



Investigation of antimicrobial and antioxidant properties of exosomes and extracts prepared from medicinal plants: *Zingiber officinale*, *Lavandula angustifolia*, *Allium cepa*, and *Citrus limon*

Mardani SH^a, Hanachi P^{*b}, Ramezani R^c, Mobarak Qamsari E^d

^a Master's in Biochemistry, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

^b Full Professor of Biochemistry, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

^c Assistant Professor of Nanobiotechnology, Department of Family Therapy, Women's Research Center, Alzahra University, Tehran, Iran.

^d Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation Mardani SH, Hanachi P, Ramezani R, Mobarak Qamsari E: Investigation of antimicrobial and antioxidant properties of exosomes and extracts prepared from medicinal plants: *Zingiber officinale*, *Lavandula angustifolia*, *Allium cepa*, and *Citrus limon*. Journal of Cell and Tissue . 2026; 17(1):59-79.

<https://doi.org/10.61882/JCT/17..1.59>

KEYWORDS

Antimicrobial activit
Antioxidant
Citrus limon
Exosomes
Plant extract

ABSTRACT

Introduction: Plant-derived exosome-like nanoparticles (PDENs) are nano-sized vesicles released by plant cells. They contain a lipid bilayer membrane and carry bioactive molecules such as proteins, lipids, nucleic acids, and secondary metabolites. Due to their low toxicity and natural drug delivery potential, they have gained attention for therapeutic applications. Plant extracts are also rich in phenolic compounds and flavonoids with known antioxidant and antimicrobial effects. The rising problem of antibiotic resistance in pathogens like *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pyogenes* has created an urgent need for new natural agents.

Aim: This study aimed to isolate and characterize exosomes from ginger, lavender, onion, and lemon, and to compare their antioxidant and antibacterial activities with those of aqueous extracts from the same plants.

Materials and methods: Fresh ginger, lavender, onion, and lemon were used for the preparation of plant extracts and exosome isolation. For aqueous extraction, 2 g of ginger and lavender samples were homogenized with 20 mL of distilled water and incubated in a water bath at 70°C for 90 minutes. The

* Corresponding author. Tel.:021-8844040 Fax: 021-88058912

E-mail address: p.hanachi@alzahra.ac.ir

DOI: : <https://doi.org/10.61882/JCT/17.1.59>

Received:9 Oct. 2025 ; Received in revised form: 26 Feb. 2026; Accepted: 6 May. 2026

Original Article

© Author



mixtures were centrifuged at $3000 \times g$ for 10 minutes, and the supernatants were filtered and stored at 4°C until analysis. Exosomes were isolated using the Exosun Exosome Isolation Kit (EXOSUN Company). Plant materials were homogenized, filtered, and subjected to differential centrifugation. The resulting supernatants were processed according to the manufacturer's instructions using buffers A and B. Due to the acidic nature of lemon juice, modification of the protocol was required by increasing the concentration of buffer A to facilitate exosome precipitation. Protein concentration of isolated exosomes was determined using the Bradford assay with bovine serum albumin (BSA) as the standard. Exosome morphology was characterized by transmission electron microscopy (TEM). The antioxidant activity of extracts and exosomes was evaluated using the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay. Samples were analyzed in 96-well microplates, and absorbance was measured at 570 nm. Antibacterial activity was assessed against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pyogenes* using the disk diffusion method. Sterile blank disks were impregnated with plant extracts or exosome preparations at concentrations of 25, 50, and 100 mg/mL and placed on Mueller-Hinton agar plates inoculated with bacterial suspensions adjusted to a 0.5 McFarland standard. Gentamicin and vancomycin served as positive controls. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values were determined using the broth microdilution method in 96-well microplates. All experiments were performed in triplicate. Statistical analyses were conducted using SPSS version 27, applying one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, with $p < 0.05$ considered statistically significant.

Results: TEM confirmed successful isolation of exosome-like vesicles from all plants. Bradford assay indicated protein-containing nanoparticles. FRAP analysis showed that lavender had the highest antioxidant capacity. Plant extracts generally showed greater antioxidant activity than their corresponding exosomes. Antibacterial testing revealed that exosomes from all four plants had no detectable antibacterial effect. Similarly, aqueous extracts of ginger, lavender, and onion showed no inhibition. However, lemon extract exhibited significant antibacterial activity against all three bacteria. MIC values of lemon extract were 3.12 mg/mL for *S. aureus*, 6.25 mg/mL for *S. pyogenes*, and 50 mg/mL for *E. coli*. Inhibition zones for *S. aureus* reached 22 mm at 100 mg/mL. Gram-positive bacteria were more susceptible than Gram-negative *E. coli*.

Discussion: The spread of antibiotic-resistant pathogens has increased the need for new treatments. In this study, exosomes isolated from ginger, lavender, onion, and lemon showed no antibacterial activity, while among aqueous extracts, only lemon extract displayed good antibacterial properties. The lack of activity in aqueous lavender extract compared to alcoholic extracts in previous reports may be due to solvent differences affecting phenolic compound extraction. Aqueous ginger extract also showed no effect, which contrasts with some alcoholic extracts. However, lavender exosomes demonstrated the highest antioxidant capacity among all samples, highlighting their potential for antioxidant applications.

Conclusion: Although plant-derived exosomes from these four species did not show antibacterial effects under the tested conditions, lemon aqueous extract exhibited promising antimicrobial activity, especially against Gram-positive bacteria. Lavender exosomes showed the strongest antioxidant potential. These findings suggest that lemon extract could serve as a natural antibacterial agent, while lavender-derived exosomes and extracts may be valuable sources of natural antioxidants. Further in vivo studies are needed to explore their efficacy and safety.



بررسی خواص ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانتی اگزوزومها و عصاره تهیه شده از گیاهان دارویی زنجبیل، اسطوخودوس، پیاز و لیمو ترش شقایق مردانی^۱، پریچهر حناچی^{۲*}، ریحانه رضانی^۳، الهه مبارک قمصری^۴

۱ دانشجوی ارشد بیوشیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
 ۲ استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران p.hanachi@alzahra.ac.ir
 ۳ استادیار گروه خانواده درمانی، پژوهشکده زنان، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران re.ramezani@alzahra.ac.ir
 ۴ استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: هدف از این پژوهش، عصاره‌گیری و استخراج اگزوزوم از زنجبیل، اسطوخودوس، پیاز و لیموترش و بررسی خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانتی آن‌ها بود. مواد و روش‌ها: ابتدا عصاره‌ها با روش بن‌ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد و سانتریفیوژ در ۳۰۰۰g تهیه شدند. اگزوزومها با کیت اگزوسان استخراج و خالص‌سازی شدند. برای استخراج اگزوزوم سانتریفیوژ انجام و بافرها اضافه شد سپس با استفاده از تکنیک (TEM) Transmission electron microscopy اگزوزومها شناسایی شدند. فعالیت ضد باکتریایی این اگزوزوم و عصاره‌ها در برابر گونه‌های گرم مثبت و گرم منفی، از جمله <i>Escherichia coli</i> و <i>Streptococcus pyogenes</i> به روش تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) Inhibitory Concentration و انتشار دیسک بررسی شد. در روش انتشار دیسک روی هر دیسک بلانک ۵۰ میکرولیتر از اگزوزوم و عصاره‌ها در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ریخته شد. با استفاده از کیت اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی TAC میزان آنتی‌اکسیدانت عصاره‌ها و اگزوزومها اندازه‌گیری شد. آزمون واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی توکی با شرط آماری $p < 0.05$ انجام شد. نتایج: نتایج نشان دادند که تنها عصاره لیمو خاصیت ضد باکتریایی داشت. اگزوزومهای زنجبیل، اسطوخودوس، پیاز و لیموترش فاقد خاصیت ضد باکتریایی بودند.</p> <p>MIC لیمو در استافیلوکوکوس اورئوس ۳.۱۲ mg/ml و در اشرشیاکلی ۵۰ mg/ml و در استرپتوکوکوس پیوژنز 6.25mg/ml به دست آمد. آزمون آنتی‌اکسیدانتی، اگزوزوم اسطوخودوس بیشترین ظرفیت را از خود نشان داد. نتایج در جدول و نمودارها نشان داده شد. نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که اگرچه اگزوزومهای گیاهی خاصیت ضد باکتریایی قابل توجهی نداشتند، اما دارای اثرات آنتی‌اکسیدانتی مهمی بودند؛ بنابراین می‌توان از آن‌ها به عنوان حامل‌های زیستی در دارورسانی هدفمند بهره برد. لازم است مطالعات بیشتری در زمینه ساختار و عملکرد این نانوذرات انجام شود.</p>	<p>آنتی اکسیدانت اگزوزوم عصاره گیاهی فعالیت ضد باکتریایی لیموترش</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۷ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۲/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۶</p>

۱- مقدمه

اگزوزومها ذراتی با اندازه تقریبی ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که از انواع سلولهای مختلف به محیط خارج سلولی ترشح می‌شوند. این وزیکولها ماهیت غشای لیپیدی داشته و می‌توانند با غشای سلول ادغام شوند. همچنین این وزیکولها غنی از لیپیدهای CD81 (Cluster of Differentiation 81) و CD9 (Cluster of Differentiation 9) و اسفنگومیلین هستند و در ارتباطات سلولی، تنظیم عملکرد ایمنی، مهاجرت توموری و تعدیل واکنش‌های دارویی نقش دارند، اما عصاره گیاهی به تمام موادی گفته می‌شود که طی فرایند استخراج از فضای سلولی گیاه جدا شده و به‌خارج از بافت انتقال می‌یابد، که عصاره‌ها حاوی مجموعه‌ای از متابولیت‌های اولیه و متابولیت‌های ثانویه هستند (۱).

گیاهان به‌دلیل فواید بی‌شمارشان، توجه زیادی را در تحقیقات زیست‌پزشکی به خود جلب کرده‌اند. وزیکول‌های مشتق‌شده از گیاهان، وزیکول‌های کوچک در مقیاس نانو هستند که توسط سلول‌های گیاهی ترشح می‌شوند (۱). آن‌ها همچنین نویدبخش درمان بیماری‌ها هستند و ساختارهای وزیکولی آن‌ها، آن‌ها را به حامل‌های مناسبی برای دارورسانی تبدیل می‌کند و تولید در مقیاس بزرگ را امکان‌پذیر کرد. کشف وزیکول‌های اگزوزوم مانند در گیاهان، به سال‌ها پیش از مشاهده آن‌ها در سلول‌های پستانداران باز می‌گردد ادغام این ساختارها با غشای سلولی، منجر به آزادسازی وزیکول‌های اگزوزوم مانند به فضای خارج سلولی می‌شود (۲).

برای مقاصد و کاربردهای مختلف، روش‌های جداسازی متفاوتی برای اگزوزوم انتخاب می‌شوند که در میان آن‌ها روش‌های اولترا سانتریفیوژ، روش‌های جداسازی مبتنی بر اندازه، رسوب پلیمری، تکنیک‌های جذب ایمنی بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳).

شیوع پاتوژن‌های عفونی جدی، از جمله *اشریشیاکلی* (*E. coli*) و *استرپتوکوک پیوژنز* (*S. pyogenes*)، باعث افزایش شدید بیماری و مرگ‌ومیر در سراسر جهان می‌شود. همچنین افزایش نگران‌کننده‌ای در میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی دیده می‌شود. *اشریشیاکلی* بخشی از فلور باکتریایی طبیعی موجود در دستگاه گوارش است باین‌حال، برخی از سویه‌های *E. coli* قادر به تولید سمومی هستند که ممکن است منجر به عفونت‌های جدی شوند. سویه‌های باکتری *E. coli* در بیماری‌های اسهالی نقش دارند (۴).

مطالعه‌های انجام شده توسط مصدق پور و همکاران (۵) درصد عفونت‌های بیمارستانی در ایران را بین ۰/۳۲ و ۹/۱ گزارش کردند. شیوع عفونت بیمارستانی در بیمارستان‌های ایران بر اساس مدل تصادفی ۰/۰۱ درصد به‌دست آمد. شایع‌ترین نوع عفونت مربوط به دستگاه ادراری و شایع‌ترین نوع میکروارگانسیم *اشریشیاکلی* بود. میزان شیوع *E. coli* (عفونت‌های گوارشی) در ایران بر اساس سایت WHO، ۳۰ درصد است (۶).

استرپتوکوک پیوژنز که به‌عنوان *استرپتوکوک گروه A* شناخته می‌شود، مسئول طیف وسیعی از تظاهرات بالینی از بیماری‌های کم‌خطرتر از جمله گلورد، فارنژیت، التهاب لوزه، تب مخملک، زردزخم و سلولیت تا بیماری‌های جدی‌تر مانند سپسیس، مننژیت، ذات‌الریه و فاشئیت نکروزان است (۷).

بسیاری از مطالعات، فعالیت‌های درمانی لیموترش (لیمون) از جمله فعالیت‌های ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضد سرطانی و ضد انگلی را به‌دلیل وجود محتوای بالای فنلی عمدتاً فلاونوئیدها (به‌عنوان مثال، دیوزمین، هسپریدین، لیموسیتین) و اسیدهای فنولیک (به‌عنوان مثال، فرولیک، سیناپیک، اسیدهای p-هیدروکسی بنزوئیک) گزارش کرده‌اند (۸). علاوه بر این، پوست لیموترش به‌دلیل داشتن انواع مختلف مواد مغذی و فیتوشیمیایی از جمله β - و γ -سیتوسترول، انواع مختلف روغن‌های فرار و گلیکوزیدها، در درمان بیماری‌های مختلف مانند اسکوربوت، مشکلات تنفسی، سوء هاضمه، عفونت چشم و بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود (۹).

زنجبیل گیاهی است که از ریزوم آن به‌عنوان ادویه و دارو استفاده فراوانی شده است. حدود ۴۰۰ ترکیب فعال زیستی در زنجبیل کشف شده است که فواید سلامتی بالقوه‌ای مانند اثرات ضد التهابی، ضد توموری، ضد چاقی و ضد دیابت و غیره را نشان داده است (۱۰). گزارش شده است که زنجبیل به‌دلیل وجود جینجرول و پارادول، شوگاول و زینجرون دارای پتانسیل ضدباکتریایی

است که می‌تواند از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها جلوگیری کند. فعالیت بالقوه در برابر بسیاری از باکتری‌های گرم منفی مانند *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus* و باکتری‌های گرم مثبت مانند *Pseudomonas*، *Helicobacter pylori*، *Staphylococcus epidermidis* نشان می‌دهد (۱۱). دلیل انتخاب لیمو در این پژوهش به دلیل وجود محتوای بالای فنلی عمدتاً فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک است که خاصیت ضد باکتریایی دارند. دلیل انتخاب زنجبیل ترکیبات غیر فرار مانند جینجرول‌ها، شوگائول‌ها، پارادول‌ها و زینگرون که اثرات آنتی‌اکسیدانتی دارند.

پیاز (*Allium cepa*) از قدیمی‌ترین گیاهان کشت‌شده است و برای اهداف متعددی مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر اثرات تغذیه‌ای، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانتی و ضدباکتریایی پیاز نیز مطرح شده و همچنان به‌طور گسترده مورد بررسی قرار می‌گیرد (۱۲).

هدف از این پژوهش در مرحله اول عصاره‌گیری و استخراج اگزوزوم از زنجبیل و اسطوخودوس و پیاز و لیموترش بود. سپس تست‌های شناسایی اگزوزوم انجام شد. از طرفی محتوی آنتی‌اکسیدانتی FRAP نیز در اگزوزوم و عصاره‌ها بررسی شد. همچنین اثر عصاره‌ها و اگزوزوم‌ها بر باکتری‌های *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* و *Sterptococcus* جهت سنجش خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌ها و اگزوزوم‌ها بررسی شد.

در این پژوهش برای اولین بار بین عصاره‌ها و اگزوزوم‌های چهار گیاه مقایسه انجام شد همچنین تاکنون روی تأثیر اسطوخودوس و زنجبیل بر روی *Sterptococcus*، *Escherichia coli* کار نشده است.

۲- مواد و روش‌ها

تمام آزمایش‌های انجام شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه الزهرا تأیید شد. شماره کد اخلاق (IR.ALZAHRA.REC.1403.053)

تهیه عصاره: مقدار ۲ گرم از اسطوخودوس و زنجبیل را با ۲۰ میلی‌لیتر آب آسیاب شد و درون دستگاه بن‌ماری در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد. پس از آن نمونه درون دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰g دور قرار داده شد و در آخر مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ از صافی گذرانده شد. عصاره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان تجزیه و تحلیل نگهداری شد (۱۳).

روش تخلیص اگزوزوم‌های زنجبیل، اسطوخودوس، لیموترش و پیاز: با استفاده از کیت اندازه‌گیری اگزوسان از شرکت EXOSUN اگزوزوم‌ها استخراج شد. در ابتدا زنجبیل و اسطوخودوس تازه را آسیاب کرده و آب لیموترش و پیاز گرفته شد و از صافی عبور داده شد. محلول عبوری از صافی را با سرعت 3000 g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب را دور ریخته و محلول رویی با شدت ۷۰۰۰g به مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بافر B کیت اگزوسان به نسبت ۱ به ۸ به محلول رویی مرحله قبل افزوده و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل با شدت ۷۰۰۰g به مدت دو ساعت سانتریفیوژ شد. بافر A کیت اگزوسان را به نسبت ۱ به ۸ به محلول رویی مرحله قبل اضافه شد (۱۴) ولی در لیموترش به دلیل اسیدیته با نسبت ۱ به ۸ بافر A اگزوزوم استخراج نشد بافر A به نسبت ۱ به ۱ اضافه شد که غلظت پلیمر بالا برود و اگزوزوم‌ها رسوب کنند.

تست برادفورد: برای تعیین غلظت پروتئین‌های اگزوزوم‌ها پس از جداسازی و تخلیص، از تکنیک برادفورد استفاده شد. ابتدا غلظت‌های (μg/ml) ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ از محلول استاندارد پروتئین BSA در حجم‌های ۵۰۰ μL در شش ویال متفاوت آماده گشت. ویال هفتم نیز از ۵۰۰ میکرولیتر بافر PBS به‌عنوان بلانک پر شد. در هر خانه از پلیت الیزا ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از معرف A (I) کیت برادفورد ریخته و سپس ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های استاندارد BSA، PBS، محلول اگزوزوم حل شده در بافر C و همچنین بافر C به‌تنهایی اضافه شد و چندمرتبه پی‌پتینگ اجرا

شد. انکوباسیون پلیت الایزا به مدت ۵ دقیقه و در دمای اتاق بود و در نهایت توسط دستگاه خوانش الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش انجام شد (۱۵).

شناسایی اگزوزوم

استفاده از میکروسکوپ TEM: در آنالیز TEM (Transmission electron microscopy)، اگزوزومها به طور خلاصه در پارافرمالدهید ۲ درصد تیمار شدند، روی شبکه‌های TEM با پوشش کربن Formvar قرار داده شدند و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس اگزوزومها با گلو تار آلدهید انکوبه، شسته، در هوا خشک و با اورانیل استات رنگ آمیزی شدند (۱۶).

سنجش ظرفیت تام اکسیدانتی به روش FRAP: با استفاده از کیت اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی اکسیدانتی (TAC) از شرکت نوند سلامت میزان آنتی اکسیدانت عصاره‌ها و اگزوزوم اسطوخودوس و زنجبیل اندازه‌گیری شد. برای تهیه معرف FRAP ۵۰ میلی‌لیتر از بافر استات ۳۰۰ مولار را با ۵ میلی‌لیتر FeCl₃ ۴۰ میلی‌مولار ۵ میلی‌لیتر محلول TPTZ ۱۰ میلی‌مولار ترکیب و پس استاندارددها تهیه می‌شود.

در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ای ۵ μL از عصاره‌ها و اگزوزومها با غلظت ۱۰۰ ریخته شد و در ادامه به همهی خانه‌های حاوی نمونه یا استاندارد ۲۵۰ میکرو لیتر از محلول کار آماده شده را اضافه کرده تغییر رنگ بنفش نشان دهنده خاصیت آنتی اکسیدانتی است بعد جذب آن‌ها پس از ۵ دقیقه در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد (۱۷).

تست ضد باکتریایی به روش انتشار دیسک: برای انجام این تست در پلیت‌های ۱۰ سانتی‌متر پلیت با محیط کشت مولر هینتون آگار پر گردید. سپس باکتری‌های مورد مطالعه با غلظت نیم مک فارلند بر روی پلیت‌ها به صورت چمنی کشت داده شدند. سپس روی هر دیسک بلانک ۵۰ μL از اگزوزوم و عصاره‌ها در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ ریخته شد و پس از جذب در دیسک بلانک، بر روی پلیت قرار گرفت. بر روی هر پلیت یک دیسک آنتی‌بیوتیک به عنوان کنترل مثبت قرار داده شد. از آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و ونکومایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۸).

بررسی تعیین کمترین غلظت بازدارنده و کمترین غلظت کشنده: برای بررسی Minimum Inhibitory Concentration (MIC) و Minimum Bactericidal Concentration (MBC) از روش microdilution broth در پلیت ۹۶ خانه استفاده شد. در تمامی چاهک‌های ردیف اول ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت مولر هینتون برات ریخته شد. در چاهک اول از ردیف اول ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره‌ها با غلظت 100mg/ml ریخته شد و پپیتاژ به خوبی صورت گرفت. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از چاهک اول برداشته شد و به چاهک دوم اضافه شد و پپیتاژ انجام شد. این روند تا چاهک ششم صورت گرفت و از چاهک ششم ۱۰۰ میکرو لیتر خارج شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده به هر یک از چاهک‌ها بجز چاهک (کنترل منفی) اضافه شد و پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. این روش برای اگزوزوم‌های گیاه نیز تکرار شد.

پس از گذشت ۲۴ ساعت پلیت از انکوباتور خارج شد و چاهکی که با کم‌ترین غلظت از تیمار هیچگونه رشد بصری از باکتری در آن دیده نشد به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین MBC، از همهی رقت‌ها در پلیت‌های دیگری کشت چمنی داده شدند (۱۸).

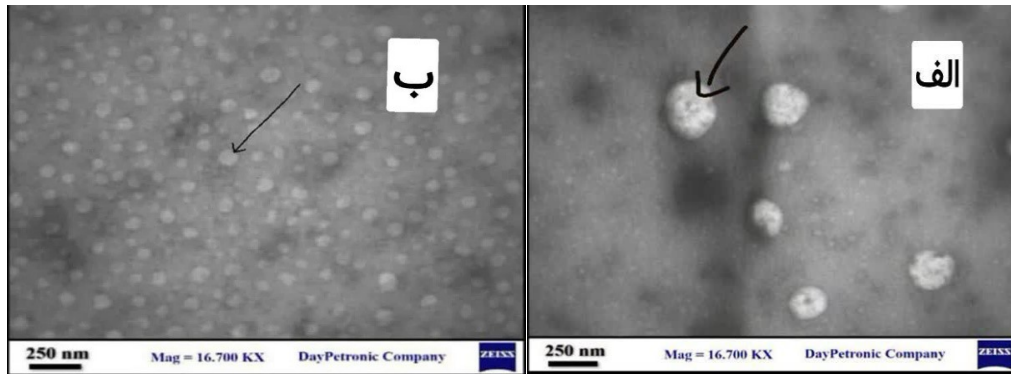
۳- آنالیز آماری

تمام آزمایش‌های انجام شده در این پژوهش در سه تکرار طراحی شده‌اند. با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۷، آزمون واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی توکی با شرط آماری $p < 0.05$ انجام شد و رسم نمودار با اکسل انجام شد.

۴- نتایج

تصاویر میکروسکوپ الکترونی TEM

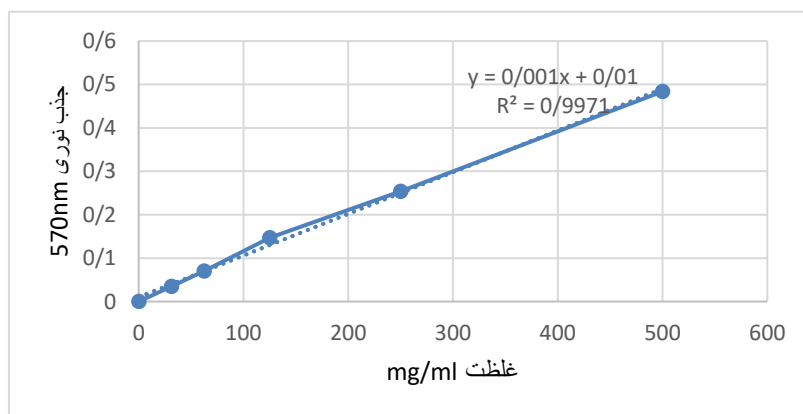
شکل ۱ آگزوزوم زنجبیل و اسطوخودوس را نشان می‌دهد که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گرفته شده است تصاویر نشان می‌دهد آگزوزوم‌ها کروی شکل هستند.



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ الکترونی. الف) آگزوزوم اسطوخودوس را نشان می‌دهد که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گرفته شده است تصویر نشان می‌دهد آگزوزوم‌ها کروی شکل هستند. فاصله بین آگزوزوم‌ها زیاد است و زیگول‌های ریز هم در تصویر دیده می‌شوند؛ ولی وضوح خوبی ندارد. ب) تصویر آگزوزوم زنجبیل را نشان می‌دهد آگزوزوم‌ها کروی شکل هستند و به صورت متراکم در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند.

تست برادفورد

تست برادفورد برای تعیین غلظت آگزوزوم انجام می‌شود. پس از رسم نمودار استاندارد پروتئین BSA نمودار ۱ و به دست آوردن معادله‌ی خط آن جذب‌نوری نمونه مجهول یعنی آگزوزوم در معادله قرار گرفت و غلظت پروتئین‌ها یا آگزوزوم تعیین شد.

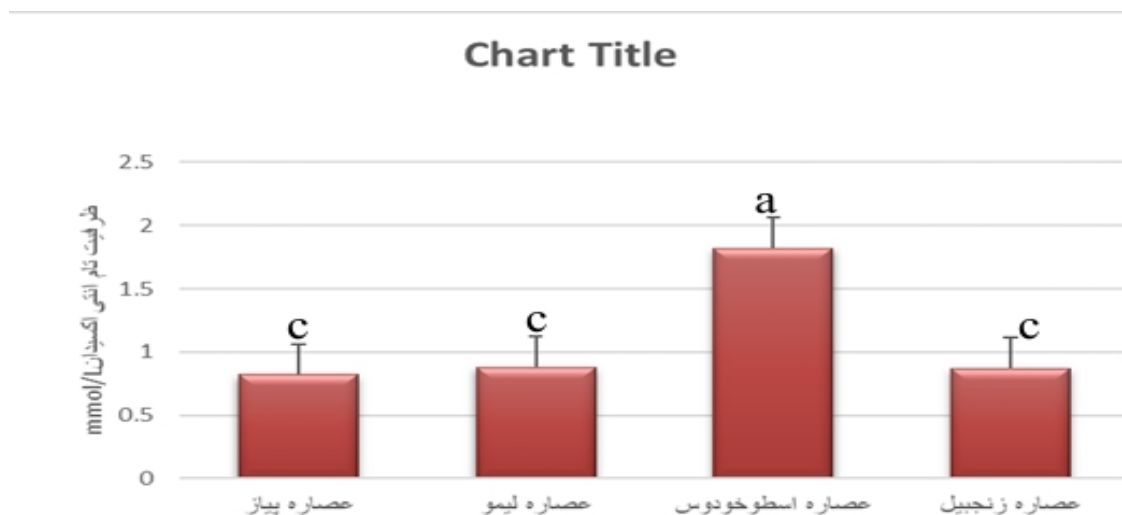


نمودار ۱: نمودار استاندارد پروتئین BSA. غلظت آگزوزوم زنجبیل ۱۹۳/۵ mg/ml و آگزوزوم اسطوخودوس 109 mg/ml آگزوزوم لیمو ۲۰۰ mg/ml و آگزوزوم پیاز ۱۵۰ mg/ml به دست آمد.

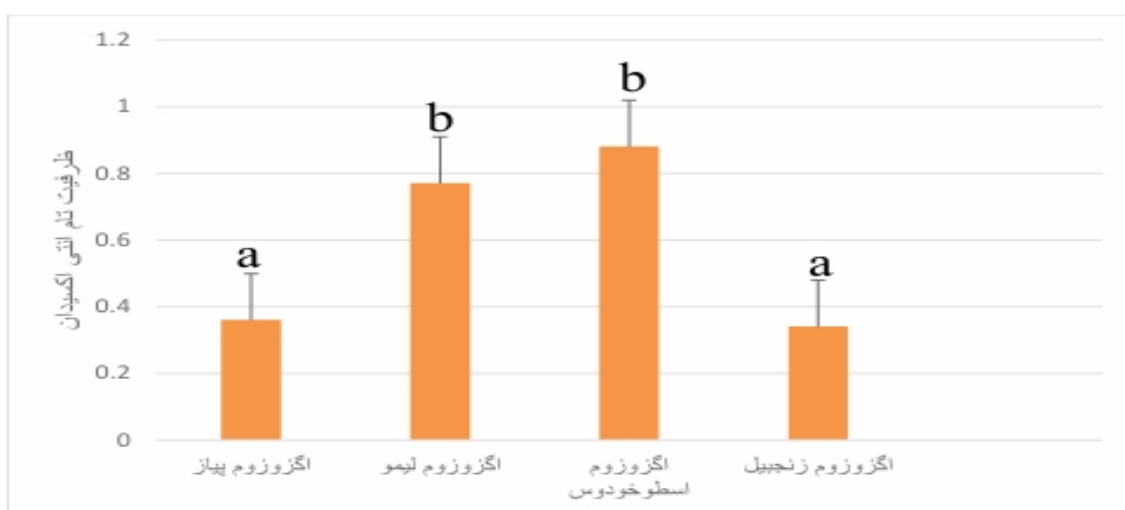
نتایج تست‌های آنتی‌اکسیدانتی

در پژوهش حاضر آگزوزوم‌ها استخراج شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی آن‌ها و عصاره‌های آن‌ها بررسی شد که نتایج آن در نمودار

۲ و ۳ قابل مشاهده است. عصاره‌ی اسطوخودوس خاصیت آنتی اکسیدانتی بالاتری از سایر عصاره‌ها داشت. نمودار ۲ نشان می‌دهد خاصیت آنتی اکسیدانتی عصاره‌ی پیاز و زنجبیل و لیمو مشابه بود (حروف مشترک C) خاصیت آنتی اکسیدانتی اسطوخودوس به شکل معناداری از همه عصاره‌ها بیشتر بود. نمودار ۳ نشان می‌دهد بین ظرفیت تام آنتی اکسیدانتی پیاز با اسطوخودوس و لیمو تفاوت معناداری وجود دارد.



نمودار ۲: مقایسه‌ی ظرفیت تام آنتی اکسیدانتی بین عصاره اسطوخودوس، لیمو، پیاز و عصاره زنجبیل $n=3$. حروف متفاوت، اختلاف معناداری در سطح $(p < 0.05)$ را نشان می‌دهد. بین عصاره لیمو، عصاره پیاز و عصاره زنجبیل تفاوت معناداری در میزان خاصیت آنتی اکسیدانتی وجود ندارد (حروف مشترک C) خاصیت آنتی اکسیدانتی عصاره‌ی اسطوخودوس 1.82 ± 0.03 و در لیمو 0.88 ± 0.01 و در زنجبیل 0.87 ± 0.07 است. ظرفیت تام آنتی اکسیدانتی اسطوخودوس به طور معناداری بیشتر از سایر عصاره‌ها است. این مقادیر میانگین است.



نمودار ۳: مقایسه‌ی ظرفیت تام آنتی اکسیدانتی بین اگزوزوم اسطوخودوس، لیمو، زنجبیل و پیاز $n=3$. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح $(p < 0.05)$ بین ظرفیت تام آنتی اکسیدانتی پیاز با اسطوخودوس و لیمو تفاوت معناداری وجود دارد (حروف متفاوت a, b) اما بین پیاز و زنجبیل تفاوت معناداری وجود ندارد (حرف مشترک a) این مقادیر میانگین است.

همان‌طور که در نمودار ۲ و ۳ دیده می‌شود ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی عصاره اسطوخودوس و آگزوزوم اسطوخودوس و لیمو نسبت به سایر موارد بررسی شده بیشتر می‌باشد.

نتایج تست‌های ضد باکتری

در پژوهش حاضر آگزوزوم‌ها استخراج شد و فعالیت ضد باکتریایی این عصاره‌ها و آگزوزوم‌ها را در برابر گونه‌های گرم مثبت و گرم منفی، از جمله *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* به روش تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) و انتشار دیسک بررسی شد. آگزوزوم‌ها خاصیت ضد باکتریایی نداشتند. همچنین عصاره‌های زنجبیل، اسطوخودوس و پیاز خاصیت ضد باکتریایی نداشتند و فقط در عصاره لیمو خاصیت ضد باکتریایی مشاهده شد.

MIC لیمو در *استافیلوکوکوس اورئوس* ۳.۱۲ mg/ml و در *اشرشیاکلی* ۵۰ mg/ml و در *استرپتوکوکوس پیوژنز* 6.25 mg/ml به دست آمد.

تاثیر عصاره لیمو بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شد. قطر هاله اندازه‌گیری شد و نشان داد که در غلظت mg/ml ۱۰۰ قطر هاله ۲۲ mm در غلظت ۵۰ mg/ml، ۲۰ mm در غلظت ۲۵ mg/ml قطر هاله ۱۷ mm بود به‌عنوان کنترل مثبت از ونکومایسین استفاده شد.

تاثیر عصاره لیمو بر باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* بررسی شد. قطر هاله اندازه‌گیری شد و نشان داد که در عصاره لیمو در غلظت mg/ml ۱۰۰ قطر هاله ۲۲ mm در غلظت ۵۰ mg/ml قطر ۱۵ mm در غلظت ۲۵ mg/ml قطر هاله ۱۵ mm بود به‌عنوان کنترل مثبت از جنتامایسین استفاده شد.

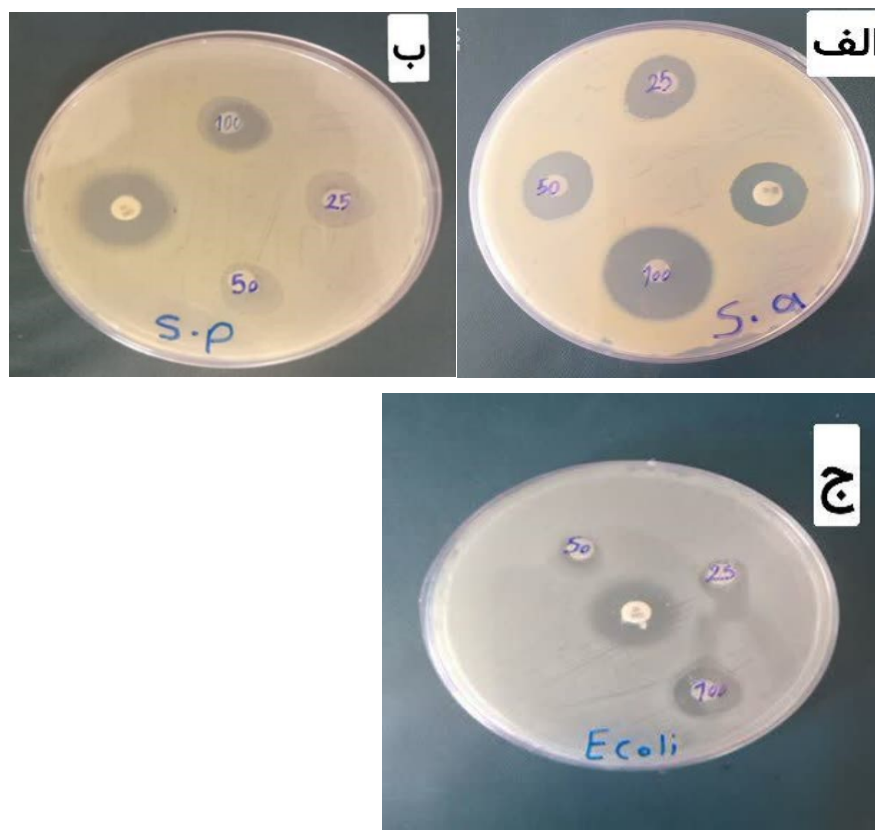
تاثیر عصاره لیمو بر باکتری *اشرشیاکلی* بررسی شد. قطر هاله اندازه‌گیری و نشان داده شد که در عصاره لیمو در غلظت mg/ml ۱۰۰ قطر هاله ۱۵ mm در غلظت ۵۰ mg/ml قطر هاله ۸ mm در غلظت ۲۵ mg/ml قطر هاله ۱ mm بود به‌عنوان کنترل مثبت از جنتامایسین استفاده شد. قطر هاله اندازه‌گیری شده ۲۰ mm بود؛ بنابراین نتایج نشان دادند که کم‌ترین هاله در *اشرشیاکلی* و بیشترین آن در *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد شد.

در باکتری *Sterptococcus* بین غلظت ۱۰۰ و ۵۰ تفاوت معناداری در قطر هاله وجود دارد (حروف متفاوت a, b) اما بین غلظت‌های ۵۰ و ۲۵ تفاوت معناداری در قطر هاله وجود ندارد (حروف یکسان b).

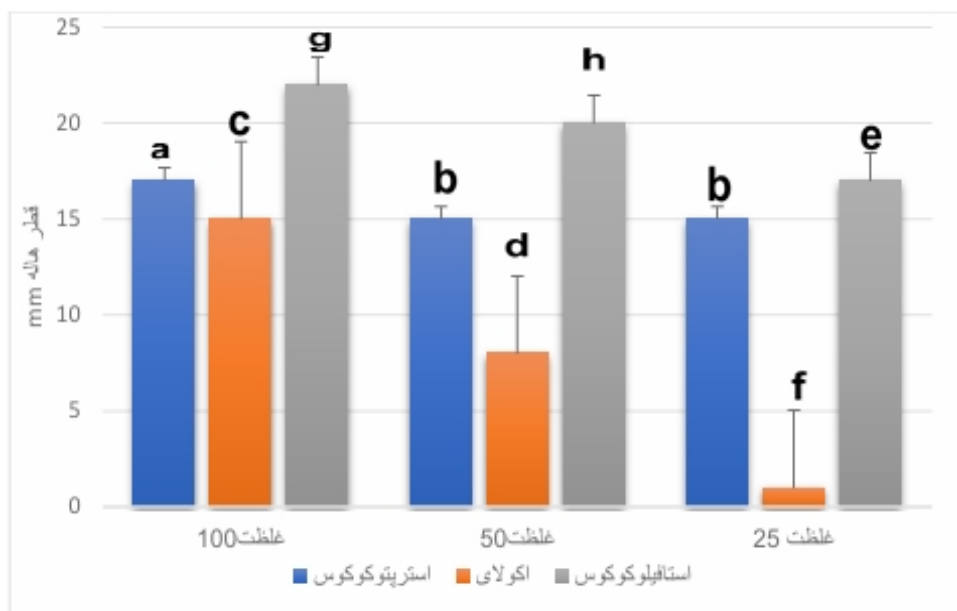
همان‌گونه که در جدول ۱ دیده می‌شود عصاره لیموترش بیشترین اثر را بر باکتری *اشرشیاکلی* دارد. همچنین نشان‌دهنده خاصیت ضد باکتریایی زیاد عصاره لیمو است.

جدول ۱: قطر هاله ی عدم رشد بر حسب میلی‌متر

غلظت عصاره لیمو (mg/ml)	۱۰۰	۵۰	۲۵
<i>S. aureus</i>	22± 0.23	20 ±0.4	17±.47
<i>E.Coli</i>	15±1.08	8±.08	1±.4
<i>S. pyogenes</i>	۱۷±1.08	15±.23	15±.81



شکل ۲: تاثیر عصاره‌ی لیمو بر باکتری‌های (الف) استافیلوکوکوس اورئوس (ب) استرپتوکوکوس پیوژنز (ج) اشرشیا کلی



نمودار ۴: مقایسه‌ی قطر هاله‌ی عدم رشد باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*، *Streptococcus* در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌ی لیمو ترش $n=3$. حروف متفاوت در هر یک از غلظت‌ها نشان دهنده‌ی اختلاف معنادار در سطح $(p < 0.05)$ است. در باکتری *Streptococcus* بین غلظت ۱۰۰ و ۵۰ تفاوت معناداری وجود دارد (حروف متفاوت a, b). در اکولای بین غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ اختلاف معناداری وجود دارد (حروف متفاوت C, d, f) بنابراین نتایج نشان دادند که در بالاترین غلظت کم‌ترین قطر هاله در اکولای 15 ± 1.08 و بیشترین آن در استافیلوکوکوس اورئوس 22 ± 0.23 ایجاد شد.

در این پژوهش، فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ها و آگزوزوم‌ها به روش تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) بررسی شد که نتایج آن در جدول ۲ قابل مشاهده است. جدول ۲ نشان دهنده‌ی میزان MIC و MBC عصاره لیمو ترش است.

جدول ۲: نتایج MIC و MBC عصاره لیمو ترش

(MIC) (mg/ml)	MBC(mg/ml)	Bacteria
۶.۲۵	25	<i>S. pyogenes</i>
۵۰	50	<i>E. Coli</i>
۳.۱۲	12.5	<i>Staphylococcus aureus</i>

۵- بحث

شیوع پاتوژن‌های عفونی جدی، از جمله *اشریشیاکلی* و *استرپتوکوک پیوژنز*، باعث افزایش شدید بیماری و مرگ‌ومیر در سراسر جهان می‌شود. همچنین افزایش نگران‌کننده‌ای در میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نگران‌کننده است بنابراین، مسائل قبلی دانشمندان را بر آن داشته است که به رویکرد جدیدی از درمان روی آورند. گیاهان، در طول تاریخ، با به‌دست‌آوردن مواد زیستی، تاثیر مفیدی بر سلامت انسان با کم‌ترین سمیت نشان داده‌اند. این مواد طبیعی پتانسیل قابل‌توجهی در تولید داروهای جدید دارند.

در این پژوهش آگزوزوم زنجبیل با کیت آگزوسان استخراج شد و با تکنیک TEM شناسایی شد. TEM بر اساس همان مفاهیم اساسی میکروسکوپ نوری کار می‌کند، با این تفاوت که به‌جای نور از الکترون‌ها استفاده می‌کند. با قراردادن یک لایه کوچک از نمونه با پرتو الکترونی، لیزهای الکترومغناطیسی می‌توانند نحوه پراکندگی الکترون‌ها را تشخیص دهند و یک الگوی پراش ایجاد کنند که می‌تواند به‌عنوان یک تصویر بزرگ‌نمایی شده ثبت شود. قطر وزیکول، از جمله آگزوزوم‌ها، را می‌توان با استفاده از تصاویر TEM اندازه‌گیری کرد. در TEM، EVها در اشکال مختلف مورفولوژی، از کروی تا فنجان‌ی شکل، کشف شده‌اند. آگزوزوم‌ها، برخلاف سلول‌های دارای اسکلت سلولی، فاقد ساختار پشتیبانی داخلی هستند. به‌همین دلیل، هنگامی که یک نمونه آگزوزوم برای بررسی TEM دهیدراته می‌شود، وزیکول ممکن است شکل فنجان‌ی به خود بگیرد و مورفولوژی اصلی خود را از دست بدهد. مکان‌یابی دقیق مولکول‌های پروتئینی خاص موجود در لومن EVها یکی از مهم‌ترین جنبه‌های درک فرایندهای زیستی آنهاست. نمونه‌های زیستی می‌توانند توسط پرتو الکترونی مورد استفاده آسیب ببینند. مولکول‌های پروتئینی موجود در EVها را می‌توان با استفاده از رنگ‌های فلورسنت خاص برچسب‌گذاری و مشاهده کرد. با این حال، سیگنال فلورسنت بیش از حد از پروتئین‌های برچسب‌گذاری شده، استفاده از TEM را در تصویربرداری از EVهای برچسب‌گذاری شده محدود می‌کند. برای مشاهده EVهای متصل به پروپ‌های آنتی‌بادی برچسب‌گذاری شده، به یک روش جایگزین، TEM ایمونوگلد، نیاز است در پژوهشی Jingyao Mu و همکاران (۱۹) برای اولین بار نانوذرات آگزوزوم مانند زنجبیل (GELN) را جدا و خالص کردند.

در این پژوهش خاصیت ضد باکتریایی آگزوزوم‌های استخراج شده و عصاره‌ها با روش‌های انتشار دیسک، MIC سنجیده شد. آگزوزوم‌ها خاصیت ضد باکتریایی نداشتند در عصاره زنجبیل، اسطوخودوس، پیاز خاصیت ضد باکتریایی مشاهده نشد، اما عصاره لیمو خاصیت ضد باکتریایی خوبی داشت پژوهشی که توسط شرفی و همکاران (۲۰) انجام گرفت بیانگر خاصیت ضد باکتریایی اسانس لیمو در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد که مطابق با پژوهش حاضر است.

در پژوهشی دیگر که Teng و همکاران (۲۱) انجام دادند مشخص شد که اگزوزوم زنجبیل افزایشی در لاکتوباسیلارسیلایز ایجاد می‌کند و تاثیری بر رشد *E. coli* ندارند. در پژوهش حاضر هم اگزوزوم زنجبیل بر *A. baumannii* تاثیری نداشت که مطابق پژوهش Teng بود.

حناچی و همکاران (۱۳) اسطوخودوس را با دو روش لیمو فیلتره و خیساندن عصاره‌گیری کردند. عصاره متانولی اسطوخودوس بر باکتری *Escherichia coli* با قطر هاله ۱۹mm بیشترین اثر را نسبت به حلال‌های آبی و اتانولی داشته است. همچنین عصاره متانولی اسطوخودوس با قطر هاله ۱۵mm بهترین اثر را بر باکتری *Staphylococcus aureus* داشته است. اما در این پژوهش عصاره‌ی آبی اسطوخودوس تاثیری بر باکتری نداشت که به علت متفاوت بودن نوع حلال‌ها است. حلال‌های غیر قطبی باعث استخراج بیشتر ترکیبات فنولی می‌شوند و عصاره‌های الکلی خاصیت ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانتی بیشتری خواهند داشت.

Li و همکاران (۲۲) در پژوهشی که انجام دادند، وزیکول‌های خارج سلولی مشتق شده از مرکبات (CEVs) از نارنگی قرمز (*Citrus reticulata Blanco cv. 'Dahongpao'*) استخراج شدند و مشخص شد که آن‌ها حاوی سطوح بالایی از لیپیدها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها هستند. سطوح بالای فنول‌های کل و فلاونوئیدهای کل نشان می‌دهد که CEVs خواص آنتی-اکسیدانتی شیمیایی خوبی دارند.

در این پژوهش خاصیت آنتی‌اکسیدانی اگزوزوم‌های استخراج شده بررسی شد که نتایج نشان دادند اگزوزوم اسطوخودوس خاصیت آنتی‌اکسیدانتی بالاتری از سایر اگزوزوم‌ها دارد همچنین عصاره اسطوخودوس نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانتی بالاتری از سایر عصاره داشت.

۶- نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاضر عصاره‌های زنجبیل، اسطوخودوس و پیاز دارای اثر ضد باکتریایی نبودند، اما عصاره لیمو دارای اثر ضد-باکتریایی بر روی باکتری‌های *S. pyogenes*، *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* است همچنین اگزوزوم‌های گیاهی خاصیت ضد باکتریایی نداشتند. نتایج روش انتشار دیسک نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره لیمو میزان قطر هاله عدم رشد افزایش می‌یابد در تحقیق حاضر بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد در *Staphylococcus aureus* کمترین میزان قطر هاله عدم رشد به *Escherichia coli* مربوط است. عصاره لیمو بر باکتری‌های گرم مثبت مانند *Staphylococcus aureus* علی‌رغم حضور دیواره سلولی اثر بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی مانند *Escherichia coli* دارد. در سایر پژوهش‌ها بیشتر از روش متانولی و اتانولی برای عصاره‌گیری استفاده شده اما در این پژوهش از روش آبی برای عصاره‌گیری استفاده شد.

همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانتی اگزوزوم و عصاره‌ها را به روش FRAP اندازه‌گیری کردیم اگزوزوم و عصاره اسطوخودوس بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانتی را داشتند. میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره اسطوخودوس از اگزوزوم بالاتر بود این نتیجه به دست آمد که خاصیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره‌ها از اگزوزوم‌ها بیشتر است. محدودیت این مطالعه به شرایط *In vitro* برمی‌گردد مطالعات آینده می‌تواند اثرات *In vivo* و سمیت رو بررسی کنند.

۷- تشکر و قدردانی

از اساتید و کارشناسان آزمایشگاه به دلیل یاری و همکاری بی‌چشمداشت ایشان سپاسگزار هستیم.

۸- منابع

1. Subha D, Harshnii K, Madhikiruba K, Nandhini M, et al. Plant derived exosome-like Nanovesicles: An updated overview. *Plant Nano Biology*. 2023;3:10022.
2. Kim J, Li S, Zhang S, Wang J. Plant-derived exosome-like nanoparticles and their therapeutic activities. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2022;17(1):53-69.
3. Zhang Y, Bi J, Huang J, et al. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *International journal of nanomedicine*. 2020;6917-34.
4. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(1):142-201.
5. Mosadeghrad A, Afshari M, Isfahani P. Prevalence of Nosocomial Infection in Iranian Hospitals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Iranian Journal of Epidemiology*. 2021;16(4):352-62.
6. (WHO) hwwiHO.
7. Efstratiou A, Lamagni T. Epidemiology of *Streptococcus pyogenes*. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations* [Internet] 2nd edition. 2. ۰۲۲
8. Gao X, Liu J, Li B, Xie J. Antibacterial activity and antibacterial mechanism of lemon verbena essential oil. *Molecules*. 2023;28(7):3102.
9. Raimondo S, Urzi O, Meraviglia S, Di Simone M, et al. Anti-inflammatory properties of lemon-derived extracellular vesicles are achieved through the inhibition of ERK/NF- κ B signalling pathways. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2022;26(15):4195-209.
10. Mao Q-Q, Xu X-Y, Cao S-Y, Gan R-Y, et al. Bioactive compounds and bioactivities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods*. 2019;8(6):185.
11. Hasan H, Raauf A, Abd Razik B. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Crude Extracts Isolated from *Zingiber Officinale* by Different Solvents. *Pharmaceutica Analytica Acta*. 2012;3.
12. Kabrah MAM, Faidah HS, Ashshi AM, Turkistani MSA. Antibacterial effect of onion. *Sch J App Med Sci*. 2016;4(11):4128-33.
13. Hanachi P, Abadi H, Ghorbani N, Zarrin Ghalami R, et al. Evaluation of antioxidant and anticancer effects of *Lavandula angustifolia* and *Melissa officinalis* on HeLa, OVCAR-3, and MCF-7 cancer cell lines. *Nova Biologica Reperta*. 2021;8:20-30..
14. Keshtdar F, Ramezani R. Expression Level of miR-9 in Exosomes Derived from Ovarian Epithelial Carcinoma Cells and the Effects of Exosome Treatment on VEGF Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Pathobiology Research*. 2025;21(1):35-40
15. He F. Bradford protein assay. *Bio-protocol*. 2011:e45-e.
16. Dilsiz N. A comprehensive review on recent advances in exosome isolation and characterization: Toward clinical applications. *Translational oncology*. 2024;50:102121.
17. Gohari A, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Ajani Y, et al. Antioxidant activity of some medicinal species using the FRAP assay. 2011.
18. Garibo D, Borbón-Núñez HA, de León JND, García Mendoza E, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Lysiloma acapulcensis* exhibit high-antimicrobial activity. *Scientific reports*. 2020;10(1):12805.

19. Mu J, Zhuang X, Wang Q, Jiang H, et al. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant-derived exosome-like nanoparticles. *Molecular nutrition & food research*. 2014;58(7):1561-73.
20. Sharafi S, Rasooli I, Allahghadri T, Nadoushan M, et al. Antimicrobial, antioxidant, hematologic, and cytotoxic properties of Citrus limon L. essential oil. 2010.
21. Teng Y, Ren Y, Sayed M, Hu X, et al. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota. *Cell host & microbe*. 2018;24(5):637-52. e8.
22. Li S, Ye Z, Zhao L, Yao Y, et al. Evaluation of antioxidant activity and drug delivery potential of cell-derived extracellular vesicles from citrus reticulata blanco cv. 'Dahongpao'. *Antioxidants*. 2023;12(9):1706.