌کند و همین مساله استفاده از آن را برای مجموعه آنالیزهایی که در یک فاصله زمانی انجام می‌شوند با مشکل مواجه می‌کند. با توجه به اینکه استفاده از محلول نایل رد تازه برای تمام آنالیزها امکان پذیر نیست و باید از محلول‌های نگهداری شده در فریزر برای آنالیزها استفاده نمود، روش‌هایی برای حفظ شدت فلوروسانس محلول نایل رد باید بکار گرفته شود تا بتوان از این معرف با اطمینان برای آنالیز لیپید استفاده نمود. **روش‌ها:** در این مطالعه محلول در دمای 20°C - نگهداری شد و سپس شدت فلوروسانس محلول نایل رد با توجه به دو عامل زمان و تعداد دفعات ذوب و انجماد بررسی شده است. برای بررسی اثر زمان نگهداری، پس از ۱۵، ۴۵، ۹۰ و ۱۲۰ روز در دمای 20°C - شدت فلوروسانس محلول استوک قرمز نیل اندازه گیری شد. **نتیجه و بحث:** نتایج نشان داد که شدت فلوروسانس محلول نایل رد در اثر انجماد کاهش می‌یابد. اما اگر محلول منجمد شده تا زمان استفاده منجمد باقی بماند و فقط در هنگام مصرف ذوب شود، می‌توان آن را برای ۱۲۰ روز نگهداری کرد و کاهش شدت فلوروسانس کمتر از ۱۰ درصد خواهد بود. اما اگر به دفعات ذوب و منجمد شود (۴ بار یا بیشتر) شدت فلوروسانس تا حدود ۸۰ درصد کاهش می‌یابد که دیگر برای آنالیز مناسب نیست. به دلیل همین تغییرات شدت فلوروسانس، برای هر مجموعه آنالیز غلظت بهینه نایل رد برای رنگ آمیزی لیپید باید تعیین شود. در صورتی که از معرف منجمد شده استفاده شود، برای محدوده غلظت لیپید (روغن زیتون) صفر تا ۴ میکروگرم بر میلی لیتر غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نایل رد مناسب است و لیپید را بدرستی شناسایی و غلظت آن را تعیین می‌کند.

واژه‌های کلیدی: رنگ نایل رد، روغن زیتون، فلورسنت

^۱ دانشجوی دکتری، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^{۲*} دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. * (نویسنده مسئول: mahdavi@um.ac.ir)

مقدمه

نایل رد (Nile red) یک معرف با خاصیت فلورسنت قوی است که برای تخمین و شناسایی میکروپلاستیک‌ها، شناسایی اثر انگشت بر روی سطوح و تولید حسگرهای شیمیایی تشخیص منواکسید کربن استفاده می‌شود (Shim et al., 2017; Wase et al., 2020; Madea et al., 2014; de la Hunty et al., 2016). یکی از شناخته شده ترین کاربردهای نایل رد اندازه‌گیری لیپیدهای خنثی درون سلولی است (Ahmad et al., 2015; Alemán-Nava et al., 2016). لیپیدها خود دارای خاصیت فلوروسانسی نیستند و با اتصال به نایل رد دارای خاصیت فلوروسانسی می‌شوند که با اندازه‌گیری شدت فلوروسانس، غلظت لیپید درون سلولی تعیین می‌شود. اندازه‌گیری لیپید به روش اسپکتروفلورومتری با استفاده از رنگ‌های فلوروسانس روشی ارزان، آسان و سریع است. علاوه بر این، این روش به دلیل حساسیت بالا، بسیار دقیق است (Fam et al., 2018). بنابراین این روش برای پژوهشگرانی که بر روی تولید لیپیدهای درون سلولی تحقیق می‌کنند بسیار جذاب است.

برای تعیین صحیح و دقیق لیپیدهای درون سلولی با روش رنگ آمیزی با نایل رد توجه به عوامل مختلفی مانند زمان و دمای رنگ‌آمیزی، غلظت نایل رد، غلظت لیپید و طول موج‌های تحریک و انتشار اهمیت دارد. زیرا این عوامل بر شدت فلوروسانس و در نتیجه بر تعیین میزان لیپید تأثیر می‌گذارند. اولین قدم در استفاده از این روش، تعیین طول موج تحریک و انتشار با توجه به حلال و نوع لیپید است (Elsey et al., 2007; Greenspan & Fowler, 1985; Chen et al., 2011). طول موج تحریک و انتشار برای حلال‌های قطبی بالاتر از حلال‌های غیر قطبی است (Elsey et al., 2007; Greenspan et al., 1985). همچنین طول موج انتشار لیپیدهای قطبی مانند فسفاتیدیل کولین (۶۳۰ نانومتر) نیز بیش‌تر از طول موج انتشار لیپیدهای خنثی مانند تری گلیسرید (۵۷۰ نانومتر) است (Greenspan & Fowler, 1985; Chen et al., 2011). پس از تعیین طول موج تحریک و انتشار مناسب، انتخاب دما و مدت زمان رنگ آمیزی لیپید توسط نایل رد اهمیت دارد. دمای مناسب برای رنگ‌آمیزی لیپیدهای درون سلولی میکروارگانسیم‌ها، به نوع میکروارگانسیم بستگی دارد. به عنوان مثال دمای مناسب برای ریز جلبک‌های *Chlorella ellipsoidea* و *Chlorococcum infusionum* به ترتیب °C ۴۰-۵۰ و °C ۳۰-۴۰ است (Satpati & Pal, 2015). به طور کلی شدت فلوروسانس در دماهای زیر °C ۲۵ و بالای °C ۴۰ کاهش می‌یابد (Pal, 2015; Satpati & Pal, 2015). به همین علت اصولاً دما بین °C ۲۵ تا °C ۴۰ انتخاب می‌شود. زمان رنگ آمیزی نیز بین ۵ تا ۳۰ دقیقه در نظر گرفته می‌شود که مقدار دقیق آن به نوع حلال و سرعت نفوذ نایل رد به داخل سلول وابسته است. نفوذ نایل رد به درون سلول بستگی به نوع سلول و ضخامت دیواره سلولی دارد (Wu et al., 2014; Wong et al., 2014). به منظور دستیابی به نفوذ بیش‌تر می‌توان از حلالی استفاده کرد که نفوذ نایل رد را به درون سلول‌ها افزایش دهد (Doan & Obbard, 2015; Natunen et al., 2011). مشاهده شده است که هنگامی که از دی متیل سولفوکسید (DMSO) و گلیسرول به عنوان حلال استفاده شده است به ترتیب ۱۰ و ۵ دقیقه زمان برای نفوذ نایل رد به داخل سلول کافی بوده است (Martinez & ...)

(Henary, 2016). اما مهم‌تر از دما و زمان رنگ آمیزی و نوع حلال، غلظت نایل رد و لیپید است. اگر چه افزایش غلظت نایل رد باعث افزایش شدت فلوروسانس می‌شود. اما افزایش بیش از حد آن نه تنها باعث افزایش شدت فلوروسانس نمی‌شود (Huang *et al.*, 1987; Bertozzini *et al.*, 2011; Cooksey *et al.*, 2009; *al.*, 2009) بلکه در برخی موارد باعث کاهش آن نیز می‌گردد (Chen *et al.*, 2004 & Genicot *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2004).

برای تعیین صحیح لیپیدهای درون سلولی به روش فلوروسانس، تنها بهینه سازی موارد ذکر شده (موثر بر شدت فلوروسانس) کافی نیست. مهم‌ترین عامل در اندازه‌گیری لیپید به روش فلوروسانس با کمک معرف نایل رد، کیفیت معرف مورد استفاده است. این نکته‌ای است که بسیار مهم است و کم‌تر به آن پرداخته شده است. با توجه به توضیحات شرکت سازنده، کیفیت نایل رد در طول زمان تغییر می‌کند. در نتیجه، نگهداری نایل رد در دمای مناسب و مطالعه تغییرات خواص آن در طول زمان و تأثیر آن بر اندازه‌گیری لیپید بسیار مهم است. در برخی گزارش‌ها، محلول استوک نایل رد روزانه تهیه شده است (Orr & Rehmann, 2015; Liang *et al.*, 2020). اما، به دلیل قیمت بالای آن، محلول استوک نمی‌تواند به صورت روزانه توسط همه افراد تهیه شود. صرف نظر از قیمت بالای این ماده، چون نایل رد باید در دمای 2°C تا 8°C نگهداری شود، حمل و نقل آن در فواصل طولانی دشوار است. بنابراین برای رسیدن به نتایج صحیح، باید راهی برای نگهداری صحیح ماده یافت به طوری که در مدت زمان نگهداری خواص ماده دچار کم‌ترین تغییرات ممکن شود. بسیاری از مطالعات گذشته به روش نگهداری نایل رد اشاره نکردند. برخی از محققان با نگهداری محلول استوک نایل رد در دمای اتاق، توانستند تنها یک هفته پس از تهیه محلول استوک از آن استفاده کنند (Genicot *et al.*, 2005; Carman *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 2017) که دوره نسبتاً کوتاهی است. البته با ذخیره استوک در دمای 4°C ، این مدت تا ۴۵ روز افزایش یافت (Fernandes *et al.*, 2013; Daban *et al.*, 1991). در مطالعه حاضر، نایل رد در فریزر 20°C نگهداری شد اما با روشی که تغییر در کیفیت و شدت فلوروسانس به حداقل ممکن برسد. برای این منظور، شدت فلوروسانس محلول استوک نایل رد در دو حالت اندازه‌گیری شد. حالتی که محلول استوک یک بار منجمد و سپس ذوب شد و حالتی که انجماد و ذوب شدن محلول استوک بیش از یک بار انجام شد. علاوه بر این، اثر زمان بر شدت فلوروسانس نیز بررسی شد. همچنین غلظت مناسب نایل رد تازه و منجمد شده برای اندازه‌گیری لیپید تعیین شد. این در حالی است که بسیاری از مطالعات قبلی به تازه یا منجمد بودن نایل رد اشاره نکردند و اثر آن بر نتایج را در نظر نگرفتند.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

متانول و دی متیل سولفوکساید (DMSO) از شرکت مرک و محلول نایل رد (با کد 19123) از شرکت سیگما خریداری شد. بقیه مواد لازم از فروشندگان محلی تهیه گردید.

آماده سازی محلول نایل رد

محلول استوک نایل رد با حل کردن ۱ میلی گرم نایل رد در ۱۰ میلی لیتر DMSO تهیه شد. سپس در فریزر و در دمای 20°C - نگهداری شد. برای هر آزمایش، ۷۵ میکرولیتر محلول استوک به ۴۲۵ میکرولیتر متانول اضافه شد. سپس ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرولیتر از این محلول برداشته شد و به آن‌ها ۳ میلی لیتر متانول اضافه شد. به طوری که غلظت نهایی نایل رد بین ۰/۵ تا ۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر در متانول شد. پس از ۲۵ دقیقه در دمای اتاق، شدت فلورسانس با اسپکتروفلورومتر (PerkinElmer, LS-45) اندازه‌گیری شد. با توجه به اسکن اولیه، طول موج‌های تحریک و انتشار به ترتیب ۴۷۰ نانومتر و ۵۱۵ نانومتر انتخاب شدند.

اندازه‌گیری شدت فلورسانس نایل رد

برای بررسی تغییرات شدت فلورسانس نایل رد دو عامل بررسی شد. یکی مدت زمانی که محلول استوک در دمای 20°C - است و دیگری تعداد دفعاتی که محلول استوک منجمد شده و سپس برای انجام آزمایشات ذوب می‌شود. در ابتدا برای بررسی تعداد دفعاتی که محلول منجمد و ذوب می‌شود از یک محلول استوک استفاده شد. به طوری که محلول استوک ذوب شد و سپس برای استفاده در آزمایشات بعدی دوباره در دمای 20°C - قرار گرفت و منجمد شد. این کار ۴ بار تکرار شد. در آزمایشات دیگر، برای بررسی اثر گذشت زمان بر شدت فلورسانس، از محلول استوکی استفاده شده که فقط یکبار ذوب شده بود. برای این منظور، محلول استوک تازه به بخش‌های کوچکی (میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتر) تقسیم شد و هر روز از یکی از میکروتیوب‌ها استفاده شد. شدت فلورسانس محلول استوک تازه و محلولی که ۱۵، ۴۵، ۹۰ و ۱۲۰ روز در دمای 20°C - نگهداری شده بود اندازه‌گیری شد.

رنگ آمیزی لیپید با نایل رد

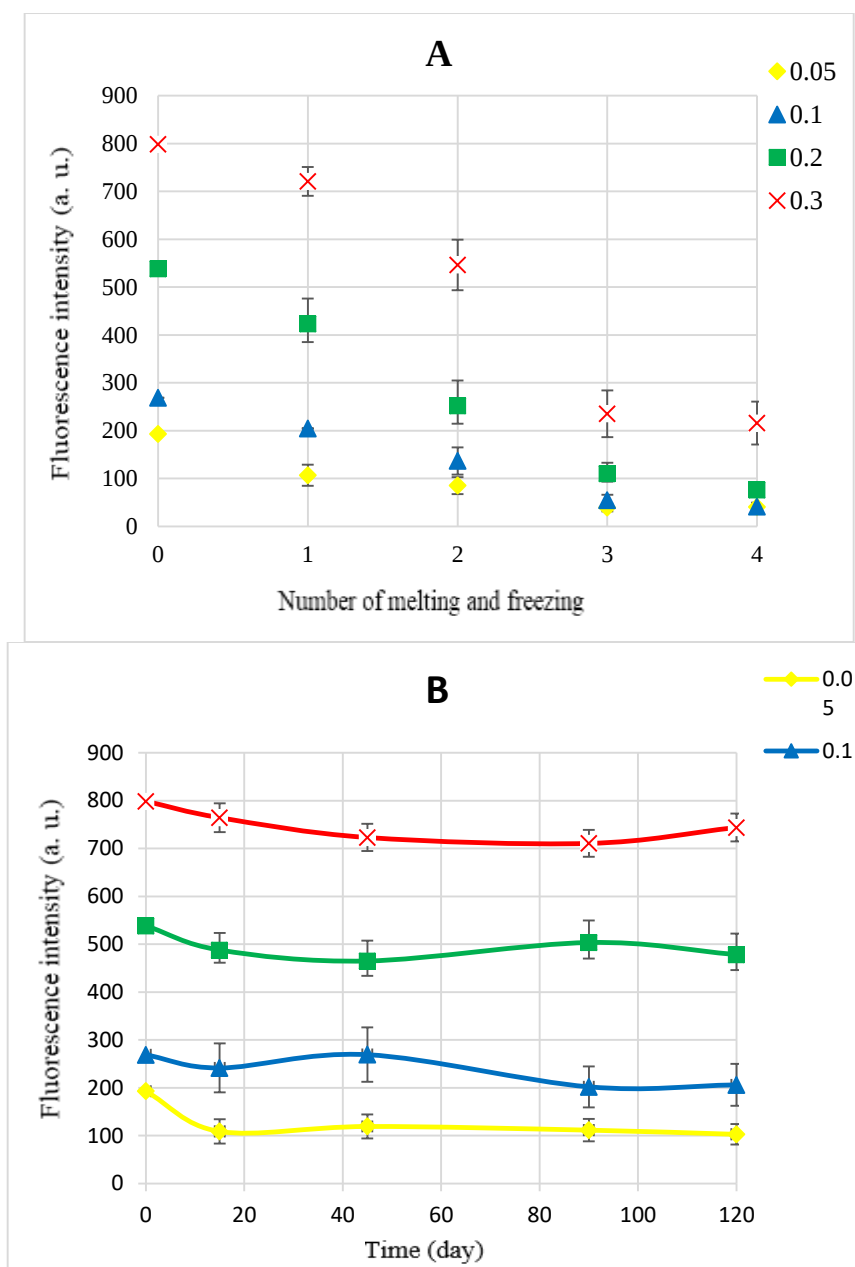
برای بررسی تاثیر تغییرات شدت فلورسانس نایل رد بر اندازه‌گیری لیپید، روغن زیتون به عنوان روغن مدل (لیپید درون سلولی) استفاده شد. برای رنگ آمیزی لیپیدها، ۷۵ میکرولیتر محلول استوک نایل رد به ۴۲۵ میکرولیتر متانول (محلول A) اضافه شد. سپس، با رنگ‌آمیزی روغن زیتون با غلظت‌های مختلف نایل رد، شدت فلورسانس بررسی شد. برای این منظور

غلظت‌های ۰، ۶۰ و ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از روغن زیتون در کلروفرم تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظتی از نمونه‌های روغن با ۵، ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکرولیتر محلول A ترکیب و در نهایت به تمام نمونه‌ها ۳ میلی لیتر متانول اضافه شد. بنابراین غلظت نهایی روغن زیتون و نایل رد به ترتیب بین ۰، ۲ و ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۰/۰۵ تا ۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر در متانول بود. نمونه‌ها به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شدند. این آزمایش دو بار انجام شد. در آزمایش اول از محلول استوک نایل رد تازه استفاده شد. در مرحله دوم، آزمایش پس از ۱۵ روز نگهداری محلول استوک نایل رد در دمای °C ۲۰- تکرار شد.

نتایج و بحث

اثر تعداد دفعات ذوب و انجماد بر شدت فلوروسانس محلول نایل رد

اثر ذوب و انجماد متوالی بر شدت فلوروسانس نایل رد در شکل ۱-الف نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که شدت فلوروسانس با افزایش تعداد دفعات ذوب و انجماد کاهش می‌یابد و این رفتار مستقل از غلظت نایل رد است. در غلظت ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نایل رد، محلول تازه دارای شدت فلوروسانس ۱۹۳ است که با یک بار ذوب به ۱۲۳ می‌رسد و با چهار بار ذوب و انجماد حدود ۷۶ درصد افت کرده و به ۴۷ می‌رسد. در غلظت‌های بالاتر از نایل رد نیز رفتار مشابهی دیده می‌شود به‌طوری‌که با شش برابر کردن غلظت نایل رد (غلظت ۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، پس از ۴ بار ذوب و انجماد شدت فلوروسانس ۶۹ درصد افت کرده و به مقدار ۲۴۸ می‌رسد، در حالی‌که محلول تازه دارای بیش‌ترین شدت فلوروسانس ۷۹۸ است. در غلظت‌های دیگر مورد مطالعه نیز میزان افت شدت فلوروسانس بیش از ۸۰ درصد است. در مطالعه‌ای مشابه، محلول استوک نایل رد در دمای °C ۲۰- ذخیره شد و توصیه شد که برای حفظ شدت فلوروسانس محلول باید از ذوب و انجماد متوالی آن اجتناب کرد (Zalogin & Pick, 2014).



شکل ۱- تغییرات در شدت فلورسانس برای ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر نایل رد. (الف) اثر تعداد دفعات ذوب و انجماد بر شدت فلورسانس محلول استوک نایل رد و (ب) اثر زمان نگهداری محلول نایل رد بر شدت فلورسانس آن.

Figure 1. Changes in fluorescence intensity for 0.05, 0.1, 0.2 and 0.3 micrograms per milliliter of Nile red. (A) Effect of the number of melting and freezing times on the fluorescence intensity of the Nile red stock solution and (B) Effect of storage time of the Nile red solution on its fluorescence intensity

اثر زمان نگهداری بر شدت فلورسانس محلول نایل رد

شکل ۱-ب اثر زمان نگهداری بر شدت فلورسانس محلول نایل رد را نشان می‌دهد. حداکثر شدت فلورسانس مربوط به محلول استوک تازه تهیه شده است. نتایج نشان می‌دهد که با نگهداری محلول نایل رد در حالت انجماد شدت فلورسانس در صورتی که فقط یک بار استفاده شود افت قابل توجهی نمی‌کند و تا ۱۲۰ روز (حداکثر زمانی که در این مطالعه

بررسی شده است) در حالت انجماد قابل نگهداری است. تفاوت های موجود بین شدت فلوروسانس نمونه ها در غلظت های بالا از نایل رد، به طور متوسط کمتر از ۱۰ درصد است به طوری که در غلظت ۰/۳ میکروگرم بر میلی لیتر، شدت فلوروسانس بعد از ۱۵ روز نگهداری در فریزر ۱/۵ درصد، بعد از ۴۵ روز ۶/۹ درصد، بعد از ۹۰ روز ۸/۵ درصد، و بعد از ۱۲۰ روز ۴/۲ درصد افت کرد. زمان های نگهداری پیوسته بود و نمونه یک بار و فقط در هنگام استفاده ذوب شد. در غلظت های کمتر از نایل رد، افت شدت فلوروسانس پس از ذوب شدن (مستقل از زمان نگهداری) بیشتر از ۱۰ درصد بود به طوری که در غلظت ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نایل رد، شدت فلوروسانس در زمان های نگهداری متفاوت (بین ۱۵ تا ۱۲۰ روز) بطور متوسط حدود ۳۴ درصد افت کرد. این مقادیر نشان می دهد که گرچه شدت فلوروسانس معرف نایل رد منجمد شده نسبت به تازه کمتر است، اما پس از انجماد می توان آن را برای مدت طولانی بدون کاهش قابل ملاحظه در شدت فلوروسانس نگهداری نمود به شرطی که فقط در همان زمان استفاده ذوب شود و تا قبل از آن از حالت انجماد خارج نشود.

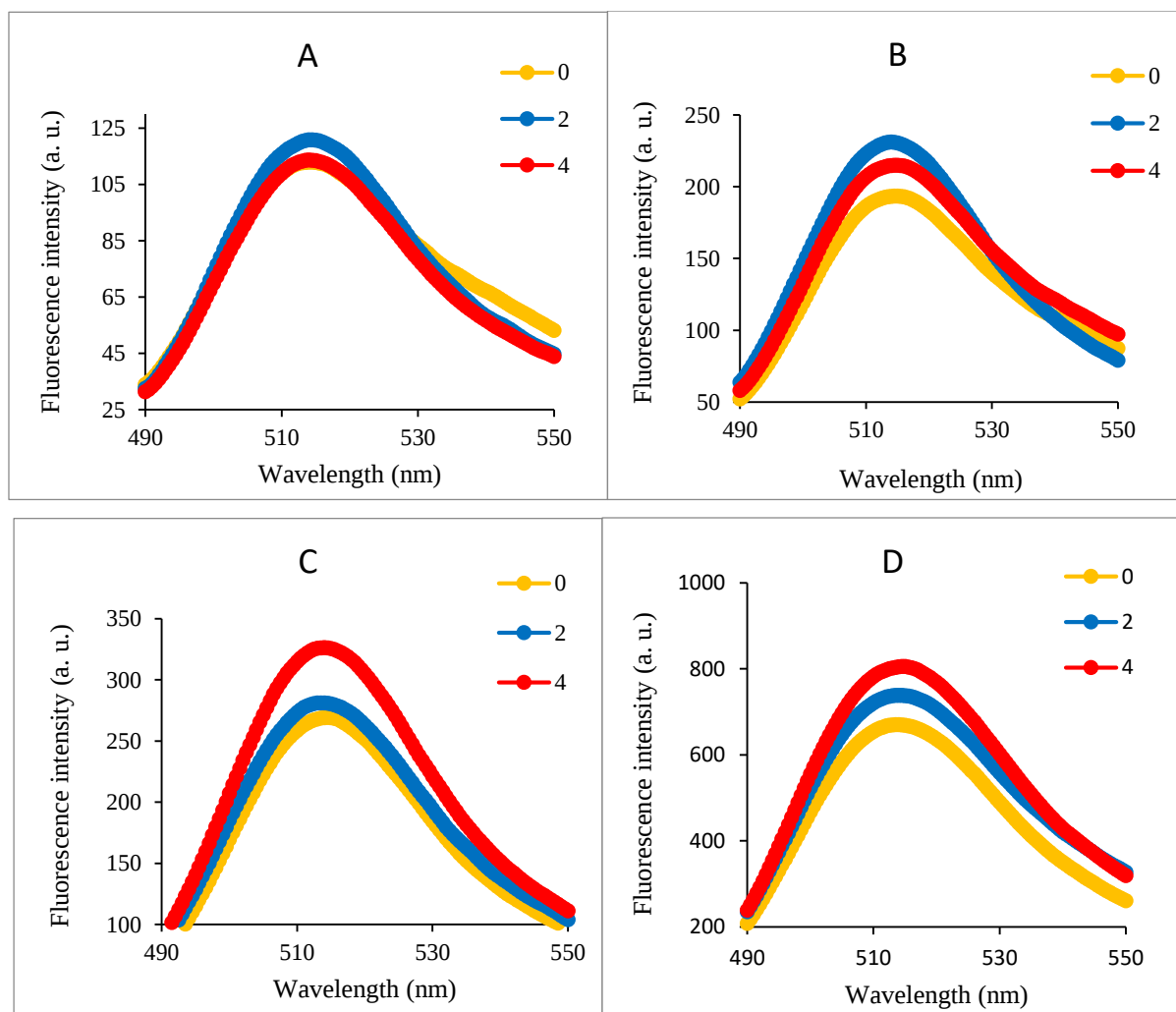
در بررسی های مشابه، با نگهداری محلول استوک نایل رد در دمای اتاق توانستند تنها یک هفته پس از تهیه محلول استوک از آن استفاده کنند (Genicot *et al.*, 2005; Carman *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 2017) که زمان کوتاهی است. البته با نگهداری محلول استوک در دمای ۴ °C-، این مدت تا ۴۵ روز افزایش یافت (Fernandes *et al.*, 2013; Daban *et al.*, 1991). قابل ذکر است که برخی از محققان محلول نایل رد را در دمای ۲۰ °C- قرار دادند اما مدت زمان نگهداری آن را ذکر نکردند (Zalogin & Pick, 2014; Sutter *et al.*, 2007; Rumin *et al.*, 2015). بر اساس نتایج بدست آمده، با اجتناب از ذوب و انجماد مکرر محلول استوک، می توان آن را تا حدود چهار ماه در دمای انجماد ۲۰ °C- نگهداری کرد. نگهداری مناسب محلول نایل رد، ضمن حفظ کیفیت فلوروسانس در آنالیزهای مربوط، باعث جلوگیری از پرداخت هزینه اضافی برای خرید مجدد این معرف می شود.

غلظت بهینه ی نایل رد در آنالیز لیپید

از آنجایی که شدت فلوروسانس محلول تازه و منجمد شده نایل رد یکسان نیست، برای رنگ آمیزی لیپید با نایل رد، باید به تازه یا منجمد بودن آن توجه نمود و در هر حالت غلظت بهینه آن را تعیین نمود. شکل ۲ شدت فلوروسانس نمونه های روغن زیتون (لیپید) با غلظت های مختلف رنگ آمیزی شده با معرف نایل رد تازه در غلظت های مختلف را نشان می دهد. همان طور که شکل نشان می دهد در غلظت های کم از نایل رد (شکل های ۲-الف و ۲-ب) شدت فلوروسانس نایل رد در طول موج انتشار ۵۱۵ نانومتر توانایی تشخیص غلظت لیپید را ندارد به طوری که شدت فلوروسانس نمونه با غلظت لیپید ۴ میکروگرم بر میلی لیتر کمتر از نمونه با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر و یا حتی نمونه شاهد (غلظت صفر از لیپید) است. هنگامی که غلظت معرف نایل رد در نمونه لیپید افزایش داده می شود (شکل های ۲-ج و ۲-د) روند تغییر شدت فلوروسانس منطبق بر

تغییر غلظت لیپید می‌شود به‌طوری‌که بیش‌ترین شدت فلورسانس مربوط به نمونه با بیش‌ترین غلظت لیپید است و در غلظت ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نایل رد رابطه خطی $F_1 = 34.25 \times C + 668.17$ ($R^2=1$) بین شدت فلورسانس و غلظت لیپید بدست می‌آید که در آن F_1 شدت فلورسانس اندازه گیری شده و C غلظت لیپید بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر است. نتایج نشان می‌دهد که در غلظت‌های نایل رد کمتر از ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر رابطه خطی بین غلظت لیپید و شدت فلورسانس برقرار نیست. در نتیجه غلظت ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از معرف نایل تازه غلظت بهینه برای آشکار سازی غلظت لیپید درون سلولی در محدوده صفر تا ۴ میکروگرم بر میلی لیتر است.

در پژوهشی مشابه، ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر از معرف نایل رد تازه به عنوان غلظت مناسب برای ۲/۵ تا ۵ میکروگرم بر میلی لیتر محلول تریولئین (Triolein) انتخاب شد (Bertozzini et al., 2011). در پژوهش دیگری، از میان دو غلظت ۰/۱ و ۰/۰۱ میکروگرم در میلی لیتر نایل رد، غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان غلظت مناسب انتخاب شد. زیرا در غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر در مقایسه با غلظت ۰/۰۱ میکروگرم در میلی لیتر، تفاوت بین شدت فلوروسانس برای غلظت‌های مختلف لیپید واضح‌تر بود (Shi et al., 2016). در یک مطالعه غلظت بهینه نایل رد طوری انتخاب شد که رابطه خطی بین غلظت لیپید و شدت فلورسانس بدست آمد (Gao et al., 2014). در بسیاری از پژوهش‌های گذشته به این نکته اشاره شده است که غلظت بهینه نایل رد باید طوری انتخاب شود که شدت فلورسانس نمونه شاهد (نمونه بدون لیپید) کم‌تر از نمونه‌های حاوی لیپید باشد (Cooksey et al., 1987; Johnson et al., 2017).



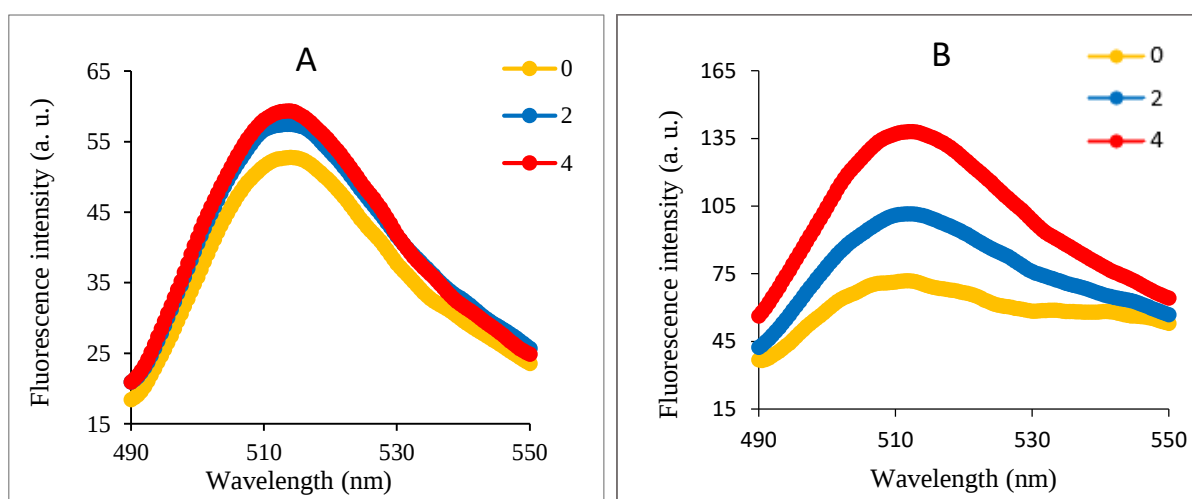
شکل ۲- شدت فلوروسانس ۰، ۲ و ۴ میکروگرم بر میلی لیتر روغن زیتون رنگ آمیزی شده با محلول تازه تهیه شده ی نایل رد. در شکل A، B، C و D غلظت نهایی نایل رد به ترتیب ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بود.

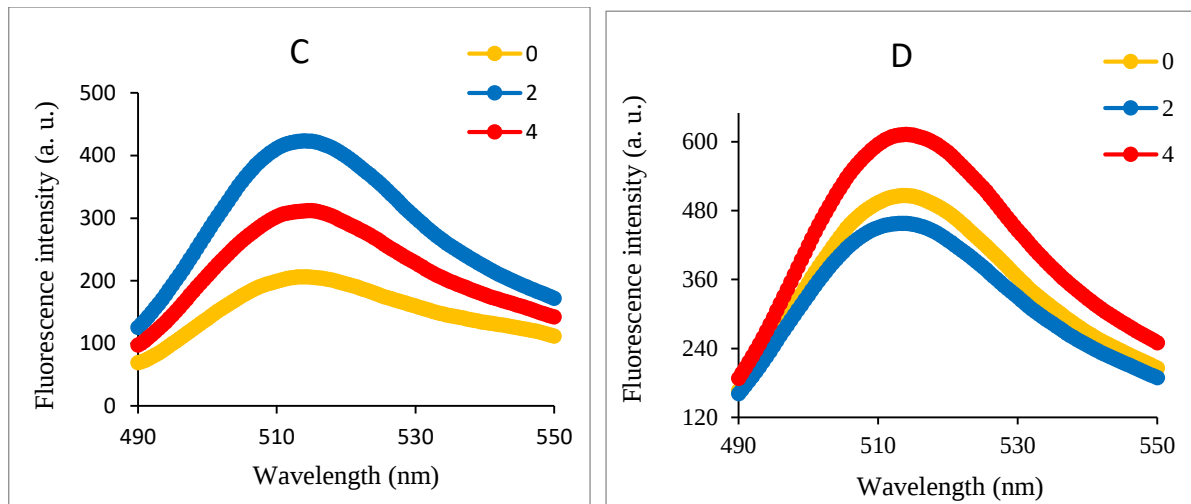
Figure 2. The fluorescence intensity of fresh Nile red with 0, 2, and 4 µg/ml of olive oil. Nile red concentration of A, B, C, and D are 0.025, 0.05, 0.1 and 0.25 µg/ml, respectively.

اما استفاده از محلول تازه نایل رد برای آنالیز لیپید درون سلولی به دلایل اقتصادی و تکنیکی همیشه امکان پذیر نیست. قیمت بالای این معرف و هم چنین مقدار مورد نیاز بسیار ناچیز آن برای هر آنالیز استفاده از آن را به صورت تازه غیر عملی می کند. به همین دلیل در بیش تر آنالیزها از معرف منجمد شده استفاده می شود. به دلیل افت شدت فلوروسانس معرف منجمد شده نسبت به معرف تازه، غلظت بهینه معرف منجمد شده برای هر آنالیز لیپید درون سلولی باید تعیین شود. البته باید توجه داشت که بر اساس نتایج بدست آمده (بخش ۳-۲)، در صورتی که معرف نایل رد منجمد شده قبلاً "ذوب نشده باشد نگهداری طولانی مدت آن در حالت انجماد تغییر چندانی در شدت فلوروسانس آن ایجاد نمی کند و با اطمینان می توان آن را برای آنالیز استفاده کرد.

شکل ۳ شدت فلورسانس نمونه‌های روغن زیتون (لیپید) با غلظت‌های مختلف رنگ آمیزی شده با معرف نایل رد منجمد شده در غلظت‌های مختلف را نشان می‌دهد. در غلظت ۰/۰۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نایل رد (شکل ۳-الف)، معرف به دلیل غلظت پایین توانایی شناسایی لیپید و تشخیص غلظت‌های آن‌ها از یکدیگر در طول موج انتشار ۵۱۵ نانومتر را ندارد. با افزایش غلظت معرف (شکل ۳-ب)، رابطه خطی $F_I = 10.091 \times C + 71.405$ ($R^2 = 0.98$) بین غلظت لیپید و شدت فلورسانس نمونه بدست می‌آید که نشان دهنده مناسب بودن غلظت معرف نایل رد برای آنالیز لیپید است. با افزایش غلظت لیپید (شکل ۳-ج و ۳-د) پاسخ معناداری بدست نمی‌آید و تداخل بین شدت فلورسانس نمونه شاهد و نمونه‌های محتوی لیپید مشاهده شد. این تداخل در مطالعات دیگر هم مشاهده شده است و توصیه شده است برای اجتناب از این تداخل بهتر است از غلظت کم نایل رد استفاده شود (Bertozzini *et al.*, 2011).

نتایج نشان داد که در هنگام استفاده از نایل رد به صورت تازه به غلظت‌های بالاتر نیاز است و این درحالی است که علیرغم انتظار در استفاده از نایل رد منجمد شده، که دارای شدت فلورسانس کمتری است، به غلظت‌های پایین‌تر نیاز است. علت این مشاهده می‌تواند این باشد که هنگامی که نایل رد به صورت تازه استفاده می‌شود غلظت کم آن باعث می‌شود که شدت فلورسانس نمونه حاوی لیپید کم باشد و با فلورسانس نمونه شاهد که شدت فلورسانس بالا دارد تداخل کند و نتیجه معکوس شود. در غلظت‌های بالا به دلیل افزایش شدت فلورسانس نمونه‌های حاوی لیپید تداخل رفع شده و اندازه‌گیری‌ها روند منطقی پیدا می‌کند. اما هنگامی که از معرف نایل رد منجمد شده استفاده می‌شود، به دلیل پایین بودن میزان شدت فلورسانس، تداخل شدت فلورسانس نمونه شاهد با نمونه‌های حاوی لیپید رخ نمی‌دهد و لذا نیازی به غلظت‌های بالا نیست و در همان غلظت‌های کم روند منطقی نتایج آنالیز مشاهده می‌شود.





شکل ۳- شدت فلوروسانس ۰.۰۲ و ۰.۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر روغن زیتون رنگ آمیزی شده با محلول منجمد شدهی نایل رد. در شکل A، B، C و D غلظت نهایی نایل رد به ترتیب ۰.۰۲۵، ۰.۰۵، ۰.۱ و ۰.۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

Figure 3. The fluorescence intensity of frozen Nile red with 0, 2, and 4 µg/ml of olive oil. Nile red concentration of A, B, C, and D are 0.025, 0.05, 0.1 and 0.25 µg/ml, respectively.

به طور کلی در پژوهش‌های مختلف، غلظت بهینه نایل رد متفاوت معرفی شده است. برخی از پژوهشگران معتقدند که، در هر مطالعه باید با توجه به نوع لیپید و سلول‌ها و تجهیزات مقدار بهینه تعیین شود (Wu *et al.*, 2014; Priyanka *et al.*, 2013; Kou *et al.*, 2020). حتی برخی از محققان معتقدند که اندازه‌گیری یک نمونه در دو روز مختلف (به علت احتمال تغییر در شدت فلوروسانس نایل رد) ممکن است نتایج متفاوتی داشته باشد (Hicks *et al.*, 2019). بنابراین در هر آنالیز باید غلظت بهینه نایل رد مشخص شود (Montalbo-Lombay *et al.*, 2014; Hicks *et al.*, 2019; Wase *et al.*, 2015). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که علاوه بر نوع لیپید و تجهیزات، روش نگهداری نایل رد نیز می‌تواند بر نتایج اثر بگذارد.

نتیجه‌گیری

نایل رد به عنوان یک معرف دارای خاصیت فلوروسانس در شناسایی لیپیدهای درون سلولی کاربرد وسیعی دارد. اما تغییرات شدت فلوروسانس این معرف با زمان و تأثیر شرایط نگهداری روی شدت فلوروسانس کار با این معرف را مشکل می‌کند. نتایج نشان داد که استفاده از معرف تازه به دلیل شدت فلوروسانس بالاتر بهتر است. اما به دلایل اقتصادی امکان استفاده تازه از این معرف همیشه فراهم نیست. در صورتی که معرف منجمد شده فقط برای یک بار استفاده ذوب شود می‌توان برای مدت طولانی آن را در فریزر نگهداری کرد بدون این‌که شدت فلوروسانس آن کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته باشد. ذوب و انجماد متوالی معرف شدت فلوروسانس را به شدت کم می‌کند و برای آنالیز لیپید مناسب نیست.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر فاضلی، مسئول شرکت زیست آزما به علت راهنمایی ایشان در خرید نایل رد تشکر می‌کنم.

عدم تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که در رابطه با انتشار مقاله‌ی ارائه شده هیچگونه تعارض منافع وجود ندارد.

منابع

- Ahmad, I., Sharma, A. K., Daniell, H., & Kumar, S. (2015). Altered lipid composition and enhanced lipid production in green microalga by introduction of brassica diacylglycerol acyltransferase 2. *Plant biotechnology journal*, 13(4), 540-550.
- Alemán-Nava, G. S., Cuellar-Bermudez, S. P., Cuaresma, M., Bosma, R., Muylaert, K., Ritmann, B. E., & Parra, R. (2016). How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. *Journal of microbiological methods*, 128, 74-79.
- Bertozzini, E., Galluzzi, L., Penna, A., & Magnani, M. (2011). Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. *Journal of microbiological methods*, 87(1), 17-23.
- Carman, K. R., Thistle, D., Ertman, S. C., & Foy, M. (1991). Nile red as a probe for lipid-storage products in benthic copepods. *Marine Ecology Progress Series*, 307-311.
- Chen, W., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2011). Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresource technology*, 102(1), 135-141.
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of microbiological methods*, 77(1), 41-47.
- Cooksey, K. E., Guckert, J. B., Williams, S. A., & Callis, P. R. (1987). Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *Journal of microbiological methods*, 6(6), 333-345.
- Daban, J.-R., Bartolomé, S., & Samsó, M. (1991). Use of the hydrophobic probe Nile red for the fluorescent staining of protein bands in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 199(2), 169-174.
- de la Hunty, M., Spindler, X., Chadwick, S., Lennard, C., & Roux, C. (2014). Synthesis and application of an aqueous nile red microemulsion for the development of fingerprints on porous surfaces. *Forensic science international*, 244, e48-e55.
- Doan, T.-T. Y., & Obbard, J. P. (2011). Improved Nile red staining of *Nannochloropsis* sp. *Journal of applied phycology*, 23(5), 895-901.
- Else, D., Jameson, D., Raleigh, B., & Cooney, M. J. (2007). Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of microbiological methods*, 68(3), 639-642.
- Fam, T. K., Klymchenko, A. S., & Collot, M. (2018). Recent advances in fluorescent probes for lipid droplets. *Materials*, 11(9), 1768.

- Fernandes, B., Teixeira, J., Dragone, G., Vicente, A. A., Kawano, S., Bišová, K., Příbyl, P., Zachleder, V., & Vítová, M. (2013). Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresource technology*, 144, 268-274.
- Gao, Y., Chen, G., & Weselake, R. J. (2014). A rapid Nile red fluorescence-based method for triacylglycerol content in microspore-derived cell suspension cultures of *Brassica napus*. *Lipids*, 49(11), 1161-1168.
- Genicot, G., Leroy, J., Van Soom, A., & Donnay, I. (2005). The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology*, 63(4), 1181-1194.
- Greenspan, P., and Fowler, S. D. (1985). Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *Journal of lipid research*, 26(7), 781-789.
- Greenspan, P., Mayer, E. P., & Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of cell biology*, 100(3), 965-973.
- Hicks, R. H., Chuck, C. J., Scott, R. J., Leak, D. J., & Henk, D. A. (2019). Comparison of Nile Red and Cell Size Analysis for High-Throughput Lipid Estimation Within Oleaginous Yeast. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(11), 1800355.
- Huang, G.-H., Chen, G., & Chen, F. (2009). Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence. *Biomass and bioenergy*, 33(10), 1386-1392.
- Johnson, Z. I., Bidigare, R. R., Blinbry, S. K., Brown, S. L., Cullen, J. J., Loftus, S. E., Redalje, D. G., Swink, C., & Van Mooy, B. A. (2017). Screening for lipids from marine microalgae using Nile red. *Consequences of microbial interactions with hydrocarbons, oils, and lipids: production of fuels and chemicals, handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer International Publishing AG. USA, 88-96.
- Kimura, K., Yamaoka, M., & Kamisaka, Y. (2004). Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of microbiological methods*, 56(3), 331-338.
- Kou, Z., Bei, S., Sun, J., & Pan, J. (2013). Fluorescent measurement of lipid content in the model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of applied phycology*, 25(6), 1633-1641.
- Liang, Y., Sun, Y., Fu, X., Lin, Y., Meng, Z., Meng, Y., Niu, J., Lai, Y., & Sun, Y. (2020). The effect of π -conjugation on the self-assembly of micelles and controlled cargo release. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 48(1), 525-532.
- Madea, D., Martínek, M., Muchova, L., Vana, J., Vitek, L., & Klán, P. (2020). Structural modifications of Nile red carbon monoxide fluorescent probe: sensing mechanism and applications. *The Journal of organic chemistry*, 85(5), 3473-3489.
- Martinez, V., & Henary, M. (2016). Nile red and Nile blue: applications and syntheses of structural analogues. *Chemistry—A European Journal*, 22(39), 13764-13782.
- Montalbo-Lomboy, M., Kantekin, M. N., & Wang, T. (2014). Lipid Estimation of Surfactant-Extracted Microalgae Oil Using Nile Red. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(4), 665-680.
- Natunen, K., Seppälä, J., Schwenk, D., Rischer, H., Spilling, K., & Tamminen, T. (2015). Nile Red staining of phytoplankton neutral lipids: species-specific fluorescence kinetics in various solvents. *Journal of applied phycology*, 27(3), 1161-1168.

- Orr, V., & Rehmann, L. (2015). Improvement of the Nile Red fluorescence assay for determination of total lipid content in microalgae independent of chlorophyll content. *Journal of applied phycology*, 27(6), 2181-2189.
- Priyanka, P., Kinsella, G. K., Hennehan, G. T., & Ryan, B. (2020). Nile Red assay development for the estimation of neutral lipids in *Chlorella emersonii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*.
- Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J.-P., & Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for biofuels*, 8(1), 1-16.
- Satpati, G. G., & Pal, R. (2015). Rapid detection of neutral lipid in green microalgae by flow cytometry in combination with Nile red staining—an improved technique. *Annals of Microbiology*, 65(2), 937-949.
- Shi, S., Ji, H., Siewers, V., & Nielsen, J. (2016). Improved production of fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* through screening a cDNA library from the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS yeast research*, 16(1), fov108.
- Shim, W. J., Song, Y. K., Hong, S. H., & Jang, M. (2016). Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. *Marine pollution bulletin*, 113(1-2), 469-476.
- Sutter, M., Oliveira, S., Sanders, N. N., Lucas, B., van Hoek, A., Hink, M. A., Visser, A. J., De Smedt, S. C., Hennink, W. E., & Jiskoot, W. (2007). Sensitive spectroscopic detection of large and denatured protein aggregates in solution by use of the fluorescent dye Nile red. *Journal of fluorescence*, 17(2), 181-192.
- Wase, N., Tu, B., Allen, J. W., Black, P. N., & DiRusso, C. C. (2017). Identification and metabolite profiling of chemical activators of lipid accumulation in green algae. *Plant physiology*, 174(4), 2146-2165.
- Wase, N., Tu, B., Black, P. N., & DiRusso, C. C. (2015). Phenotypic screening identifies Brefeldin A/Ascotoxin as an inducer of lipid storage in the algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*, 11, 74-84.
- Wong, D. M., Nguyen, T. T., & Franz, A. K. (2014). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) enhances intracellular lipid staining with Nile red in microalgae *Tetraselmis suecica*. *Algal research*, 5, 158-163.
- Wu, S., Zhang, B., Huang, A., Huan, L., He, L., Lin, A., Niu, J., & Wang, G. (2014). Detection of intracellular neutral lipid content in the marine microalgae *Prorocentrum micans* and *Phaeodactylum tricornutum* using Nile red and BODIPY 505/515. *Journal of applied phycology*, 26(4), 1659-1668.
- Zalogin, T. R., & Pick, U. (2014). Azide improves triglyceride yield in microalgae. *Algal Research*, 3, 8-16.

The effect of the storage method of Nile red solution on the fluorescence intensity in the detection of intracellular lipids

Zohreh Noruzi Motlagh¹, Mahmood A. Mahdavi^{2*}, Reza Gheshlaghi³

Received: 2022.10.02

Accepted: 2022.05.21

Abstract:

Introduction: Nile red is a fluorescent dye that is used to detect and measure intracellular lipids. This method can detect very low amounts of intracellular lipid with high accuracy. However, the intensity of Nile red fluorescence changes over time, and this makes it difficult to use for analyzes that are performed in a time intervals. Hence, it is very important to understand the changes of Nile red florescent intensity at frozen state and its effect on lipid detection results.

Methods: For study of the number of melting and freezing times effect, the stock solution was melted and then frozen for a later use. For study of the effect of storage time, fluorescence intensity of Nile red stock solution was measured after 15, 45, 90 and 120 days at -20 °C.

Result and discussions: In this study, by storing Nile red at -20 °C, the fluorescence intensity decreased. However, if the solution remains frozen until use, the decrease in fluorescence intensity will be less than 10%. The results show that in this condition, storage time could be prolonged to 120 days. If the stock solution is repeatedly melted and frozen (4 times or more), the fluorescence intensity decreases nearly 80%, which is no longer suitable for analysis. When the frozen stock solution is used for lipid (olive oil) concentration range of 0 to 4 µg/ml, the concentration of 0.05 µg/ml of Nile red was suitable and it identified the lipid and determined its concentration accurately.

Key words: *Fluorescent, Nile red dye, olive oil*

¹PhD student, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

^{2 & 3} Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran *(corresponding author: mahdavi@um.ac.ir)



فعالیت زیستی عصاره جلبک‌های کلرلا و اسپیرولینا و زیست توده تیمار شده آن‌ها قبل و بعد از پروتئولیز

طیبه هادی توران پشته^۱، *فخری سادات حسینی^۲، فاطمه صفاخواه^۱

چکیده

مقدمه: میکروجلبک‌ها ارگانیزم‌هایی با متابولیت‌های متنوع و با ارزش هستند و دو میکروجلبک اسپیرولینا و کلرلا به دلیل دارا بودن مقادیر بالای پروتئین بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند.

روش کار: در این مطالعه پس از کشت میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا، از آن‌ها عصاره‌گیری شد و همچنین به وسیله سونیکاتور پروتئین آن‌ها استخراج شده و تحت هیدرولیز آنزیمی با دو آنزیم آلکالین پروتئاز و پپسین قرار گرفتند و با استفاده از DPPH خاصیت آنتی اکسیدانی آن‌ها مورد سنجش قرار گرفت. همچنین خاصیت ضد تکثیری پروتئین‌های میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز آنزیمی با دو لاین سلولی سرطانی MCF-7 و Caco-2 و خاصیت ضد میکروبی با دو باکتری اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مورد سنجش قرار گرفت.

نتیجه: میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پروتئین هیدرولیز شده اسپیرولینا و کلرلا به ترتیب ۲۱/۶۰ درصد و ۳۷/۶۵ درصد و این میزان برای سلول سرطانی Caco-2 به ترتیب ۲۳/۶۳ درصد و ۲۶/۴۸ درصد کاهش یافته است. همچنین نتایج نشان داد که هیدرولیز پروتئین در بهبود خواص آنتی اکسیدانی، ضد تکثیری و ضد میکروبی تأثیر مثبت داشته است.

واژه‌های کلیدی: آلکالین پروتئاز، آنتی اکسیدانی، پپسین، ضد تکثیر سلولی، ضد سرطان، ضد میکروبی

۱- کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء

۲- استادیار گروه زیست فناوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء * نویسنده مسئول: (F.hosseini@alzahra.ac.ir)

مقدمه

ارگانسیم‌های دریایی منابع غنی از ترکیبات فعال زیستی بوده و همچنین ساختارهای مولکولی متنوع و فعالیت‌های زیستی مختلفی را دارا هستند. ایمنی نسبی آن‌ها از دلایل اصلی استفاده در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی است. جلبک‌های دریایی یکی از مهم‌ترین منابع در این زمینه هستند (Lopes et al., 2016). به طور کلی، جلبک‌های دریایی ارگانسیم‌هایی هستند که در دریا یا آب‌های شور زندگی می‌کنند و به دلیل وجود کلروفیل قادر به فتوسنتز هستند. جلبک‌های دریایی برای حفظ فشار اسمزی خود از مکانیسم‌های تنظیم اسمزی (osmoregulation) استفاده می‌کنند تا از اثرات تورژسانس ناشی از نوسانات شوری زیستگاه خود جلوگیری کنند. متابولیت‌های حاصل از جلبک‌های دریایی می‌توانند برای تولید داروهای جدید مفید باشد، زیرا چندین مولکول داخل سلولی را هدف قرار می‌دهد که مسیرهای علامت‌دهی را اصلاح می‌کند، از مسیرهای علامت‌دهی شده اصلی توسط عصاره‌ها و ترکیبات مشتق شده از جلبک‌های دریایی، می‌توان به $\text{TNF-}\alpha$ ، MAPKs، NF- κB ، mTOR، PI3K/AKT/GSK اشاره کرد (Juárez-Portilla et al., 2019).

میکروجلبک‌ها یکی از اولین شکل‌های زندگی روی زمین هستند که دارای تنوع گسترده‌ای است (Sathasivam et al., 2019). این جلبک‌ها دارای متابولیت‌های مهم دارویی با ارزش مانند کاروتنوئیدها، پلی فنول‌ها، اسیدهای چرب، فیکوبیلی پروتئین‌ها و ویتامین‌ها هستند که جزء استراتژی‌های دفاعی میکروجلبک‌ها در برابر عوامل تنش‌زا محسوب می‌شوند (Chu, 2012). دو میکروجلبک اسپیرولینا (*Arthrospira platensis* (Spirulina)) و کلرلا (*Chlorella vulgaris*) فرآورده‌های غذایی-دارویی هستند که معمولاً به شکل پودر، قرص یا کپسول مصرف می‌شوند (Ferdous & Yusof, 2021). اسپیرولینا دارای پروتئین بالایی است که حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد وزن خشک آن را تشکیل می‌دهد، همچنین تمام اسیدهای آمینه ضروری، مواد معدنی، ویتامین‌ها و پیگمان‌های فتوسنتزی را داراست (Lee et al., 2017, Yüce tepe & Özçelik, 2016). علاوه بر این، مقدار قابل توجهی اسیدهای چرب و لینولنیک اسید دارد (Sathasivam et al., 2019). این جلبک دارای اثرات کاهنده چربی خون، محافظت از کبد و اثرات آنتی اکسیدانی است و به عنوان یک ماده غذایی کاربردی و برای کنترل بیماری‌های مزمن مانند دیابت، آرتریت، کم خونی و سرطان کاربرد دارد (Gargouri et al., 2016). ریزجلبک کلرلا سرشار از کلروفیل، پروتئین، پلی ساکارید، ویتامین، مواد معدنی و اسیدهای آمینه ضروری است و به دلیل محتوای پروتئینی آن که معمولاً تا ۶۰ درصد است بسیار جالب توجه است (Enyidi, 2017). آنتی اکسیدان‌هایی مانند لوتئین، آلفا کاروتن، بتا کاروتن، اسید اسکوربیک و آلفا توکوفرول که در برابر رادیکال‌های آزاد فعال هستند، در کلرلا شناسایی شدند. همه ارگانسیم‌های هوازی گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species (ROS)) را به عنوان نتیجه اکسیداسیون و تنفس هوازی تولید می‌کنند (Juárez-Portilla et al., 2019)، که تجمع آن برای طولانی مدت می‌تواند به تنش اکسیداتیو مزمن منجر شود. ROS می‌تواند به طور مستقیم به

لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA آسیب برساند و همچنین در مسیرهای علامت دهی درون سلولی اختلال ایجاد کرده و باعث ایجاد تغییر در بیان پروتئین می‌شود (Lopes et al., 2016). مهم‌ترین ترکیب زیست فعال در کلرلا β -۱ و ۳ گلوکان، یک محرک ایمنی فعال است که رادیکال‌های آزاد و کلسترول خون را کاهش می‌دهد (de Moraes et al., 2015).

هیدرولیز پروتئین‌های ریز جلبک می‌تواند چندین ویژگی جالب دیگر را افزایش دهد، زیرا منجر به آزاد شدن پپتیدهای فعال زیستی با چندین فعالیت زیستی، ممکن می‌شود (Cunha & Pintado, 2022). پپتیدهای فعال زیستی معمولاً شامل تقریباً ۳-۴۰ باقی مانده اسید آمینه در هر مولکول هستند، ترکیب اسید آمینه و توالی آن‌ها عوامل مهمی برای فعالیت‌های فیزیولوژیکی آن‌ها است (Ngo et al., 2012). اخیراً پپتیدهای فعال زیستی به‌دست‌آمده از اسپیرولینا پلاتنسیس به دلیل اثر ضد فشار خون، آنتی اکسیدان، ضد تومور، ضد تکثیر و ضد میکروبی این پپتیدها مورد توجه قرار گرفته است (Yüce tepe & Özçelik, 2016). چندین پپتید فعال زیستی از کلرلا تولید شده است که خواص جالبی مانند آنتی اکسیدان، ضد فشار خون، ضد التهاب، ضد سرطان و ضد میکروبی را نشان می‌دهد (Cunha & Pintado, 2022). در بین انواع روش‌های هیدرولیز، هیدرولیز آنزیمی روش ارجح است زیرا شرایط فرآیند ملایم‌تری را ارائه کرده و محصولات با ارزش بالاتری تولید می‌کند (Tejano et al., 2019). روش‌های مورد استفاده عبارتند از: پروتئولیز در موجود زنده با آنزیم‌های گوارشی، پروتئولیز در شرایط آزمایشگاهی با آنزیم‌های تجاری مشتق شده از گیاهان، حیوانات یا منابع میکروبی و پروتئولیز با تخمیر میکروبی. به منظور به حداکثر رساندن بازده (درجه هیدرولیز)، فعالیت آنزیم پروتئولیتیک و زیست فعالی هدف، انتخاب آنزیم پروتئولیتیک مناسب و جستجوی شرایط فیزیکی‌شیمیایی بهینه مهم است. (Ovando et al., 2018).

در مطالعه پیش رو جلبک کلرلا و اسپیرولینا تحت تیمار آنزیمی قرار گرفته و فرآورده‌های هیدرولیز حاصل از نظر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی، مهار تکثیر سلولی و ضد میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت و در ادامه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره جلبک‌ها بدون هر گونه تیماری مقایسه شد.

مواد و روش

کشت ریز جلبک‌ها

کشت ذخیره ریز جلبک اسپیرولینا با شماره abdf2224 و کشت ذخیره ریز جلبک کلرلا با شماره Abdf21144 از شرکت گیل فوگا واقع در مرکز رشد واحدهای فناور دانشگاه آزاد استان گیلان خریداری شد. به منظور کشت ریز جلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا به ترتیب از محیط کشت Zarrouk (Rajasekaran et al., 2015) و محیط کشت Sorokin & Sorokin and Krauss (Krauss, 1958) استفاده شد. به منظور افزایش توده زیستی، جلبک اسپیرولینا و کلرلا به ترتیب با تراکم سلولی متوسط در هر

میلی لیتر $2/4 \times 10^5$ سلول و 3×10^5 سلول به محیط کشت اصلی هر یک تلقیح شد. کشت اسپیرولینا در محدوده دمایی 25 ± 1 درجه سانتی گراد و pH برابر با 9 ± 1 و کشت کلرلا در دمای 20 ± 1 درجه سانتی گراد و در pH برابر 6 ± 1 صورت گرفت. نوردهی به میزان ۲۰۰۰ لوکس به مدت ۲۴ ساعت، و هوادهی به طور مداوم انجام شد.

به منظور بررسی میزان رشد ریز جلبک اسپیرولینا و کلرلا هر ۳ روز یکبار از ارلن‌ها تحت شرایط سترون نمونه برداری شده و شمارش سلولی با لام نتوبار انجام شد. تعداد سلول‌های اسپیرولینا (فرمول ۱) و کلرلا (فرمول ۲) در هر میلی لیتر با استفاده از فرمول‌های ارائه شده در زیر محاسبه شد (Bagheri & Masoumizadeh, 2015, Choonawala, 2007).

فرمول ۱ $K = \ln N_1 - \ln N_0/t$

فرمول ۲ تعداد سلول در هر میلی لیتر = تعداد کل سلول‌های شمارش شده / تعداد بلوک‌های شمارش شده

بعد از ورود به سیر نزولی کشت، زیست توده میکروجلبک اسپیرولینا و کلرلا به ترتیب با استفاده از مش ۲۵ میکرون و سانتریفیوژ ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری شده، سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد خشک شدند (Safi et al., 2014). بخشی از زیست توده خشک جهت انجام آزمایشات بعدی در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد و بخش دیگر برای تهیه عصاره آبی استفاده شد. بدین منظور، ۵ گرم پودر خشک ریز جلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در حمام آب ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و بعد نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شده و عصاره جلبکی لیوفیلیزه شدند (Thiagarajan et al., 2019).

هیدرولیز آنزیمی

زیست توده خشک جلبک اسپیرولینا و کلرلا به نسبت ۱ گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط کرده و با استفاده از سونیکاتور ۱۰۰ وات در فرکانس ۲۰ کیلوهرتز به مدت ۲۰ دقیقه بر روی ظرف حاوی یخ شکست سلولی انجام شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از سانتریفیوژ ۴۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و سوپ رویی جمع‌آوری شده و با آنزیم آلکالین پروتئاز و پپسین تحت هیدرولیز قرار گرفت. بدین منظور پروتئین جلبک (۱۰٪ وزنی/حجمی) با آنزیم آلکالین پروتئاز و پپسین در نسبت آنزیم به سوبسترا ۱ به ۱۰ و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH برابر ۱۰ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در pH برابر ۳ به ترتیب برای آلکالین پروتئاز و پپسین به مدت ۱۸۰ دقیقه هضم شد. در پایان واکنش، pH بر روی ۷ تنظیم شد تا آنزیم غیرفعال شود. سپس فرآورده‌های هیدرولیز حاصل جمع‌آوری شده و خشک شد (Sheih et al., 2009).

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی با روش DPPH

به منظور انجام این آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH ۰/۵ مولار به ۱۰۰ میکرولیتر نمونه در غلظت‌های مختلف اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد از فرمول زیر استفاده شد (Safafar et al., 2015):

$$\text{Percent inhibition (I \%)} = ((\text{Abs control} - \text{Abs sample}) / \text{Abs control}) \times 100$$

Abs control میزان جذب محلول DPPH و متانول و Abs sample میزان جذب نمونه مورد آزمایش است.

بررسی مهار تکثیر سلولی

رده سلولی سرطان روده بزرگ CaCo-2 و رده سلول سرطان سینه MCF-7 انسانی از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) در فلاسک کشت سلولی ۲۵cm² و در شرایط مناسب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و CO₂ ۵ درصد کشت داده شدند (Mirzaei et al., 2020). به منظور بررسی تأثیر فرآورده‌های هیدرولیز حاصل از آنزیم بر تکثیر سلولی از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد. برای انجام این آزمایش، تعداد ۴×۱۰^۳ سلول CaCO-2 در هر خانه پلیت ۹۶ خانه‌ای با حجم ۱۵۰ میکرولیتر محیط DMEM کشت داده شدند. به‌عنوان شاهد از ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS استفاده شد. به علت این که هدف بررسی هیدرولیز بدون وابستگی زمانی بوده است، بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف پروتئین جلبکی قبل و بعد از هیدرولیز آنزیمی تیمار شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT در هر خانه افزوده شد. بعد از ۳/۵ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پس از حذف محلول رویی، ۱۵۰ میکرولیتر حلال MTT اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه گرماگذاری در دمای اتاق، جذب نوری نمونه‌ها در ۵۱۲ نانومتر با دستگاه الایزا خوانش شد (Khazraei-Moradian et al., 2014).

بررسی فعالیت ضد میکروبی

به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی از روش‌های انتشار در آگار به کمک دیسک (دیسک دیفیوژن) و چاهک آگار استفاده شد. سوسپانسیون میکروبی (مطابق با استاندارد نیم مک فارلند) سویه‌های میکروبی استاندارد شامل باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری گرم منفی اشریشیا کلی تهیه شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر سویه میکروبی استاندارد بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته شد و با اسپریدر استریل پخش گردید. دیسک‌های کاغذی به مدت نیم ساعت درون غلظت‌های مختلف پروتئین جلبکی قبل و بعد از هیدرولیز خیسانده شد، و سپس درون هر پلیت با رعایت فاصله از یکدیگر، دیسک‌ها در سطح پتری‌دیش قرار گرفتند. در روش چاهک آگار، از چاهک‌های حفر شده درون پتری دیش استفاده

شد. سپس پتری‌دیش‌های کشت داده شده در هر دو روش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت قطر هاله‌های عدم رشد، با خطکش بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (Zanganeh et al., 2019). از جنتامیسین با غلظت ۵ میکروگرم در لیتر بعنوان کنترل مثبت استفاده شده است.

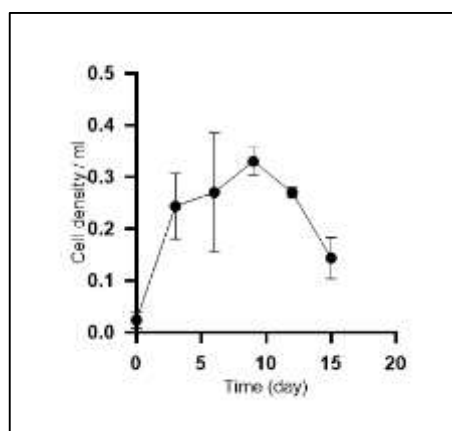
آنالیزهای آماری

تمامی آزمایش‌های انجام‌شده در این تحقیق با ۳ بار تکرار گرفته است و برای نمایش توزیع داده‌ها و همچنین جمع‌بندی آن‌ها از شاخص‌های میانگین و انحراف معیار استفاده شد. نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA با استفاده از نرم افزار Prism نسخه ۸ تجزیه و تحلیل شد و سطح معنی داری در $P\text{-value} < 0.05$ ارزیابی شد.

نتایج

رشد میکروجلبک‌ها

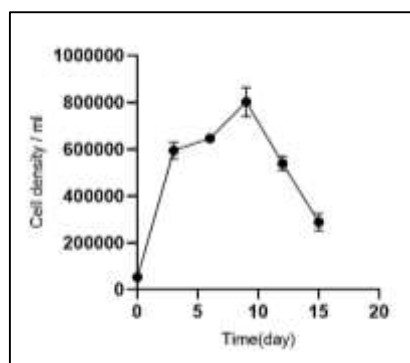
نتیجه حاصل از شمارش سلول و رسم منحنی رشد میکروجلبک اسپیرولینا در شکل ۱ آمده است. شکل ۱ نشان دهنده این است که در روزهای ۰-۱۰ رشد به صورت صعودی بوده و از روز ۱۱ تا ۱۵ رشد به صورت نزولی و با شیب ملایمی صورت گرفته است.



شکل ۱- نمودار رشد میکروجلبک اسپیرولینا بر اساس شمارش سلول. هر نقطه نشان دهنده مقدار میانگین سه تکرار است. میله‌ها انحرافات استاندارد را نشان می‌دهند.

Figure 1. Growth curve of *S. platensis* based on cell count. Each point represents the mean value of three replicates. Bars represent standard deviations.

نتیجه حاصل از شمارش سلول و رسم منحنی رشد میکروجلبک کلرلا در شکل ۲ آمده است. شکل ۲ نشان دهنده این است که در روزهای ۰-۱۰ رشد به صورت صعودی بوده و از روز ۱۱ تا ۱۵ رشد به صورت نزولی و با شیب بیشتری صورت گرفته است.

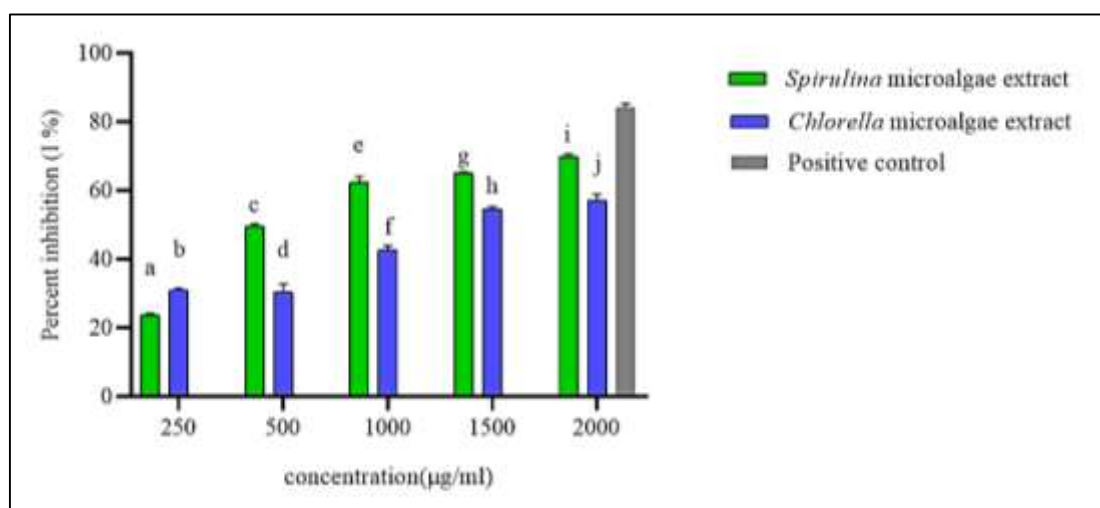


شکل ۲- نمودار رشد میکرو جلبک کلرلا بر اساس شمارش سلول. هر نقطه نشان دهنده مقدار میانگین سه تکرار است. میله ها انحرافات استاندارد را نشان می‌دهند.

Figure 2. Growth curve of *C.vulgaris* based on cell count. Each point represents the mean value of three replicates. Bars represent standard deviations.

فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین میکرو جلبک‌ها قبل و بعد از هیدرولیز و عصاره آبی

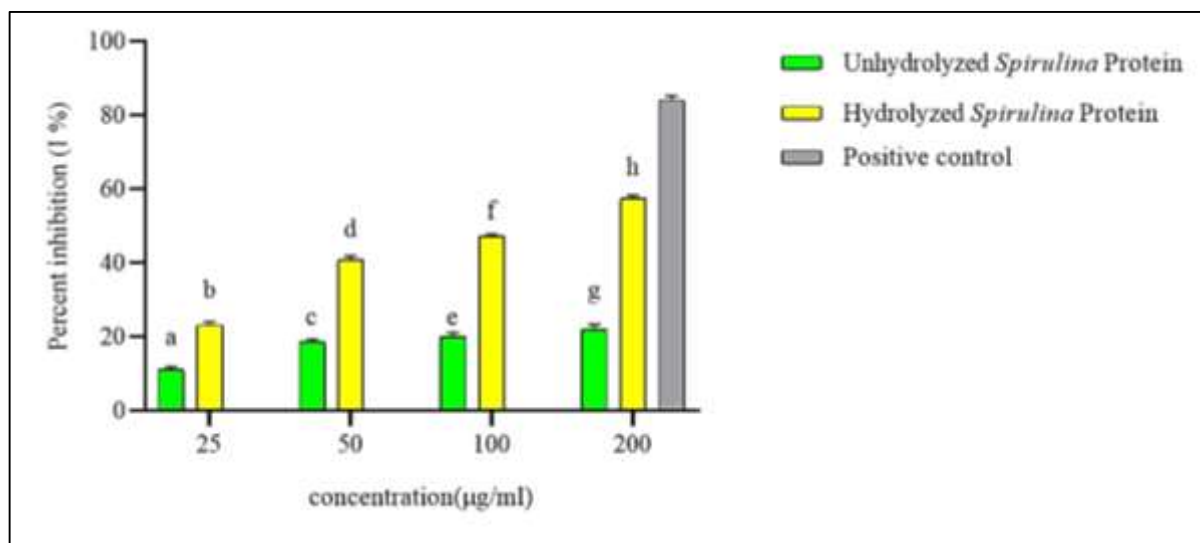
فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های آبی میکرو جلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا بر اساس آزمون DPPH در غلظت‌های ۲۵۰-۵۰۰-۱۰۰۰-۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در شکل ۳ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت، افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی مشاهده شده است و غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره آبی میکرو جلبک اسپیرولینا، بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی را دارا بوده است. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که در هر غلظت مشخص عصاره آبی میکرو جلبک اسپیرولینا خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره آبی میکرو جلبک کلرلا در همان غلظت دارد.



شکل ۳- توانایی مهار رادیکال DPPH در عصاره های آبی میکرو جلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا. حروف انگلیسی تفاوت معنی دار یک غلظت مشخص در عصاره آبی میکرو جلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا را نشان می‌دهد (P-value < 0.05). نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

Figure 3. Ability to inhibit DPPH radical in aqueous extracts of *S.platensis* and *C.vulgaris* microalgae. The English letters show the significant difference of a certain concentration in the aqueous extract of *S.platensis* and *C.vulgaris* microalgae (P-value < 0.05). The results are reported as mean ± standard deviation.

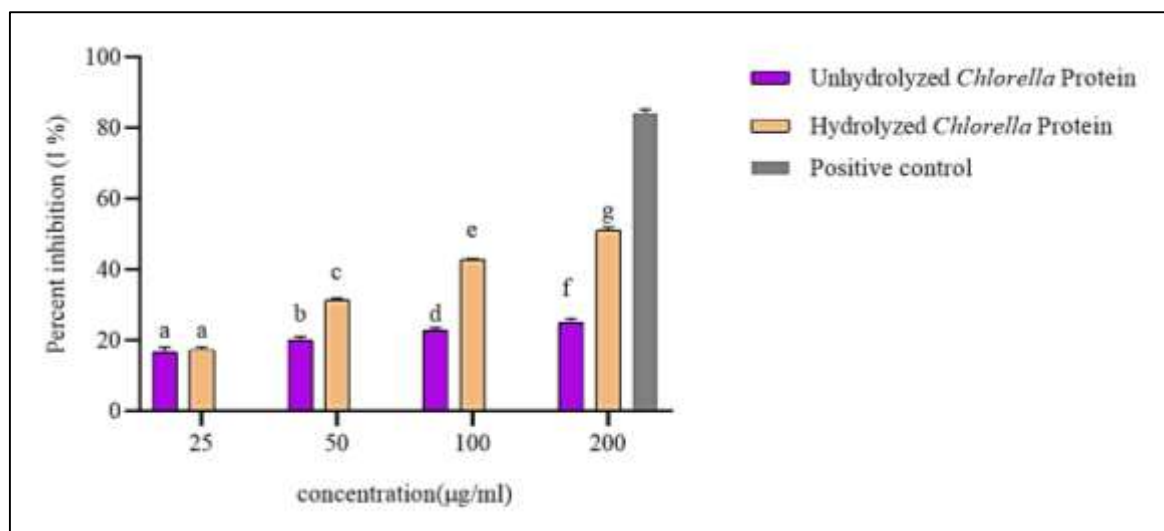
فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز بر اساس آزمون DPPH در غلظت‌های ۲۵-۵۰ و ۱۰۰-۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در شکل ۴ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت، افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی مشاهده شده است و غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در هر عصاره دارای بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی است. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که در هر غلظت مشخص پروتئین هیدرولیز شده میکروجلبک اسپیرولینا خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده در همان غلظت دارد.



شکل ۴- توانایی مهار رادیکال DPPH در پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز آنزیمی. حروف انگلیسی تفاوت معنی دار یک غلظت مشخص در پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز را نشان می‌دهد ($P\text{-value} < 0.05$). نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.

Figure 4. Ability to inhibit DPPH radical in *S. platensis* microalgae protein before and after enzymatic hydrolysis. The English letters indicate the significant difference of a certain concentration in the microalgae protein of *S. platensis* before and after hydrolysis ($P\text{-value} < 0.05$). The results are reported as mean $\pm$ standard deviation.

فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین میکروجلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز بر اساس آزمون DPPH در غلظت‌های ۲۵-۵۰ و ۱۰۰-۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در شکل ۵ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت، افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی مشاهده شده است و غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در هر عصاره دارای بالاترین خاصیت آنتی اکسیدانی است. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که در هر غلظت مشخص پروتئین هیدرولیز شده میکروجلبک کلرلا خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده در همان غلظت دارد.

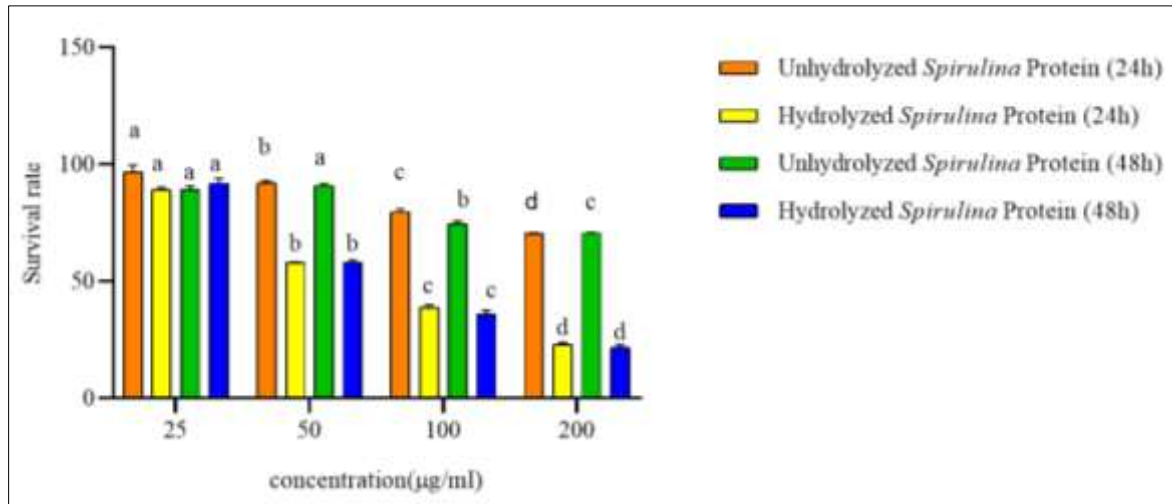


شکل ۵- توانایی مهار رادیکال DPPH در پروتئین میکروجلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز آنزیمی. حروف انگلیسی تفاوت معنی دار یک غلظت مشخص در پروتئین میکروجلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز را نشان می‌دهد (P-value < 0.05). نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.

Figure 5. Ability to inhibit DPPH radical in *C.vulgaris* microalgae protein before and after enzymatic hydrolysis. The English letters indicate the significant difference of a certain concentration in the microalgae protein of *C.vulgaris* before and after hydrolysis (P-value < 0.05). The results are reported as mean $\pm$ standard deviation.

درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 بعد از گذشت تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعته

درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از تیمار با پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز در شکل ۶ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش غلظت پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا موجب کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی شده است و درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 پس از تیمار ۲۴ ساعته با پروتئین هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده میکروجلبک اسپیرولینا در همه غلظت‌ها دارای اختلاف معنی دار بوده است، همچنین پس از تیمار ۴۸ ساعته، درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با پروتئین جلبکی قبل و بعد از هیدرولیز در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اختلاف معنی دار بوده است.

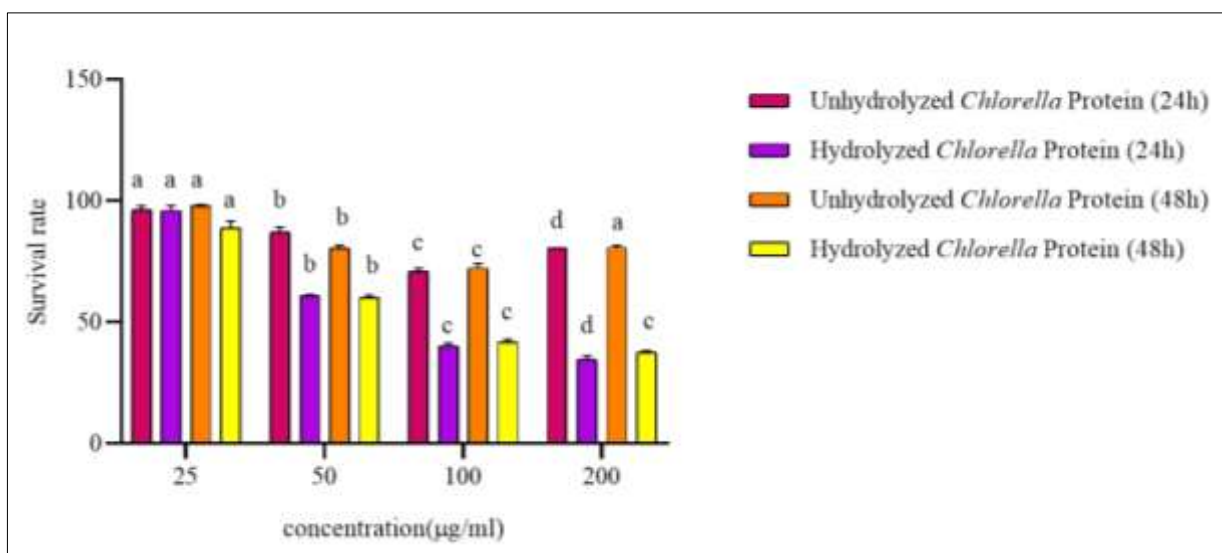


شکل ۶- درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 تحت تیمار پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت. حروف انگلیسی تفاوت معنی دار بین غلظت‌های مختلف یک عصاره را نشان می‌دهد ($P\text{-value} < 0.05$). نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.

Figure 6. Survival percentage of MCF-7 cells treated with *S. platensis* and microalgae protein before and after hydrolysis after 24 and 48 hours. English letters indicate significant differences between different concentrations of the same extract ($P\text{-value} < 0.05$). The results are reported as mean $\pm$ standard deviation.

درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از تیمار با پروتئین میکروجلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز در شکل ۷ نشان داده شده است.

این نتایج نشان می‌دهد که افزایش غلظت پروتئین میکروجلبک کلرلا موجب کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی شده است و درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 پس از تیمار ۲۴ ساعته با پروتئین هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده میکروجلبک کلرلا در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اختلاف معنی دار بوده است، همچنین پس از تیمار ۴۸ ساعته، درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 تیمار شده با پروتئین جلبکی قبل و بعد از هیدرولیز در همه غلظت‌ها دارای اختلاف معنی دار بوده است.

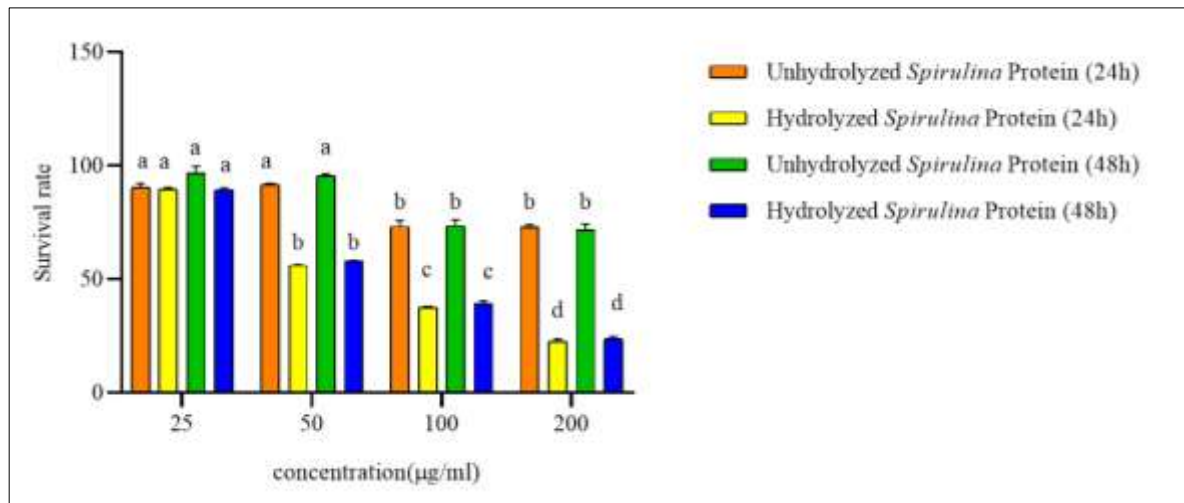


شکل ۷- درصد زنده مانی سلول‌های MCF-7 تحت تیمار پروتئین میکروجلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت. حروف انگلیسی تفاوت معنی دار بین غلظت‌های مختلف یک عصاره را نشان می‌دهد (P-value < 0.05). نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.

Figure 7. Survival percentage of MCF-7 cells treated with *C.vulgaris* microalgae protein before and after hydrolysis after 24 and 48 hours. English letters indicate significant differences between different concentrations of the same extract (P-value < 0.05). The results are reported as mean $\pm$ standard deviation.

درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 بعد از گذشت تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعته

درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی Caco-2 پس از تیمار با پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز در شکل ۸ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش غلظت پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا موجب کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی شده است و درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 پس از تیمار ۲۴ ساعته با پروتئین هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده میکروجلبک اسپیرولینا در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اختلاف معنی دار بوده است، همچنین پس از تیمار ۴۸ ساعته، درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 تیمار شده با پروتئین جلبکی قبل و بعد از هیدرولیز در همه غلظت‌ها دارای اختلاف معنی دار بوده است.

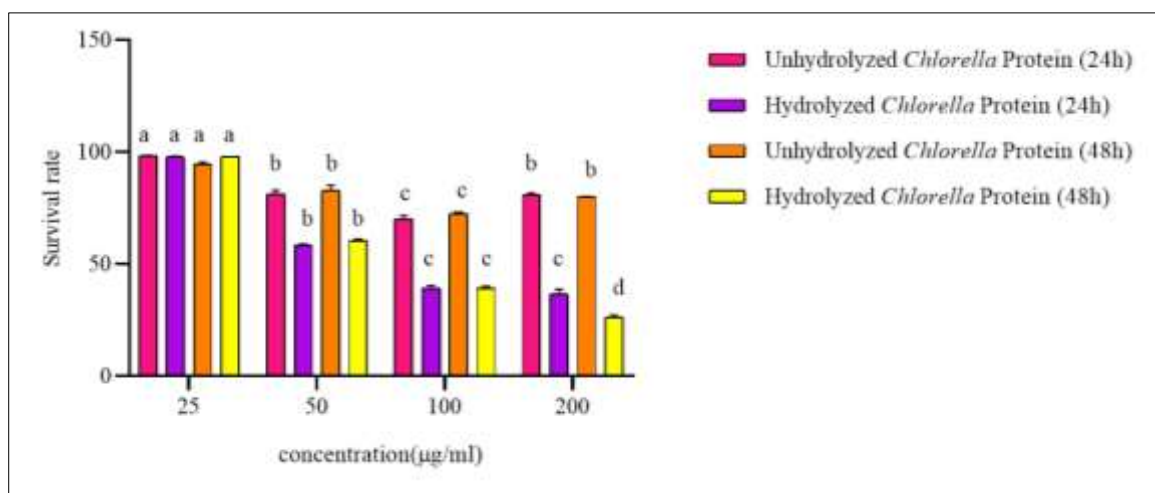


شکل ۸- درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 تحت تیمار پروتئین میکروجلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت. حروف انگلیسی تفاوت معنی دار بین غلظت‌های مختلف یک عصاره را نشان می‌دهد ($P\text{-value} < 0.05$). نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.

Figure 8. Survival percentage of Caco-2 cells treated with *S. platensis* microalgae protein before and after hydrolysis after 24 and 48 hours. English letters indicate significant differences between different concentrations of the same extract ($P\text{-value} < 0.05$). The results are reported as mean $\pm$ standard deviation.

درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی Caco-2 پس از تیمار با پروتئین میکروجلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز در شکل ۹ نشان داده شده است.

این نتایج نشان می‌دهد که افزایش غلظت پروتئین میکروجلبک کلرلا موجب کاهش زنده مانی سلول‌های سرطانی شده است و درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 پس از تیمار ۲۴ ساعته با پروتئین هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده میکروجلبک کلرلا در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اختلاف معنی دار بوده است. همچنین پس از تیمار ۴۸ ساعته، درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 تیمار شده با پروتئین جلبکی قبل و بعد از هیدرولیز در همه غلظت‌ها به جز غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اختلاف معنی دار بوده است.



شکل ۹- درصد زنده مانی سلول‌های Caco-2 تحت تیمار پروتئین میکرو جلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت. حروف انگلیسی تفاوت معنی دار بین غلظت‌های مختلف یک عصاره را نشان می‌دهد (P-value < 0.05). نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.

Figure 9. Survival percentage of Caco-2 cells treated with *C.vulgaris* microalgae protein before and after hydrolysis after 24 and 48 hours. English letters indicate significant differences between different concentrations of the same extract (P-value < 0.05). The results are reported as mean $\pm$ standard deviation.

فعالیت ضد میکروبی پروتئین میکرو جلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز

نتایج حاصل از فعالیت ضد میکروبی پروتئین میکرو جلبک اسپیرولینا قبل و بعد از هیدرولیز در جدول ۱ آورده شده است. قطر هاله عدم رشد مربوط به جنتامیسین برای باکتری اشیریشیا کلی ۲۶ و برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲۸ میلی متر بوده است. این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده بیشتر است و با افزایش غلظت، فعالیت ضد میکروبی افزایش یافته است.

جدول ۱- مقادیر قطر هاله عدم رشد (میلی متر) باکتری‌های مورد آزمایش در مقابل عصاره‌ی آبی پروتئولیز شده‌ی جلبک اسپیرولینا

Table 1- The values of the diameter of the growth inhibition halo (mm) of the tested bacteria against the proteolyzed aqueous extract of *S.platensis*

Concentration (mg/ml)	0.125	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00
Unhydrolyzed protein (E.coli)	Without halo	Without halo	Without halo	Without halo	Without halo	6.50 $\pm$ 0.70
Hydrolyzed protein (E.coli)	5.50 $\pm$ 0.70	4.75 $\pm$ 0.35	7.83 $\pm$ 0.76	11.33 $\pm$ 1.52	13.66 $\pm$ 1.52	13.33 $\pm$ 2.30
Unhydrolyzed protein (S.aureus)	Without halo	Without halo	Without halo	Without halo	6.33 $\pm$ 0.57	6.66 $\pm$ 1.15
Hydrolyzed protein (S.aureus)	6.33 $\pm$ 1.52	7.33 $\pm$ 1.52	11.66 $\pm$ 0.57	15.33 $\pm$ 1.15	16.33 $\pm$ 0.57	15.33 $\pm$ 0.57

نتایج حاصل از فعالیت ضد میکروبی پروتئین میکرو جلبک کلرلا قبل و بعد از هیدرولیز در جدول ۲ آورده شده است. قطر هاله عدم رشد مربوط به جنتامیسین برای باکتری اشیریشیا کلی ۲۶ و برای استافیلوکوکوس اورئوس ۲۸ میلی متر بوده است. این نتایج نشان می‌دهد که فعالیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده بیشتر است و با افزایش غلظت، فعالیت ضد میکروبی افزایش یافته است.

جدول ۲- مقادیر قطر هاله عدم رشد (میلی متر) باکتری‌های مورد آزمایش در مقابل عصاره‌ی آبی پروتئولیز شده‌ی جلبک کلرلا

Table 2- The values of the diameter of the growth inhibition halo (mm) of the tested bacteria against the proteolyzed aqueous extract of *C.vulgaris*

Concentration (mg/ml)	0.125	0.25	0.50	1.00	1.50	2.00
Unhydrolyzed protein (<i>E.coli</i>)	Without halo	Without halo	Without halo	Without halo	Without halo	Without halo
Hydrolyzed protein (<i>E.coli</i>)	5.50 ± 0.70	5.83 ± 0.28	8.50 ± 0.50	11.66 ± 1.15	13.33 ± 0.57	12.33 ± 0.57
Unhydrolyzed protein (<i>S.aureus</i>)	Without halo	Without halo	5.66 ± 0.57	6.00 ± 0	7.33 ± 0.57	6.33 ± 0.57
Hydrolyzed protein (<i>S.aureus</i>)	5.66 ± 0.57	7.33 ± 1.52	10.33 ± 0.57	14.66 ± 1.15	16.66 ± 1.15	15.33 ± 0.57

بحث

با توجه به شکل ۳ افزایش غلظت عصاره‌های آبی میکروجلبک‌ها، موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می‌شود. به صورتی که غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی است. تکیار و همکاران در سال ۲۰۱۷ با بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره‌های الکلی میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا نشان دادند که با افزایش غلظت عصاره‌ها، فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش می‌یابد (Tagvi Takyar *et al.*, 2017). نتایج به دست آمده از این پژوهش مؤید نتایج مطالعه فوق می‌باشد.

با توجه به شکل‌های ۴ و ۵ افزایش غلظت پروتئین میکروجلبک‌ها، موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می‌شود. به صورتی که غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی است و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده در هر دو میکروجلبک، بیشتر است و هیدرولیز آنزیمی موجب افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی شده است. Gad و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره آبی حاوی پروتئین فیکوسیاینین اسپیرولینا پلاتنسیس را در شرایط آزمایشگاهی و اثرات محافظتی کبدی آن را در داخل بدن ارزیابی کردند. در این مطالعه نشان داده شد که ظرفیت آنتی اکسیدانی در عصاره آبی این میکروجلبک وجود دارد و در جلوگیری از آسیب کبدی موفق بوده است (Gad *et al.*, 2011). به طور مشابه، Bermejo و همکاران فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پروتئین اسپیرولینا پلاتنسیس را ثابت کرد (Bermejo *et al.*, 2008). همچنین یو و همکاران با هیدرولیز آنزیمی پروتئین اسپیرولینا پلاتنسیس، پپتیدی با خاصیت آنتی اکسیدانی مشاهده کردند (Yu *et al.*, 2016). Tezano و همکاران ایزوله‌های پروتئین کلرلا سوروکینینا با استفاده از پپسین، بروملین و ترمولیزین به صورت آنزیمی هیدرولیز کردند و ویژگی‌های مولکولی و زیست فعالی آن‌ها را تعیین کردند. آن‌ها مشاهده کردند که پپتیدهای حاصل دارای خاصیت مهار رادیکال DPPH هستند (Tezano *et al.*, 2019). Forutan و همکاران پروتئین استخراج شده از اسپیرولینا پلاتنسیس را توسط آنزیم آلکالاز هیدرولیز کردند و مشاهده کردند که فعالیت آنتی اکسیدانی

پروتئین با افزایش درجه هیدرولیز و غلظت آن افزایش می‌یابد (Forutan et al., 2023). همچنین ابروانی و همکاران نشان دادند که هیدرولیز پروتئین ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به وسیله آنزیم‌های پپسین و کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم باعث تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان می‌شود (Irvani Mohajeri et al., 1398). نتایج مطالعات مطرح شده با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر همسو است.

با توجه به نتایج به دست آمده از درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی روده و سینه، مشخص شد که پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای فعالیت ضد سرطانی هستند. صدیقی و همکاران اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی پپتیدهای پروتئین کلرلا ولگاریس هیدرولیز شده با پپسین را بررسی کردند. اثر مهار پپتیدهای تولید شده بر روی سلول‌های اشريشيا کلي و رده‌های سلولی سرطان پستان مورد سنجش قرار گرفت. پپتیدهای هیدرولیز شده باعث کاهش رشد اشريشيا کلي شدند و پپتیدهای حاصل تأثیر قوی بر زنده‌مانی سلول‌های سرطان سینه داشتند (Sedighi et al., 2016). صادقی و همکاران اثرات ضد سرطانی و ضد باکتریایی پروتئین غالب اسپیرولینا پلاتنسیس پس از هیدرولیز توسط آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین بر روی سلول‌های آدنوکارسینومای کولون انسانی و اشريشياکلي و استافیلوکوکوس اورئوس انجام بررسی کردند. آن‌ها مشاهده کردند که پروتئین ۲۲ کیلو دالتون و پپتیدهای مشتق از آن رشد باکتری را کاهش می‌دهد و کسر پپتیدی کمتر از ۳ کیلو دالتون توانست زنده ماندن سلول SW480 را به طور قابل توجهی کاهش دهد (Sadeghi et al., 2018). نتایج مطالعات مطرح شده مؤید نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر است.

با توجه به نتایج جداول ۱ و ۲، هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های هر دو میکروجلبک موجب خاصیت ضد میکروبی آن‌ها شده است. سان و همکاران یک پپتید ضد باکتری از اسپیرولینا پلاتنسیس با هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های آلکالین پروتئاز و پاپائین به دست آوردند. آن‌ها نشان دادند که حداقل غلظت بازدارنده پپتید ضد باکتری از اسپیرولینا پلاتنسیس ۸ میلی گرم در میلی لیتر برای اشريشيا کلي و ۱۶ میلی گرم در میلی لیتر برای استافیلوکوکوس اورئوس بود و بیان کردند بر اساس تمام این ویژگی‌ها، پپتیدهای اسپیرولینا را می‌توان به عنوان عوامل ضد میکروبی امیدوارکننده بالقوه در نظر گرفت (Sun et al., 2016).

نتیجه گیری کلی

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های آبی میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۶۹/۸۲ درصد و ۵۷/۱۵ درصد بوده است. همچنین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر میکروجلبک‌های اسپیرولینا و کلرلا به ترتیب ۵۷/۴۶ درصد و ۵۱/۰۳ درصد بوده است. میزان زنده مانی سلول‌های سرطانی MCF-7 پس از تیمار ۴۸ ساعته با غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پروتئین هیدرولیز شده اسپیرولینا و کلرلا به ترتیب ۲۱/۶۰ درصد و ۳۷/۶۵ درصد و این میزان برای سلول سرطانی Caco-2 به ترتیب ۲۳/۶۳ درصد و

۲۶/۴۸ درصد کاهش یافته است. همچنین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری‌های اشريشيا کلي و استافيلوکوکوس اورئوس نشان می‌دهد که فعالیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده بیشتر است و با افزایش غلظت، فعالیت ضد میکروبی افزایش یافته است. به طور کلی هیدرولیز آنزیمی پروتئین موجب افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد باکتریایی و ضد سرطانی می‌شود و دو میکروجلبک اسپیرولینا و کلرلا کاندیدهای خوبی در این زمینه هستند و می‌توانند به عنوان مکمل غذایی-دارویی مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه الزهراء انجام شده است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

Reference

- Bagheri, Shabnam, and Masoumizadeh, Sayeda Zahra. (2015). Investigating the growth of *Chlorella* sp microalgae in Conway and TMRL culture medium in different waters. *Wetland Ecobiology*, 8(30), 95-104. SID. <https://sid.ir/paper/505646/fa> . (In Persian)
- Bermejo, P., Piñero, E., & Villar, Á. M. (2008). Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. *Food chemistry*, 110(2), 436-445. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.021>
- Chu, W. L. (2012). Biotechnological applications of microalgae. *International e-Journal of Science, Medicine & Education (IeJSME)*, 6(1), S24-S37. DOI:10.56026/imu.6.Supp11.S24
- Choonawala, B. B. (2007). *Spirulina production in brine effluent from cooling towers* (Doctoral dissertation). <https://doi.org/10.51415/10321/134>
- Cunha, S. A., & Pintado, M. E. (2022). Bioactive peptides derived from marine sources: Biological and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 348-370. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.017>
- de Moraes, M. G., Vaz, B. D. S., de Moraes, E. G., & Costa, J. A. V. (2015). Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed research international*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/835761>
- Enyidi, U. D. (2017). *Chlorella vulgaris* as protein source in the diets of African catfish *Clarias gariepinus*. *Fishes*, 2(4), 17. <https://doi.org/10.3390/fishes2040017>
- Ferdous, U. T., & Yusof, Z. N. B. (2021). Medicinal prospects of antioxidants from algal sources in cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.593116>
- Forutan, M., Hasani, M., Hasani, S., & Salehi, N. (2023). Antioxidative Activity and Functional Properties of Enzymatic Protein Hydrolysate of *Spirulina platensis*. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 13(1), 75-89. DOI:10.30495/jfbt.2022.63017.10281
- Gargouri, M., Magné, C., & el Feki, A. (2016). Hyperglycemia, oxidative stress, liver damage and dysfunction in alloxan-induced diabetic rat are prevented by *Spirulina* supplementation. *Nutrition Research*, 36(11), 1255–1268. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.09.011>

Gad, A. S., Khadrawy, Y. A., El-Nekeety, A. A., Mohamed, S. R., Hassan, N. S., & Abdel-Wahhab, M. A. (2011). Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats. *Nutrition*, 27(5), 582-589. DOI: 10.1016/j.nut.2010.04.002

Irvani Mohajeri, Rahela, Mirzaei, Mehta, and Hazari, Hamida. (2018). Investigating the effect of enzyme type and hydrolysis time of Bertolide antioxidant peptides from Spirulina platensis protein. *New technologies in the food industry*, 6(4), 581-597. SID. <https://sid.ir/paper/258688/fa>. (In Persian)

Juárez-Portilla, C., Olivares-Bañuelos, T., Molina-Jiménez, T., Sánchez-Salcedo, J. A., Del Moral, D. I., Meza-Menchaca, T., ... & Zepeda, R. C. (2019). Seaweeds-derived compounds modulating effects on signal transduction pathways: A systematic review. *Phytomedicine*, 63, 153016. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153016>

Khazraei-Moradian, S., Andalib, A., Ganjalikhani-Hakemi, M., Safari, Z., Zare, A., & Kardar, G. A. (2014). The effect of protein extract of licorice root in proliferation of HT-29 and CT26 cancer cell lines. *Journal of Isfahan Medical School*, 32(298), 1338-1346.

Lee, J., Park, A., Kim, M. J., Lim, H. J., Rha, Y. A., & Kang, H. G. (2017). Spirulina extract enhanced a protective effect in type 1 diabetes by anti-apoptosis and anti-ROS production. *Nutrients*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/nu9121363>

Lopes, G., Andrade, P. B., & Valentão, P. (2016). Phlorotannins: Towards new pharmacological interventions for diabetes mellitus type 2. *Molecules*, 22(1), 56. <https://doi.org/10.3390/molecules22010056>

Mirzaei, N., Kolahi, M., & Mokhtari, B. (2020). A Phytochemical Study and Comparison of the Effect of Citrullus Colocynthis Extracts on Colon Cancer Cells Caco-2. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 14(5), 1-11.[in Persian]

Ngo, D. H., Vo, T. S., Ngo, D. N., Wijesekara, I., & Kim, S. K. (2012). Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International journal of biological macromolecules*, 51(4), 378-383. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.06.001>

Ovando, C. A., Carvalho, J. C. D., Vinícius de Melo Pereira, G., Jacques, P., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2018). Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from Spirulina: A review. *Food reviews international*, 34(1), 34-51.

Rajasekaran C., Ajeesh C., Balaji S., Shalini M., Siva R., Das R., Fulzele D and Kalaivani T. 2015. Effect of Modified Zarrouk's Medium on Growth of Different Spirulina Strains, *Agriculture Technology and Biological Sciences*, 13(1): 67-75.

Safafar, H., Van Wageningen, J., Møller, P., & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine drugs*, 13(12), 7339-7356. <https://doi.org/10.3390/md13127069>

Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 26, Issue 4, pp. 709–722). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 35, pp. 265–278). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

Sadeghi, S., Jalili, H., Ranaei Siadat, S. O., & Sedighi, M. (2018). Anticancer and antibacterial properties in peptide fractions from hydrolyzed spirulina protein. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20(4), 673-683.

Sun, Y., Chang, R., Li, Q., & Li, B. (2016). Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis*. *European Food Research and Technology*, 242, 685-692. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2576-x>

Sedighi, M., Jalili, H., RANAIEI, S. S. O., & Amrane, A. (2016). Potential health effects of enzymatic protein hydrolysates from *Chlorella vulgaris*.

Sorokin, Constantine, and Robert W. Krauss. "The Effects of Light Intensity on the Growth Rates of Green Algae." *Plant physiology* 33, no. 2 (1958): 109. doi: 10.1104/pp.33.2.109

Sheih, I. C., Wu, T. K., & Fang, T. J. (2009). Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresource Technology*, 100(13), 3419-3425. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.014>

Thiagarajan, S. K., Rama Krishnan, K., Ei, T., Husna Shafie, N., Arapoc, D. J., & Bahari, H. (2019). Evaluation of the Effect of Aqueous *Momordica charantia* Linn. Extract on Zebrafish Embryo Model through Acute Toxicity Assay Assessment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9152757>

Tejano, L. A., Peralta, J. P., Yap, E. E. S., & Chang, Y. W. (2019). Bioactivities of enzymatic protein hydrolysates derived from *Chlorella sorokiniana*. *Food science & nutrition*, 7(7), 2381-2390. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1097>

Tagvi Takyar, M. B., Mir Babak, Hachit Khajovi, Safari. (2017) Comparison of the antioxidant properties of alcoholic extracts of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina Platensis* in laboratory conditions. *Caspian Sea Aquatic Journal*, 2 (Winter 1996). 11-18

Yücepete, A., & Özçelik, B. Bioactive Peptides Isolated from Microalgae *Spirulina platensis* and their Biofunctional Activities. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*. [Internet] 2016 [citado: 1 de mayo de 2020]; 14 (4).

Yu, J., Hu, Y., Xue, M., Dun, Y., Li, S., Peng, N., ... & Zhao, S. (2016). Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of *Spirulina platensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1216-1223. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1601.01033>

Zanganeh, Negin, Barzegar, Hassan, Alizadeh Behbahani, Behrouz, & Mehrania, Mohammadamin. (2019). Investigating the effect of different levels of *Spirulina platensis* microalgae on nutritional, physicochemical and sensory characteristics of sponge cake. *Iran Journal of Food Science and Industry Research*, 16(2), 207-220. doi: 10.22067/ifstrj.v16i2.81859. (In Persian)

Comparison of biological activity in extracts from *Chlorella* and *Spirulina* algae the related algal biomass before and after proteolysis

Tayeabeh Hadi Toranposhti¹, Fakhri Sadat Hosseini^{2*}, Fatemeh Safakhah¹

Received date: 11/4/2023

Acceptance date: 18//6/2023

Abstract

Introduction: Microalgae are organisms with diverse and valuable metabolites, and two microalgae, spirulina and chlorella, have received much attention due to their high protein content.

Methods: In this study, after the cultivation of spirulina and chlorella microalgae, they were extracted and their protein was extracted by sonicator and subjected to enzymatic hydrolysis with two enzymes, alkaline protease and pepsin, and using the test DPPH and their antioxidant properties were measured. Also, antiproliferative property with two cancer cell lines MCF-7 and Caco-2 and antimicrobial property with two bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, proteins of spirulina and chlorella microalgae were measured before and after enzymatic hydrolysis.

Results: The survival rate of MCF-7 cancer cells after 48-hour treatment with a concentration of 200 µg/ml hydrolyzed protein of *S.platensis* and *C.vulgaris* was 21.60% and 37.65%, respectively, and this amount has decreased for Caco-2 cancer cells by 23.63% and 26.48%, respectively.. Also, the results showed that protein hydrolysis had a positive effect on improving antioxidant, antiproliferative and antimicrobial properties.

Key words: alkaline protease, anticancer, anti-cell proliferation, antimicrobial, antioxidant, pepsin

1- Master's Degree in Microbial Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Al Zahra University

2- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Al-Zahra University

(*Corresponding author:F.hosseini@alzahra.ac.ir)



بررسی اثرات هم‌افزایی نانوذرات سریم اکسید و اوژنول بر بازیابی عملکرد نوروهای حسی و حرکتی ناشی از کمپرس عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی

سهیلا عالی پور^۱، فریبا محمودی^{۲*}، آرش عبدالملکی^۳، خدیجه حقیقت^۴

چکیده

مقدمه: بهبود آسیب اعصاب محیطی یکی از چالش‌های مهم از نظر کلینیکی است. استفاده از روش‌های نوین مثل نانو داروها و ترکیبات طبیعی به دلیل اثرات موثر و عوارض جانبی کمتر می‌تواند گزینه مناسبی باشد. در این مطالعه اثرات سینرژیستی نانوذرات سریم اکسید و اوژنول در بازیابی عصب سیاتیک در مدل موش صحرایی بررسی شد. **مواد و روش:** بیست و هشت موش صحرایی با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم به چهار گروه تقسیم شدند ($n=7$) به گروه کنترل و مدل سیاتیک سالین (۰.۵ml) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. همچنین دو گروه مدل سیاتیک به ترتیب (۵۰mg/kg اوژنول و ۲۰mg/kg نانوذرات سریم اکسید) یا (۱۰۰mg/kg اوژنول و ۲۰mg/kg نانوذرات سریم اکسید) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. سپس تست‌های رفتاری حسی و حرکتی انجام شد. بافت عضله خارج شد و در نهایت تغییرات وزن بافت عضله بررسی شد. همه مراحل آزمایش حیوانی مطابق با کمیته اخلاق دانشگاه محقق اردبیلی با کد (IR.UMA.REC. 1400.033) انجام شد. **نتایج:** تزریق داخل صفاقی اوژنول همراه با نانوذرات سریم اکسید باعث افزایش سرعت بازیابی عملکرد نوروهای حسی و حرکتی نسبت به گروه مدل سیاتیک شد. همچنین در گروه دریافت کننده اوژنول و نانوذرات سریم اکسید میزان آتروفی عضلات کمتر بود. بهبود بافت عصبی در گروه با دوز بالا معنی دار بود. **نتیجه‌گیری کلی:** نتایج حاصل نشان داد اوژنول و نانوذرات سریم اکسید باعث سرعت بهبود بافت عصبی می‌شود. بنابراین از پتانسیل محافظت عصبی آنها می‌توان برای درمان بیماری‌های مربوط به آسیب اعصاب محیطی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اوژنول، سریم اکسید، سیاتیک، نانوذرات

۱- دانشجوی ارشد، فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

(*) نویسنده مسئول، F.mahmoudi@uma.ac.ir

۳- دانشیار، گروه بیوانفورماتیک، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران

۴- دانشجوی دکتری، فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

مقدمه

سیاتیک اختلال شایع ناتوان کننده است که در آن بیمار درد ناشی از آسیب به ریشه عصبی لومبوساکرال را تجربه می‌کند. عصب سیاتیک با قطر ۲ سانتی متر بزرگترین عصب بدن است. عصب سیاتیک عملکرد حرکتی مستقیم برای عضلات ساق پا، عضلات قدامی ساق پا و برخی از عضلات پا را فراهم می‌کند (Mishra et al., 2010). اختلال سیاتیک می‌تواند در اثر التهاب یا فشرده شدن ریشه‌های عصبی لومبوساکرال (L4-S1) ایجاد شود که عصب سیاتیک را تشکیل می‌دهد. شیوع سیاتیک بین افراد متفاوت است (Poutoglidou et al., 2020). در یک مطالعه ای گزارش کردند که حدود ۶۰ درصد از بیماران مبتلا به کمردرد و پا درد از نظر بالینی مبتلا به سیاتیک هستند (Jensen et al., 2019). اختلال سیاتیک می‌تواند باعث ناراحتی شدید و محدودیت عملکردی شود. این اختلال بیشتر بر اساس علائم هنگام معاینه پزشکی تشخیص داده می‌شود. در صورت وجود سابقه پا درد، کمردرد یا درد زیر زانو باید مشکوک به سیاتیک شد (Ostelo, 2020). درد سیاتیک در امتداد یک خط در پشت باسن احساس می‌شود اگر درد ریشه عصبی تا زیر زانو گسترش یابد، منشا آن با آسیب ریشه نخاعی مطابقت دارد. سیاتیک معمولاً یک طرفه است و ممکن است درد دو طرفه نیز وجود داشته باشد (Valat et al., 2010). با اینکه تاکنون درمان قطعی برای اختلال سیاتیک تشخیص داده نشده است اما رایج ترین درمان اولیه، کنترل درد با استفاده از دارو و فیزیوتراپی است. فعالیت معمولاً متناسب با میزان ناراحتی محدود می‌شود. اگرچه اغلب استراحت توصیه می‌شود، اما در بیمارانی که قادر به ادامه فعالیت هستند فعالیت بدنی مفید است (Fernandez et al., 2015). استفاده از داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی ممکن است باعث تسکین کوتاه مدتی برای کمردرد و درد سیاتیک شود. با این حال در برخی موارد هم گزینه جراحی برای درمان سیاتیک در نظر گرفته می‌شود (Pinto et al., 2012). با اینکه اثرات اوژنول (Alypoor et al., 2023) و نانو ذره سریم اکسید (Soluki et al., 2020) به تنهایی برای اختلال سیاتیک بررسی شده است ولی تاکنون اثرات تزریق هم زمان اوژنول و نانوذرات سریم اکسید مطالعه نشده بود. به همین دلیل این تحقیق با هدف اینکه آیا این دو ترکیب می‌توانند اثرات مفید همدیگر را تقویت کنند، انجام گرفت.

امروزه استفاده از نانوداروها برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد توجه محققان زیادی قرار گرفته است. نانوداروها به دلیل اندازه کوچک و انتقال هدفمند آنها به بافت مورد نظر در زمینه پزشکی بسیار ارزشمند هستند (Beltrán-Gracia et al., 2019). نانوذرات اکسید سریم خواص قوی آنتی اکسیدانی در مهار رادیکال آزاد دارد. با توجه به اینکه رادیکال‌های آزاد نقش برجسته ای در ایجاد بسیاری از بیماری‌های عصبی دارند، اثر نانوذرات سریم اکسید به عنوان یک عامل درمانی بالقوه در بهبود بیماری‌ها در برخی از مطالعات گزارش شده است (Estevez et al., 2011; Hekmatimoghaddam et al., 2019). همچنین گیاهان دارویی از زمان‌های قدیم به عنوان دارو به طور سنتی مورد استفاده قرار گرفته اند. به دلیل کارایی بالا، هزینه و عوارض جانبی

کمتر، داروهای تولید شده از گیاهان، امروزه رو به گسترش است (Babazadeh *et al.*, 2023). اوژنول یک ترکیب فعال زیستی است که به طور گسترده در بسیاری از گیاهان مانند میخک، دارچین، فلفل و غیره وجود دارد. اوژنول فواید بیولوژیکی زیادی مانند فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، نوروپروتکتیو، ضد سرطانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی و حشره کشی دارد (Taleuzzaman *et al.*, 2021). در این مطالعه نیز پتانسیل نوروپروتکتیو اوژنول/ سریم اکسید در بازیابی عصب سیاتیک در مدل موش‌های صحرایی بررسی شد.

مواد و روش

برای این مطالعه اوژنول از (Sigma Aldrich, Co, USA)، توسط شرکت سفیر آزما و نانوذرات سریم اکسید از (US-NANO Co, USA، توسط شرکت نانو گستر سپاهان) خریداری شدند. همچنین بیست و هشت موش صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد. موش‌های صحرایی در دمای 25°C با دسترسی آزاد به آب و غذا در آزمایشگاه نگهداری شدند. شرایط چرخه نوری ۱۲ ساعت تاریکی/ ۱۲ ساعت روشنایی در نظر گرفته شد.

درمان و گروه بندی حیوان

موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم به چهار گروه (n=7) تقسیم شدند. گروه کنترل (بدون آسیب عصب سیاتیک) و مدل سیاتیک (جراحی شده) سالین (۰.۵ ml) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. همچنین، به دو گروه مدل سیاتیک به ترتیب دوزهای (۵۰ mg/kg اوژنول/ ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) و (۱۰۰ mg/kg اوژنول/ ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) به صورت داخل صفاقی به مدت یک هفته تزریق شد (Soluki *et al.*, 2020; Barot *et al.*, 2021). تمام تزریقات بین ساعت ۹ الی ۱۱ صبح انجام گرفت.

القای آسیب ناشی از کمپرس عصب سیاتیک^۱

ابتدا موش‌های صحرایی با مخلوط کتامین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند. سپس با شکافتن لایه عضلانی گاستروکنمیوس پا راست به اندازه ۲ سانتی‌متر، عصب سیاتیک آشکار گردید. قطعه‌ای از عصب در محل بالای سه شاخه شدن، جهت مدل‌سازی تجربی آسیب عصب سیاتیک، کمپرس شد. در نهایت لایه عضلانی و پوست بخیه شد (Azimpour *et al.*, 2022). پس از جراحی برای جلوگیری از عفونت از پماد آنتی بیوتیک تتراسایکلین ۳ درصد استفاده گردید. همچنین، برای کاهش درد به مدت دو روز پس از جراحی بوپرنورفین (۱ mg/kg) تزریق شد.

^۱ Sciatic nerve compression injury

آزمون پیاده روی^۲ و تعیین شاخص عملکردی عصب سیاتیک^۳

همه حیوانات قبل از عمل و بعد از عمل در هفته‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ تحت آزمون مسیر پیاده روی قرار گرفتند پنجه‌های عقب حیوان با جوهر رنگ شدند. به حیوان اجازه داده شد تا آزادانه در امتداد راهروی با ابعاد ۲۵ × ۱۰ × ۱۰۰ سانتی‌متر حرکت کند. سپس اثر ردپا موش‌های صحرایی برای تعیین شاخص عملکرد (SFI) ثبت گردید. ضایعه عصبی قطع شده به عنوان ۱۰۰- و گروه کنترل (گروه بدون آسیب عصب) به عنوان صفر تعریف شد. ترمیم عصب زمانی بهتر انجام می‌شود که SFI به صفر نزدیک‌تر شود (Azimpour et al., 2022).

آزمون بازیابی حسی

برای ارزیابی آستانه درد حرارتی و میزان بازیابی عملکردی نورون‌های حسی، تست صفحه‌ی داغ انجام شد. طوریکه موش‌های صحرایی به طور جداگانه بر روی صفحه داغ با دمای 52 ± 1 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تاخیر پاسخ به طور پرش پنجه عقبی ثبت شد. تاخیر پاسخ با یک کروномتر به صورت دستی ثبت گردید. این آزمون سه مرتبه با فاصله زمانی دو دقیقه تکرار شد، سپس میانگین زمان‌های تاخیر ثبت گردید. همچنین برای جلوگیری از آسیب، زمان قطع آزمایش ۱۲ ثانیه در نظر گرفته شد (Azimpour et al., 2022).

تعیین وزن عضله گاستروکنمیوس

در پایان هفته هشتم عضله گاستروکنمیوس پای راست (جراحی شده) و پای چپ (بدون آسیب عصب) جدا شد. سپس وزن مرطوب عضله گاستروکنمیوس بدست آمد. سپس نسبت توده عضلانی گاستروکنمیوس یعنی نسبت وزن عضله سمت راست به وزن عضله سمت چپ محاسبه شد (Azimpour et al., 2022).

آنالیز آماری

داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 23) و آنوای یک طرفه آنالیز شدند. همچنین آزمون تعقیبی توکی جهت تفکیک معنی دار بودن بین گروه‌های مختلف استفاده شد. سطح معنی‌داری ($P \leq 0.05$) در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین داده $\pm$ انحراف معیار بیان شد.

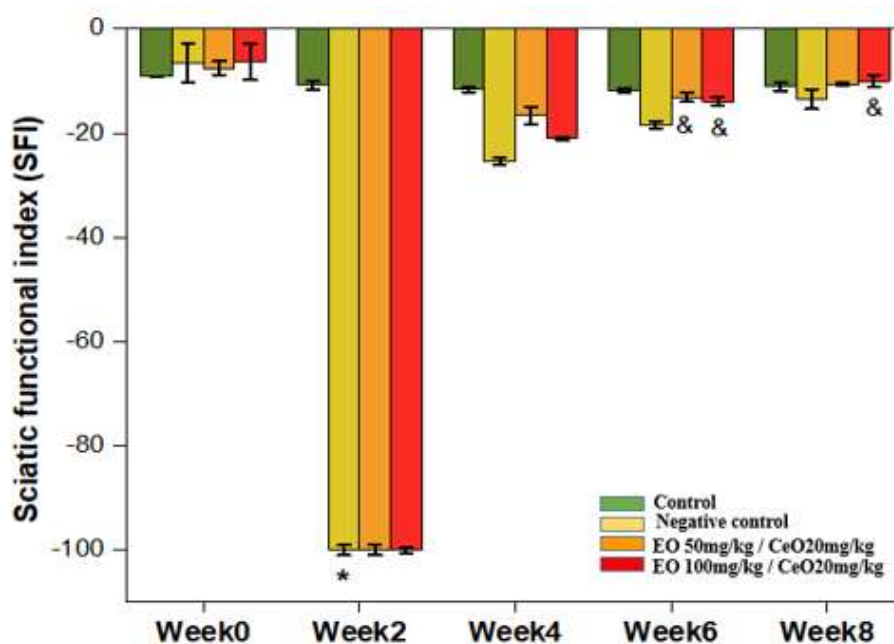
² Walking Track

³ Sciatic Functional Index (SFI)

نتایج

بررسی شاخص عملکردی عصب سیاتیک (SIF)

همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است در هفته ۲ شاخص عملکرد عصب سیاتیک در گروه کنترل منفی (مدل سیاتیک) نسبت به کنترل کاهش معنی داری یافت ($P \leq 0.05$). در حالی که از هفته دوم به بعد کاهش شاخص عملکرد سیاتیک نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود. تزریق (۵۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید (و ۱۰۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) در هفته ۲ باعث افزایش شاخص عملکرد سیاتیک نشد. در هفته ۴ افزایش در شاخص عملکرد سیاتیک در گروه دریافت کننده (۵۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید (و ۱۰۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) نسبت به کنترل منفی مشاهده شد اما معنی دار نبود. در هفته ۶ تزریق (۵۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید (و ۱۰۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) باعث بهبود شاخص عملکرد سیاتیک نسبت به کنترل منفی شد ($P \leq 0.05$). در نهایت در پایان هفته ۸ در موش‌های صحرایی دریافت کننده (۵۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید (و ۱۰۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) نسبت به کنترل منفی بهبود بیشتری در شاخص عملکرد سیاتیک مشاهده شد

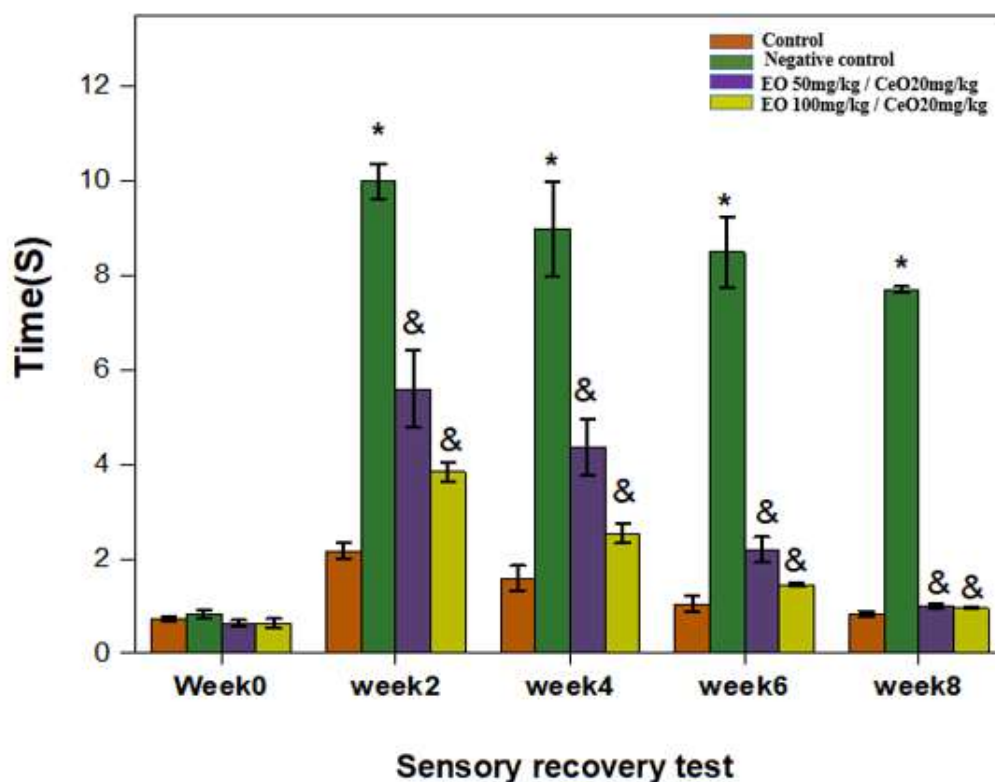


شکل ۱- شاخص عملکردی عصب سیاتیک در هفته های مختلف پس از عمل جراحی. نتایج حاصل به صورت میانگین داده ها $\pm$ انحراف معیار ارائه شدند ($P \leq 0.05$): * در مقایسه با کنترل منفی؛ & در مقایسه با کنترل منفی. (واحد اوژنول و نانوذره mg/kg).

Figure 1. Sciatic functional index (SFI) in different weeks after surgery. The results are presented as mean $\pm$ standard deviation of the mean (SEM) ($p < 0.05$). *: compared to control; &: compared to negative control.

ارزیابی میزان بهبود عملکرد حسی توسط آزمون صفحه داغ

داده‌های حاصل نشان داد در همه گروه‌های موش‌های صحرایی از هفته دوم به بعد بهبود مشاهده شد. در هفته ۲ در گروه‌های تحت درمان با (۵۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) و (۱۰۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) بهبود عملکرد حسی نسبت به گروه کنترل منفی بهتر بود ($P \leq 0.05$). همچنین در هفته ۴ بهبود عملکرد حسی بهتری در گروه‌های تحت درمان با (۵۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) و (۱۰۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) نسبت به گروه کنترل منفی مشاهده شد ($P \leq 0.05$). در هفته ۶ در گروه‌های دریافت کننده (۵۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) و (۱۰۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) نسبت به کنترل منفی بهبود عملکرد حسی افزایش یافت ($P \leq 0.05$). در نهایت بیشترین بهبود عملکرد حسی در پایان هفته ۸ در هر دو گروه موش‌های صحرایی دریافت کننده (۵۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید و ۱۰۰ mg/kg اوژنول / ۲۰ mg/kg نانوذرات سریم اکسید) ($p = 0.02$) نسبت به گروه کنترل منفی حاصل شد ($P \leq 0.05$) (شکل ۲).

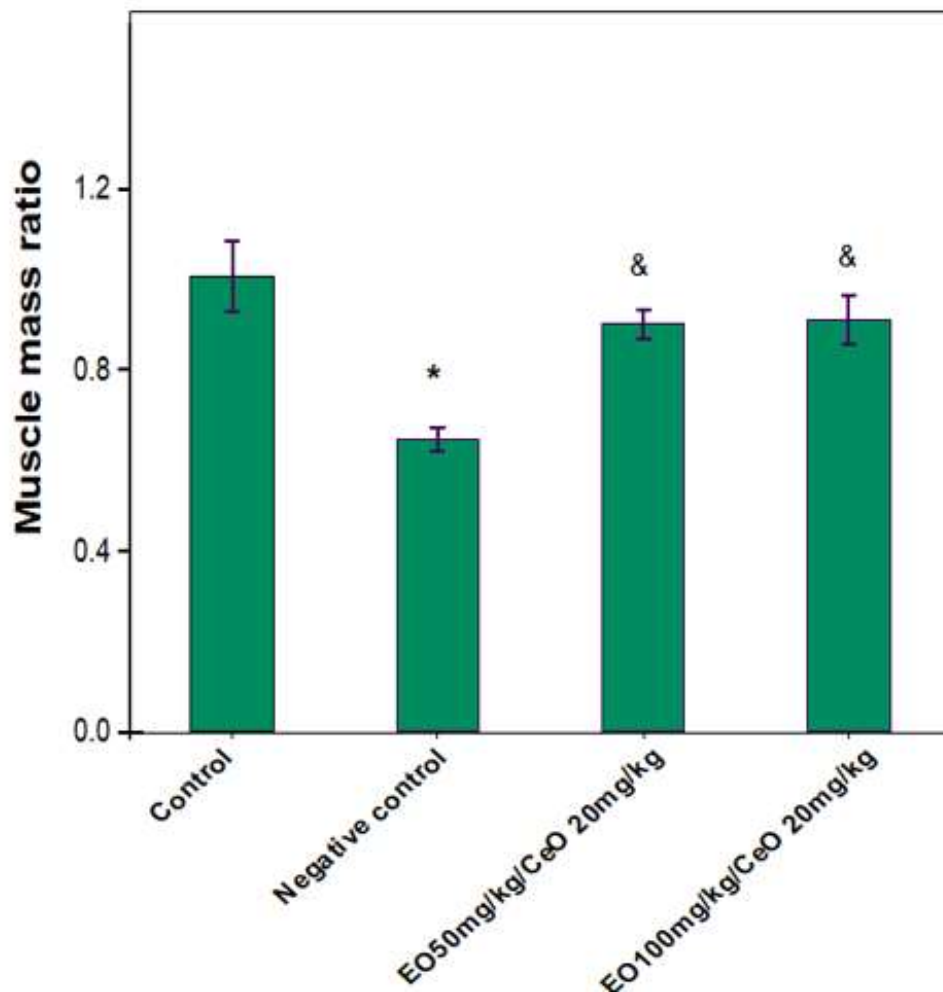


شکل ۲- بازیابی عملکرد حسی در هفته‌های مختلف پس از عمل جراحی. نتایج حاصل به صورت میانگین داده‌ها $\pm$ انحراف معیار ارائه شدند ($P \leq 0.05$). *: در مقایسه با کنترل منفی. &: در مقایسه با کنترل منفی. (واحد اوژنول و نانوذره mg/kg).

Figure 2. Recovery of sensory function in different weeks after surgery. The results are presented as mean $\pm$ standard deviation of the mean (SEM) ($p < 0.05$). *: compared to control; &: compared to negative control

بررسی توده عضله گاستروکنیموس

نتایج نشان داد که توده عضلانی در کنترل منفی نسبت به کنترل کاهش معنی داری یافت ($P \leq 0.05$). همچنین تزریق اوژنول/نانوذرات سریم اکسید باعث افزایش معنی داری در توده عضلانی نسبت به کنترل منفی شد. افزایش در هر دو گروه موش‌های صحرایی دریافت کننده (50 mg/kg اوژنول / 20 mg/kg نانوذرات سریم اکسید) و (100 mg/kg اوژنول / 20 mg/kg نانوذرات سریم اکسید) معنی دار بود ($P \leq 0.05$) (شکل ۳).



شکل ۳- نسب توده عضلانی ۸ هفته پس از عمل جراحی. نتایج حاصل به صورت میانگین داده‌ها $\pm$ انحراف معیار ارائه شدند ($P \leq 0.05$): * در مقایسه با کنترل؛ & در مقایسه با کنترل منفی. (واحد اوژنول و نانوذره mg/kg).

Figure 3. Muscle mass ratio 8 weeks after surgery. The results are presented as mean $\pm$ standard deviation of the mean (SEM) ($p < 0.05$). *: compared to control; &: compared to negative control.

بحث

نتایج حاصل نشان داد که در گروه مدل سیاتیک نسبت به گروه کنترل شاخص عملکرد سیاتیک و عملکرد حسی کاهش می‌یابد. همچنین آتروفی عضلانی در موش‌های صحرایی که جراحی شده بودند نسبت به کنترل بیشتر بود. این نتایج مطابق با

یافته‌های پیشین بود (Kizilay et al., 2019). تزریق نانوذرات سریم اکسید/ اوژنول به موش‌های صحرایی مدل سیاتیک باعث افزایش شاخص عملکرد سیاتیک و بازیابی عصب سیاتیک شد. همچنین در موش‌های دریافت کننده نانوذرات سریم اکسید/ اوژنول میزان آتروفی عضلانی کاهش یافته بود.

اختلال سیاتیک در اثر آسیب به اعصاب محیطی ایجاد می‌شود که می‌تواند باعث ایجاد درد در قسمت خلفی و جانبی ساق پا و قسمت کف می‌شود. اختلال سیاتیک مهم است که تشخیص داده شود ناشی از یک بیماری التهابی است یا بر اثر فشرده شدن مستقیم عصب رخ می‌دهد. در صورت تشخیص درست اقدامات درمانی مناسب نیز صورت می‌گیرد. (Davis et al., 2022). با این حال اختلال سیاتیک اغلب به دلیل التهاب بافت عصب است. طیف وسیعی از پروتئین‌های پیش التهابی از جمله اینترلوکین‌های IL-6, IL-8, β 1 و فاکتور نکروز تومور α -(TNF) در سرم افراد مبتلا به سیاتیک افزایش می‌یابد. همچنین مشاهده شده است که افزایش رادیکال‌های آزاد می‌تواند منجر به وخیم شدن عصب آسیب دیده شود (Jungen et al., 2019). تشخیص سیاتیک برای مدیریت درمان مهم است. اقدامات اولیه برای درمان شامل استراحت و استفاده از داروهای ضد التهابی است (Van et al., 2010). اما هیچکدام از این اقدامات برای درمان کامل اختلال سیاتیک کافی نیست. بنابراین ضروری است که برای شناسایی دارو و درمان آسیب عصب محیطی در همه زمینه‌ها مطالعاتی صورت گیرد. لذا در این تحقیق نیز رویکرد فناوری نانو و ترکیب گیاهی برای بررسی اختلال سیاتیک در نظر گرفته شده است.

امروزه استفاده از فناوری نانو در پزشکی گسترش یافته است. نانوداروها به عنوان رویکرد درمانی جدید به دلیل برخی از ویژگی‌های خاص مثل اثربخشی بیشتر با دوز کمتر و انتقال هدفمند به بافت‌ها نسبت به داروهای شیمیایی مورد توجه محققان قرار گرفته است. مطالعات پیشین نشان داده است که نانوذرات سریم اکسید دارای فعالیت آنتی اکسیدانی هستند که قادر به حذف انواع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) در مدل‌های سلولی و حیوانی هستند (Nelson et al., 2016). همچنین نانوذرات سریم اکسید خواص ضد التهابی از خود نشان می‌دهند که در درمان بیماری‌های التهابی ارزشمند است. بنابراین، بیشتر کاربردهای درمانی نانوذرات سریم اکسید بر اساس توانایی آنها در کاهش سطوح واسطه‌های التهابی مانند نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNOS)، فاکتور هسته ای کاپا (NF-KB)، فاکتور نکروز تومور α (TNF- α) و اینترلوکین‌ها است (Oró et al., 2016). اخیراً در مطالعه ای اثرات نوروپروتکتیو نانوذرات سریم اکسید در بهبود اعصاب محیطی گزارش شده است (Soluki et al., 2020). علاوه بر این، اثرات سایر نانوذرات نیز بر روی سیاتیک مطالعه شده است. نتایج یک مطالعه نشان می‌دهد که ترکیب نانوذره طلا و (Brain Derived Neurotrophic Growth Factor (BDNF)) باعث بازسازی اعصاب محیطی در موش‌های صحرایی شده است (Jahromi et al., 2021). همچنین در مطالعه دیگر اثر نانوذرات کبات و طلا بر ترمیم بافت عصبی گزارش شده است (Hazer Rosberg et al., 2021).

اوژنول (۴-آلیل-۲-متوکسی فنول) یک ترکیب معطر است که دارای فعالیت ضد تشنج و ضد میکروبی نیز است. علاوه بر این، فعالیت‌های ضد التهابی و آنتی اکسیدانی اوژنول شناخته شده است. مجموعه‌ای از شواهد نشان می‌دهد که اوژنول می‌تواند با افزایش بیان ژن فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) در هیپوکامپ در پیشگیری بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی مانند آلزایمر، پارکینسون و افسردگی نقش داشته باشد (Irie *et al.*, 2006). یافته‌ها نشان می‌دهد که مکانیسم حفاظتی اوژنول ممکن است تا حدی به کاهش تولید سیتوکین‌های پیش التهابی از طریق تنظیم التهاب و وضعیت ردوکس نسبت داده شود (Huang *et al.*, 2015). داده‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهند که این ترکیبات با سیگنال‌دهی TNF که منجر به فعال‌سازی NF-κB می‌شود، تداخل می‌کنند (Magalhães *et al.*, 2019; de Araújo Lopes *et al.*, 2018). همچنین مطالعات پیشین نشان داده ایزواوژنول از طریق تنظیم مسیرهای پیام رسان NF-κB، از جمله کیناز ERK1/2، I-κBα، p38، بیان iNOS را مهار می‌کنند (Choi *et al.*, 2007).

با توجه به اینکه آسیب عصب محیطی اغلب به دلیل التهاب رخ می‌دهد بنابراین مسیرهای التهابی در ایجاد آن می‌توانند نقش مهمی داشته باشند. مطالعه پیشین نیز نشان داده است که در افراد مبتلا به سیاتیک فاکتورهای پیش التهابی و شاخص‌های استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابند. همچنین در مطالعه‌ای که روی موش‌های صحرایی مدل سیاتیک انجام شده بود تایید شد که سریم اکسید باعث کاهش فاکتورهای التهابی و بهبود نورون‌های حسی و حرکتی می‌شود (Soluki *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2010). همچنین در تحقیق دیگری تزریق اوژنول به موش‌های صحرایی باعث ترمیم بافت عصبی شده است که خواص نوروپروتکتیو آن را تایید می‌کند (Alminderej *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2018). نتایج ما نیز نشان داد که تزریق اوژنول / سریم اکسید به موش‌های صحرایی مدل سیاتیک باعث بهبود عملکرد عصب سیاتیک شد. داروها می‌توانند اثرات خود را از مسیرهای واسطه‌ای مختلفی اعمال کنند. (Cui *et al.*, 2019). با توجه به اینکه یافته‌های پیشین ثابت کرده اند اعمال اثر اوژنول از طریق مسیرهای واسطه‌ای مختلفی صورت می‌گیرد. در این مطالعه نیز پیشنهاد می‌شود که احتمالاً یکی از مکانیسم عمل اوژنول / سریم اکسید از طریق تنظیم مسیر التهابی و NF-κB صورت می‌گیرد. فرض بر این است که اوژنول / سریم اکسید با کاهش فاکتورهای التهابی و مهار مسیر NF-κB باعث بازیابی عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی می‌شود. تحقیق در مورد عمل اوژنول / سریم اکسید توسط هر کدام از این مسیرهای واسطه‌ای برای مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود.

نتیجه گیری کلی

نتایج یافته‌های حاصل نشان داد که در موش‌های صحرایی دریافت کننده نانوذرات سریم اکسید و اوژنول بازیابی عصب سیاتیک با سرعت بیشتری رخ داد. با توجه به اینکه در تحقیق قبلی اثرات اوژنول و نانوذره سریم اکسید در بازیابی نورون‌های حسی و حرکتی در مدل سیاتیک مشاهده شده بود. در این تحقیق نیز تزریق همزمان اوژنول و نانوذرات سریم اکسید به

صورت هم افزایی شاخص عملکرد سیاتیک و بهبود عصب سیاتیک را افزایش داد. در نتیجه این ترکیب دارویی به عنوان یک گزینه درمانی برای آسیب اعصاب محیطی پیشنهاد می‌شود. همچنین برای تجویز انسانی نیازمند مطالعات بیشتر در این مورد است.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه محقق اردبیلی جهت حمایت مالی از این مقاله کمال تشکر و قدردانی را دارد.

عدم تعارض منافع

هیچگونه تضاد منافع وجود ندارد.

منابع

- Alminderej, F., Bakari, S., Almundarij, T. I., Snoussi, M., Aouadi, K. and Kadri, A. (2020). Antioxidant activities of a new chemotype of *Piper cubeba* L. fruit essential oil (Methyleugenol/Eugenol). In *Silico molecular docking and ADMET studies Plants*, 9(11): 1534.
- Alypoor, S., Abdolmaleki, A., Mamoudi, F., Haghighat, K., Soluki, M. (2023). Evaluation of the Neuroprotective Effect of Eugenol on the Improvement of Sciatic Nerve Injury in Rats. *Iranian Journal of Toxicology*, 17(3):53-59.
- Azimpour, M., Mahmoudi, F., Abdolmaleki, A. and Bayrami, A. (2022). Thyroxine accelerates functional recovery in a rat model of sciatic nerve crush. *Turk Neurosurg*, 32(2): 298-304.
- Babazadeh, A., Vahed, F. M., Liu, Q., Siddiqui, S. A., Kharazmi, M. S. and Jafari, S. M. (2023). Natural Bioactive Molecules as Neuromedicines for the Treatment/Prevention of Neurodegenerative Diseases. *ACS omega*, 8(4): 3667-3683.
- Barot, J. and Saxena, B. (2021). Therapeutic effects of eugenol in a rat model of traumatic brain injury: A behavioral, biochemical, and histological study. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 11(4): 318-327.
- Beltrán-Gracia, E., López-Camacho, A., Higuera-Ciapara, I., Velázquez-Fernández, J. B. and Vallejo-Cardona, A. A. (2019). Nanomedicine review: Clinical developments in liposomal applications. *Cancer Nanotechnology*, 10(1): 1-40.
- Choi, C. Y., Park, K. R., Lee, J. H., Jeon, Y. J., Liu, K. H., Oh, S. and Yea, S. S. (2007). Ioeugenol suppression of inducible nitric oxide synthase expression is mediated by down-regulation of NF- κ B, ERK1/2, and p38 kinase. *European journal of pharmacology*, 576(1-3): 151-159.
- Cui, Z., Liu, Z., Zeng, J., Chen, L., Wu, Q., Mo, J. and Guo, X. (2019). Eugenol inhibits non-small cell lung cancer by repressing expression of NF- κ B-regulated TRIM59. *Phytotherapy Research*, 33(5): 1562-1569.
- Davis, D., Maini, K., Vasudevan, A. (2022) Sciatica. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing. Treasure Island (FL), 29939685.
- de Araújo Lopes, A., da Fonseca, F. N., Rocha, T. M., de Freitas, L. B., Araújo, E. V. O., Wong, D. V. T., & Leal, L. K. A. M. (2018). Eugenol as a promising molecule for the treatment of dermatitis: antioxidant and anti-inflammatory activities and its nanoformulation. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Estevez, A. Y., Pritchard, S., Harper, K., Aston, J. W., Lynch, A., Lucky, J. J., Ludington, J.S., Chatani, P., Mosenthal, W.P., Leiter, J.C., Andreescu, S., Erlichman, J. S. (2011). Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(6): 1155-1163.
- Fernandez, M., Hartvigsen, J., Ferreira, M. L., Refshauge, K. M., Machado, A. F., Lemes, Í. R. and Ferreira, P. H. (2015). Advice to stay active or structured exercise in the management of sciatica. *Spine*, 40(18): 1457-1466.

- Hazer Rosberg, D. B., Hazer, B., Stenberg, L. and Dahlin, L. B. (2021). Gold and cobalt oxide nanoparticles modified poly-propylene glycol membranes in poly (ϵ -Caprolactone) conduits enhance nerve regeneration in the sciatic nerve of healthy Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13): 7146.
- Hekmatimoghaddam, S., Iman, M., Sardo, H. S. and Jebali, A. (2019). Gelatin hydrogel containing cerium oxide nanoparticles covered by interleukin-17 aptamer as an anti-inflammatory agent for brain inflammation. *Journal of neuroimmunology*, 326: 79-83.
- Huang, X., Liu, Y., Lu, Y. and Ma, C. (2015). Anti-inflammatory effects of eugenol on lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in acute lung injury via regulating inflammation and redox status. *International immunopharmacology*, 26(1): 265-271.
- Irie, Y. (2006). Effects of eugenol on the central nervous system: its possible application to treatment of Alzheimer's disease, depression, and Parkinson's disease. *Current Bioactive Compounds*, 2(1): 57-66.
- Jahromi, M., Razavi, S., Seyedebrahimi, R., Reisi, P. and Kazemi, M. (2021). Regeneration of rat sciatic nerve using PLGA conduit containing rat ADSCs with controlled release of BDNF and gold nanoparticles. *Journal of Molecular Neuroscience*, 71: 746-760.
- Jensen, R. K., Kongsted, A., Kjaer, P. and Koes, B. (2019). Diagnosis and treatment of sciatica. *bmj*, 367.
- Jungen, M. J., Ter Meulen, B. C., Van Osch, T., Weinstein, H. C., & Ostelo, R. W. (2019). Inflammatory biomarkers in patients with sciatica: a systematic review. *BMC musculoskeletal disorders*, 20: 1-9.
- Kizilay, Z., Aktas, S., Cetin, N. K., Kilic, M. A. and Ozturk, H. (2019). Effect of *Tarantula cubensis* extract (Theranechron) on peripheral nerve healing in an experimental sciatic nerve injury model in rats. *Turk Neurosurg*, 29(5): 743-749.
- Ma, L., Mu, Y., Zhang, Z. and Sun, Q. (2018). Eugenol promotes functional recovery and alleviates inflammation, oxidative stress, and neural apoptosis in a rat model of spinal cord injury. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 36(5): 659-668.
- Magalhães, C. B., Casquilho, N. V., Machado, M. N., Riva, D. R., Travassos, L.H., Leal-Cardoso, J.H., Fortunato, R.S., Faffe, D.S., Zin, W. A. (2019). The anti-inflammatory and anti-oxidative actions of eugenol improve lipopolysaccharide-induced lung injury. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 259:30-36.
- Mishra, P. and Stringer, M. D. (2010). Sciatic nerve injury from intramuscular injection: a persistent and global problem. *International journal of clinical practice*, 64(11): 1573-1579.
- Nelson, B. C., Johnson, M. E., Walker, M. L., Riley, K. R. and Sims, C. M. (2016). Antioxidant cerium oxide nanoparticles in biology and medicine. *Antioxidants*, 5(2): 15.
- Oró, D., Yudina, T., Fernández-Varo, G., Casals, E., Reichenbach, V., Casals, G., Presa, B.G., Sandalinas, S., Carvajal, S., Puentes, V., Jiménez, W. (2016). Cerium oxide nanoparticles reduce steatosis, portal hypertension and display anti-inflammatory properties in rats with liver fibrosis. *Journal of hepatology*, 64(3): 691-698.
- Ostelo, R. W. (2020). Physiotherapy management of sciatica. *Journal of physiotherapy*, 66(2): 83-88.
- Park, E. J., Cho, W. S., Jeong, J., Yi, J. H., Choi, K., Kim, Y. and Park, K. (2010). Induction of inflammatory responses in mice treated with cerium oxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Journal of Health Science*, 56(4): 387-396.
- Pinto, R. Z., Maher, C. G., Ferreira, M. L., Ferreira, P. H., Hancock, M., Oliveira, V. C. and Koes, B. (2012). Drugs for relief of pain in patients with sciatica: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, 344.
- Poutoglidou, F., Piagkou, M., Totlis, T., Tzika, M. and Natsis, K. (2020). Sciatic nerve variants and the piriformis muscle: a systematic review and meta-analysis. *Cureus*, 12(11).
- Soluki, M., Mahmoudi, F., Abdolmaleki, A., Asadi, A. and Sabahi Namini, A. (2020). Cerium oxide nanoparticles as a new neuroprotective agent to promote functional recovery in a rat model of sciatic nerve crush injury. *British Journal of Neurosurgery*, 1-6.
- Taleuzzaman, M., Jain, P., Verma, R., Iqbal, Z. and Mirza, M. (2021). Eugenol as a potential drug candidate: A review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 21(20): 1804-1815.
- Valat, J. P., Genevay, S., Marty, M., Rozenberg, S. and Koes, B. (2010). Sciatica. Best practice & research *Clinical rheumatology*, 24(2): 241-252.
- Van Tulder, M., Peul, W. and Koes, B. (2010). Sciatica: what the rheumatologist needs to know. *Nature reviews Rheumatology*, 6(3): 139-145.

An investigation of synergistic effects of cerium oxide nanoparticles and eugenol on the recovery of sensory and motor neuron function in sciatic nerve compression rat model

Soheila Alypoor¹, Fariba Mahmoudi ^{1*}, Arash Abdolmaleki^{1,2}, Khadijeh Haghighat ¹

Received: 2023-02-14

Accepted: 2021-05-15

Abstract

Introduction: Improvement of peripheral nerve damage is one of the most important challenges clinically. Using new methods such as Nano drugs and natural compounds can be a suitable option due to their effective effects and less side effects. In this study, the synergistic effects of eugenol and cerium oxide nanoparticles was investigated on sciatic nerve recovery in a rat model. **Method and material:** In this study, twenty-eight male rats weighing 250-300 g were divided into four groups (n=7). The control group and sciatica model injected saline (0.5ml, IP). Two groups model sciatic received intraperitoneally (50 mg/kg eugenol and 20 mg/kg cerium oxide nanoparticles) or (100 mg/kg eugenol and 20 mg/kg cerium oxide nanoparticles). Then sensory and motor behavioral tests performed. The muscle tissue removed. Finally, changes in muscle weight investigated. The study was conducted under supervision of Research Ethics Committee of the University of Mohaghegh Ardabili (code: IR.UMA.REC.1400.029). **Results:** Intraperitoneal injection of eugenol plus cerium oxide nanoparticles increased the recovery speed of sensory and motor neurons compared to the sciatica model group. Also, in the group receiving eugenol plus cerium oxide the amount of muscle atrophy was lower. The improvement of nerve tissue was significant in the high-dose group. **Conclusion:** The results showed that eugenol/cerium oxide accelerates the regeneration of nerve tissue. Therefore, its neuroprotective potential can be used to treat diseases related to peripheral nerve damage.

Keywords: *Cerium Oxide, Eugenol, Nanoparticles, Sciatic*

1-M.Sc student, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2-Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(*Correspondence: f.mahmoudi@uma.ac.ir)

3-Associate Professor, Department of Engineering Sciences, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran

4-Ph.D student, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

1.Optimization of uranium biosorption process by autoclaved *Micrococcus Luteus* biomass using response surface methodology

Parisa Tajer-Mohammad-Ghazvini, Zahra Shiri-Yekta, Shaghayegh Nasr, Narges Eslami, Mansoureh Hosseini

2. Assessment of antimicrobial activity of new derivatives of ciprofloxacin

Shaghayegh Chahmaghi, Moj Khaleghi, Hojatollah Khabazzadeh

3.Comparison of chemical compounds, antioxidant and antimicrobial effects of *Camellia sinensis* black tea and green tea leaf extract on plant pathogenic bacteria (*Xanthomonas campestris* and *Pseudomonas syringae*) and human pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*)

Masoud Haidarizadeh, Fatemeh Alijani, Morahem Ashengroph Sajjad Atashi

4.Cannibalistic behavior of the yellow mealworm beetle, *Tenebrio molitor* Linnaeus, under laboratory condition

Raziye Rashidi Ilzoleh, Vahid Akmal

5.Effect of freezing stress on some physiological and enzymatic responses of ornamental plants, viola (*Viola × wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*)

Behrooz Salehi-Eskandari, Zohreh Nasirian Jazi, Jalil Abbaspour

6.Investigation on the effects of simultaneous adding of α -tocopherol (vitamin E) and Multi-walled carbon nano tubes (MWCNT) on the mechanical properties and biocompatibility of the ultra-high molecular weight polyethylene polymer matrix (UHMWPE) in joint replacements

M.Fakoori, M.khorasani, M. Kamali dolat abadi

7.The Role of Growth Regulators in Optimization of Callus Production in Medicinal Plant of Red Rubin Basil (*Ocimum basilicum* L.)

Mehdi Kakaei, Fatemeh Hajmoradi, Mohsen Mansouri and Mohamad Ali Ebrahimi

8.The effect of the storage method of Nile red solution on the fluorescence intensity in the detection of intracellular lipids

Zohreh Noruzi Motlagh, Mahmood Akhavan Mahdavi, Reza Gheshlaghi

9.Comparison of biological activity in extracts from *Chlorella* and *Spirulina* algae the related algal biomass before and after proteolysis

Tayebeh Hadi Toranposhti, Fakhri Sadat Hosseini, Fatemeh Safakhah

10.An investigation of synergistic effects of cerium oxide nanoparticles and eugenol on the recovery of sensory and motor neuron function in sciatic nerve compression rat model

Soheila Alypoor, Fariba Mahmoudi, Arash Abdolmaleki, Khadijeh Haghighat