بررسی مقایسه‌ای اثرات نانوذرات نقره و عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار* (*Calendula officinalis*) بر روی باکتری‌های پاتوژن *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* در وضعیت آزمایشگاهی

بهبود جعفری[1*]، علیرضا منادی سفیدان[2]

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۹

چکیده

زمینه و هدف در سال‌های اخیر بروز مقاومت دارویی و عوارض جانبی داروهای ضد میکروبی شیمیایی در درمان عفونت‌ها افزایش یافته اســت؛ بنابراین اســتفاده از داروهای گیاهی جدید با عوارض جانبی کمتر و فناوری نانو در عر صهٔ پز شکی می‌تواند کمک شایانی در درمان این نوع عفونت‌ها با شد. هدف از این پژوهش، برر سی مقایسه‌ای اثرات نانوذرات نقره و عصارهٔ متانولی *گل همیشه‌بهار* بر روی چهار سویهٔ پاتوژن است.

مواد و روش‌ها پژوهش حاضر توصیفی-آزمایشگاهی است و در آن گیاه گل همیشه‌بهار بر اساس ویژگی‌های گیاه‌شناختی در بخش هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، شناسایی شد. در این پژوهش، اثرات ضد میکروبی عصارهٔ متانولی *گل همیشه‌بهار* با روش سوکسوله در غلظت‌های ۲۰ mg/ml تا ۴۰۰ mg/ml از عصارهٔ متانولی و غلظت‌های ۱۰ µg/ml تا ۸۰ µg/ml از نانوذرات نقره تهیه شد و سپس اثرات ضد میکروبی آن‌ها با روش‌های انتشار چاهک و رقت لوله‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها یافته‌ها نشان دادند که عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار* از رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیاکلی* پیشگیری می‌کند. درحالی‌که اثر مهاری نانوذرات نقره بر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیاکلی* در مقایسه با گل همیشه‌بهار بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است. تأثیر ترکیب عصاره *گل همیشه‌بهار* و نانوذرات نقره بسیار بیشتر از تأثیر هر یک از آن‌ها بود.

نتیجه‌گیری نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که عصارهٔ گیاه *گل همیشه‌بهار* خاصیت ضد باکتریایی دارد. بنابراین این عصاره می‌تواند گزینهٔ مناسبی در بررسی‌های آینده تحت وضعیت In Vivo برای تهیهٔ داروهای ضد باکتریایی باشد.

کلیدواژه‌ها:
آنتی‌باکتریال، *گل همیشه‌بهار*، نانوذرات نقره.

۱. مقدمه

مقاومت روزافزون بسیاری از باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض ناشی از مصرف داروهای ضدمیکروبی، تمایل به استفاده از مواد مؤثرهٔ گیاهی یا ترکیب‌های طبیعی با اثر آنتی‌بیوتیکی را افزایش می‌دهد و گیاهان دارویی در نقش جایگزین طبیعی برای داروهای سنتتیک شیمیایی برای درمان ضد میکروبی پیشنهاد شده است(۱). گیاهان در سراسر دنیا به‌طور سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها، به‌ویژه بیماری‌های عفونی استفاده می‌شوند(۲). به‌این‌ترتیب گیاهان را می‌توان منبعی از مواد شیمیایی بالقوه مفید دانست که تنها بخشی از آن مورد بهره‌برداری قرار گرفته است.می-

* **نویسندهٔ مسئول: بهبود جعفری**
نشانی: اهر، کیلـومـتر ۲ جاده اهر تبریز - مجتمع دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر

تلفن: ۰۴۱۴۴۲۳۹۷۵۸ دورنگار: ۰۴۱۴۴۲۳۵۵۸۳
رایانه: dr.behboud.jafari@gmail.com, b-jafari@iau-ahar.ac.ir -
شناسه ORCID: 0000-0001-6269-4106
شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0001-6269-4106

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۷، شمارهٔ ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۹، ص ۱۷۱-۱۶۳
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

توان این مواد شیمیایی بالقوه مفید را نه‌تنها در قالب دارو، بلکه به‌صورت الگویی بی‌نظیر و نقطهٔ شروعی برای ساخت آنالوگ‌های دارویی به‌کار برد و از آن در قالب ابزاری جالب به‌منظور فهم و درک بیشتر و بهتر پدیده‌های زیست‌شناختی به کمک گرفت(۳-۵). امروزه بروز مقاومت دارویی متنوع میکروارگانیسم‌های پاتوژن، چالشی مهم در هر دو زمینهٔ بهداشت و درمان انسانی و دامپزشکی تبدیل شده است؛ بنابراین یک نیاز مستمر در زمینهٔ شناسایی ترکیبات ضد میکروبی جدید برای به حداقل رساندن مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها احساس می‌شود(۶, ۷). عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی از توان بالایی برای ساخت ترکیب‌های دارویی در زمینهٔ بهداشت و درمان بیماری‌های انسانی و حیوانی برخوردار هستند و با داشتن ترکیب‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، عوامل حذف‌کنندهٔ رادیکال آزاد و ضد سرطانی، یکی از منابع ترکیب‌های دارویی طبیعی محسوب می‌شوند. این داروهای گیاهی در نزد مردم مقبولیت بیشتری برای مصرف دارند. این دلایل باعث افزایش مطالعات گستردهٔ جهانی و معرفی اثرهای ضد باکتریایی گیاهان مختلف در سا های اخیر بوده است(۸-۱۲). با توجه به رویکرد دوباره برای مصرف داروها و فراورده‌های گیاهی بررسی خواص دارویی گیاهان اندمیک هر منطقه اهمیت خاصی دارد. بررسی‌های زیادی بر عصاره‌های تهیه‌شده ازگیاهان جمع‌آوری‌شده به‌شکل تصادفی یا به یکی از روش‌های فوق انجام گرفته است. ادر ین بررسی‌ها تمرکز بیشتر بر ارزیابی اثرات ضد میکروبی(۱۳-۱۵)ضد کرمی(۱۶)، ضد ویروسی(۱۷) اثرات سیتوتوکسیته و موتاژنیسیته(۱۸) و همچنین اثرات فارماکولوژیکی عمومی(۱۹) است. گیاه *گل‌همیشه بهار* با نام علمی *Calendula officinalis* از خانوادهٔ کاسنیان(Asteraceae) و دارای نام‌های رایج Marigold pot و Marigold است. این گیاه، علفی، پایا، با گل‌های زردرنگ و ساقه‌ای به طول ۲۰ تا ۵۰ سانتی‌متر است. این گیاه دارای برگ‌های ساده، بیضوی دراز، پوشیده از کرک با کناره‌های موج‌دار است. گیاه *همیشه‌بهار* در ایران از جمله در بلندی‌های بالای ۲۵۰۰ متر می‌روید و به‌راحتی در اوضاع مساعد رشد می‌کند. درکشورهای آلمان، استرالیا، اتریش، سوئیس و سوریه نیز با عنوان گیاهی دارویی کشت می‌شود(۲۰). این گیاه در طب قدیم با اثرات ضد میکروبی استفاده می‌شده است و تاریخچهٔ مصرف آن در پزشکی به قرن دوازدهم بر می‌گردد(۲۱). گیاه *همیشه‌بهار* به‌دلیل داشتن ترکی‌های شیمیایی از قبیل فلاوونوئیدها، ساپونین‌ها، کاروتنوئیدها، تریترپنوئیدها و تانن‌ها خاصیت آنتی‌باکتریال دارد(۲۲). در گذشته، *گل همیشه‌بهار* را برای درمان اختلال‌های روده‌ای، کبدی، گزیدگی مار به‌کار می‌بردند. امروزه *گل همیشه‌بهار* را تسکین‌دهنده تشنج می‌شناسند و به‌همین‌دلیل آن را در موارد سرفه، بی‌خوابی، آسم، تپش قلب، و اضطراب به‌کار می‌برند(۲۳-۲۵). همچنین خاصیت ضد توموری عصارهٔ این گیاه با دو مکانیسم سیتوتوکسیسیتی و فعال‌سازی لنفوسیت‌ها در پژوهش‌های مختلف به تأیید رسیده است(۱۴). در هندوستان نیز گل *همیشه‌بهار* به‌طور موضعی در درمان هموروئید به‌کار می‌رفته است(۲۳). امروزه، گیاه *همیشه‌بهار* برای استفاده از مواد غذایی در ایالات متحدهٔ امریکا تأیید شده و به‌نظر می‌رسد در مواد غذایی و فهرست داروی GRAS به‌صورت ترکیبی بی‌ضرر به رسمیت شناخته شده است(۲۶). راهکار نوین دیگر در مقابله با میکروب‌ها بدون افزایش مقاومت‌های دارویی، استفاده از نانوتکنولوژی است. محققان نانوتکنولوژی ابعاد وسیعی از کاربردهای نانوذرات را شناسایی کرده اند که نقش بسیار زیادی در پزشکی، پیشگیری و درمان بیماری‌ها خواهد داشت(۲۷). یکی از این نانوذرات در زمینهٔ نانوتکنولوژی، استفاده از فناوری نانو نقره است. نقره در ابعاد نانو بر متابولیسم، تنفس و تولید مثل میکروارگانیسم اثر می‌گذارد(۲۸). در بررسی‌های مختلف، خواص ضد میکروبی این نانوذرات و استفادهٔ مفید از آن در زمینهٔ بیوتکنولوژی و مهار اختصاصی میکروب‌ها بررسی شده است. نانوذرات نقره بدون افزایش مقاومت دارویی، باعث مهار سیستم تنفسی باکتری‌ها می‌شود. این عنصر دارای خواص اختصاصی در میکروب‌زدایی هستند و تهیهٔ آن آسان و قیمت آن نیز ارزان است(۲۷, ۲۹). بنابراین پژوهش حاضر یک‌بار به‌تنهایی و بار دیگر هم‌زمان با هدف بررسی مقایسه‌ای خواص ضد میکروبی عصارهٔ اتانولی گل‌های گیاه *همیشه‌بهار* و نانوذرات نقره و اثرات سینرژیک آن‌ها در صورت مصرف هم‌زمان این دو ماده بر سویه‌های استاندارد باکتری‌های پاتوژن *استافیلوکوکوس ارئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژ ینوزا* انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

نمونهٔ گیاهی از عرصه‌های طبیعی مسجد سلیمان تهیه دقت شد تا همهٔ نمونه‌ها از یک عرصه جمع شوند. سپس نمونه‌ها از سوی گیاه‌شناسان و هربارو م آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی اهر در حد جنس و گونه شناسایی و تأیید شد. پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها و جداکردن اندام‌های هوایی(ساقه و برگ) از ریشهٔ گیاه، برای عصاره‌گیری از روش سوکسوله استفاده شد. به‌طوری‌که ۶۰ گرم پودر گیاه خشک‌شده همراه با ۳۰۰ ml متانول در نقش حلال به‌مدت ۸ ساعت در دستگاه عصاره‌گیر سوکسله قرار داده شد. این حلال در دمای ۴۰ ^{o}C و با استفاده از دستگاه روتاری به‌آرامی تبخیر شد و عصارهٔ غلیظ‌شده از ان به‌دست آمد. از عصاره‌های غلیظ‌شده با حلال ۵ درصد DMSO (DimethyLsulfoxide)، غلظت‌های ۲۰ ، ۳۰ ، ۵۰ و mg/ml

۴۰۰ برای استفاده در آزمایش تعیین Minimum inhibitory (Concentration)MIC و Disc diffusion تهیه شد. میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش شامل باسیلوس سرئوس(۱۲۴۷ : ATCC)، استافیلوکوکوس آرئوس(۲۵۹۲۳ : ATCC)، سودوموناس آئروژینوزا(۲۷۸۵۳ : ATCC) اشریشیاکلی(۲۵۹۲۲ :ATCC) به‌صورت لیوفلیزه از کلکسیون میکروبی دانشگاه تهران تهیه شد. نمونه‌های میکروبی مطابق با روش استاندارد احیا شدند و ازآن‌جاکه تعداد باکتری تلقیح‌شده یکی از مهم‌ترین متغیرهایی است که بر این پژوهش اثر می‌گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد. بدین‌منظور برای تهیهٔ سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان باکتری ۵-۴ کلنی به محیط کشت مولرهینتون براث منتقل شد تا کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده مطابق با لولهٔ شماره ۰/۵ استاندارد مک فارلند(کدورت معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر) تنظیم شود. برای رسیدن به غلظت $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml را باکتری در هر میلی‌لیتر، سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل لولهٔ ۰/۵ مک فارلند به نسبت ۰/۰۱ رقیق شد. به‌منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصارهٔ متانولی ۴ غلظت ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۴۰۰ mg/ml از عصارهٔ متانولی گیاه در حلال ۵ درصد DMSO تهیه شد. در این بررسی، اثر ضد میکروبی عصارهٔ متانولی به دو روش Agar Well Diffusion و Dilution Test بررسی شد. در روش انتشار چاهک ۵۰۰ ml از سوسپانیون میکروبی $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml بر محیط کشت مولرهینتون آگار انتقال یافت و به‌وسیلهٔ سواپ استریل در ۳ جهت کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ mm و به فاصلهٔ ۲/۵ cm از هم در سطح آگار ایجاد شد. در ادامه ۱۰۰ µl از غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۴۰۰ mg/ml از عصارهٔ متانولی به درون هر چاهک تزریق شد. شاهد منفی با استفاده از محلولی که برای حل‌کردن عصاره‌ها به‌کار گرفته شد(۵٪ DMSO) به‌دست آمد و از آنتی-بیوتیک کلرامفنیکل نیز به منزلهٔ شاهد مثبت استفاده گردید. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه شد و پس از مدت معین کشت‌های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هالهٔ عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. با استفاده از روش رقت لوله‌ای، کمینه غلظت مهارکنندگی رشد و کمینه غلظت کشندگی عصارهٔ متانولی تعیین شد در این روش جهت تعیین MIC از عصارهٔ متانولی تهیه‌شده، سریال‌های رقتی ۶/۲۵ ، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/ml در محیط مولرهینتون براث به-دست آمد. سپس به هر کدام از رقت‌ها ۱ ml از سوسپانیون باکتریایی فعال، $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml اضافه شد. در کنار لوله‌ها از کنترل مثبت(محیط کشت حاوی باکتری بدون عصاره) و کنترل منفی(محیط کشت بدون باکتری) استفاده شد. سرانجام لوله‌ها به-مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح‌شده بررسی شدند و آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد(عدم رشد) به‌مثابه MIC در نظر گرفته شد. پس از آن از تمامی لوله‌هایی که در آن‌ها عدم رشد باکتری مشاهده شده بود نمونه-برداری صورت گرفت و از طریق کشت در پلیت کمینه غلظت کشنده MBC (Minimum bactericidal concentration) تعیین شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه شدند. لولهٔ حاوی کمترین غلظت عصاره که در پلیت مربوط به آن عدم رشد باکتری قابل مشاهده بود، به‌صورت MBC آن ماده در نظر گرفته شد.

برای اثبات خاصیت ضد میکروبی اسانس برگ از روش تهیهٔ رقت در آگار استفاده شد؛ چنان‌که غلظت ۱۰۰۰ mg/ml اسانس در DMSO در محیط کشت مولرهینتون آگار تهیه شد. پلیت‌ها ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ ^{o}C قرار گرفتند. سوسپانسیون میکروبی با غلظت $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ cfu/ml تهیه و در جای مخصوص خود تلقیح شد. در کنار هر یک از پلیت‌های فوق از یک پلیت به‌مثابه شاهد که تنها حاوی DMSO و محیط کشت بدون اسانس بود استفاده شد. محیط‌های کشت تلقیح‌شده به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ^{o}C ۳۷ قرار داده شدند و پس از آن از نظر رشد یا عدم رشد باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفتند). برای آزمون‌های آنتی‌باکتریالی نانوذرات نقره، از شرکت NANO SANY ENGINEERS، نانوذرات نقره به ابعاد ۲۰ nm تهیه شد. سری‌های رقت مورد استفاده برابر با ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در این آزمون نیز از روش‌های انتشار از چاهک و آزمون تعیین MIC در محیط کشت-های مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث استفاده شد. طریقهٔ آماده‌سازی محیط‌های کشت، سوش‌های باکتریایی و روش انجام کار همانند روش‌های استفاده‌شده در آزمون عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار* بود. به‌منظور بررسی اثر سینرژیسمی مصرف هم-زمان نانوذرات نقره و عصارهٔ متانولی گیاه گل *همیشه‌بهار* که سری-های رقتی که در دو آزمون پیشین ذکرشد به‌هم افزوده شدند و در قالب یک غلظت مورد استفاده قرار گرفتند. روش انجام این بخش ازپ ژوهش همانند آزمون‌های پیشین بود. برای کاهش خطای آزمایش هر یک از آزمایش‌های فوق ۵ مرتبه تکرار شد. به‌منظور بررسی وجود اختلاف معنادار در نتایج به‌دست‌آمده از آزمون آنالیز واریانس و کای اسکوئر استفاده شد و اختلاف بین گروه‌ها در سطح معناداری $p < ۰/۰۰۱$ تعیین شد.

۳. نتایج

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های عصارهٔ متانولی *گل همیشه‌بهار* به روش انتشار چاهک در جدول شمارهٔ ۱ آمده است. مقایسهٔ بین

غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۴۰۰ mg/ml از عصارهٔ متانولی به روش انتشار چاهک بر چهار سویهٔ باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* نشان داد که دو باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* و *باسیلوس سرئوس* بیشترین حساسیت میکروبی در برابر عصارهٔ متانولی را دارند و این اثر بازدارندگی با افزایش غلظت عصارهٔ متانولی بر این دو باکتری افزایش یافت که به‌صورت افزایش هالهٔ عدم رشد دیده شد. نتایج حاصل از قطر هالهٔ عدم رشد نشان می‌دهد اثرات مهارکنندگی رشد عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار* بر باکتری‌های گرم منفی مورد آزمایش بسیار کم بوده است؛ به‌گونه‌ای که هیچ اثری از ممانعت رشد بر *سودوموناس آئروژینوزا* نداشت. غلظت‌های ۴۰۰ mg/ml عصارهٔ متانولی برگ اثر بازدارندگی کمی بر *اشریشیاکلی* نشان داد. مقادیر مربوط به کمینهٔ غلظت مهارکنندگی(MIC) و کمینهٔ غلظت کشندگی(MBC) عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار* بر ضد چهار باکتری مورد آزمایش در جدول شمارهٔ ۲ مشخص شده اند. نتایج حاصل نشان می‌دهد که غلظت ۲۵ mg/ml از عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار*، بر *استافیلوکوکوس* آرئوس اثر کشندگی دارد. غلظت کشندهٔ این عصاره علیه *باسیلوس سرئوس* ۱۲/۵ mg/ml به‌دست آمد. این نتایج بیانگر آن است که در بین باکتری‌های مورد آزمایش از نظر حساسیت عصارهٔ گیاه *گل همیشه‌بهار* اختلاف معناداری وجود دارد($p < ۰/۰۰۱$). به‌عبارت‌دیگر بیشترین حساسیت به عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار* در *باسیلوس سرئوس* و کمترین حساسیت در *سودوموناس آئروژینورا* وجود داشته است. آزمایش‌های مربوط به تأثیر غلظت ۱۰۰۰ mg/ml اسانس برگ بر ضد باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس آرئوس* و *اشریشیاکلی* اثر مهارکنندگی نشان داد و بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* هیچ اثر مهارکنندگی و کاهش رشد مشاهده نشد.

جدول ۱. قطر هالهٔ عدم رشد برحسبmm چهارسویهٔ باکتری از عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار* در غلظت‌های مختلف

کنترل مثبت	کنترل منفی	۴۰۰	۵۰	۳۰	۲۰	غلظت عصاره(mg/ml) / سویهٔ باکتری
۲۰	--	۱۸	۱۰	۹	۷	استافیلوکوکوس آرئوس
۱۹	--	۱۸	۸	۸	--	باسیلوس سرئوس
۲۶	--	۱۲	--	--	--	اشریشیای کلی
۲۲	--	--	--	--	--	سودوموناس آئروژینورا

جدول۲. کمینه غلظت مهارکنندگی و کمینه غلظلت کشندگی عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار* بر باکتری‌های مورد آزمایش بر حسب (mg/ml)

MBC	MIC	غلظت عصاره(mg/ml) / سویهٔ باکتری
۲۵	۱۲/۵	استافیلوکوکوس آرئوس
۱۲/۵	۶/۲۵	باسیلوس سرئوس
۲۰۰	۱۰۰	اشریشیای کلی
--	--	سودوموناس آئروژینورا

تأثیر غلظت‌های نانوذرات نقره بر باکترهای بیماری‌زا، نشان داد که اثرات مهاری نانوذرات نقره بر باکتری‌های گرم منفی بیش از باکتری‌های گرم مثبت بود. نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره به روش انتشار از چاهک در جدول شمارهٔ۳ آمده است.

جدول ۳. قطر هالهٔ عدم رشد باکتری‌ها برحسب میلی‌متر در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره به روش انتشار از چاهک

کنترل مثبت	کنترل منفی	۸۰	۴۰	۲۰	۱۰	غلظت نانوذرات (µg/ml) / سویهٔ باکتری
۲۰	-	۱۵/۹	۱۳/۸	۱۲/۲	۱۰/۱	استافیلوکوکوس آرئوس
۱۹	-	۱۶/۲	۱۴/۶	۱۲/۴	۱۰/۴	باسیلوس سرئوس
۲۶	-	۱۷/۴	۱۵/۹	۱۳/۴	۱۲	سودوموناس آئروژینورا
۲۲	-	۱۶/۹	۱۵/۱	۱۱/۸	۱۱/۲	اشریشیای کلی

نتایج این آزمون نشان می‌دهد که نان ذرات نقره بیشترین تأثیر را بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و کمترین تأثیر را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته است(جدول ۴).

جدول ۴. آزمون µg/ml MBC /MIC باکتری‌ها برحسب میلی‌متر در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره به روش لوله‌ای

غلظت نانوذرات (µg/ml) / سویهٔ باکتری	MIC µg/ml	MBC µg/ml
استافیلوکوکوس آرئوس	۵۰	۱۰۰
باسیلوس سرئوس	۵۰	۵۰
سودوموناس آئروژینورا	۱۲/۵	۲۵
اشریشیای کلی	۶/۲۵	۱۲/۵

با مخلوط‌کردن رقت‌های تهیه‌شدهٔ نانوذرات نقره و عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار* در آزمون‌های پیشین، یک غلظت ترکیبی به‌دست آمد. نتایج آزمون ضد باکتریایی این ترکیب در جداول ۵ و ۶ که با روش‌های انتشار از چاهک و آزمون MIC انجام گرفته شده است.

جدول ۵. قطر هالهٔ عدم رشد باکتری‌ها برحسب میلی‌متر در غلظت‌های ترکیبی نانوذرات نقره و عصارهٔ متانولی *گل همیشه‌بهار* به روش انتشار از چاهک

غلظت عصاره(mg/ml) و نانوذرات (µg/ml) / سویهٔ باکتری	mg/ml۲۰ µg/ml۱۰+	mg/ml۳۰ µg/ml۲۰+	mg/ml۵۰ µg/ml۴۰+	mg/ml۴۰۰ µg/ml۸۰+	کنترل منفی	کنترل مثبت
استافیلوکوکوس آرئوس	۱۱/۸	۱۳/۳	۱۴/۹	۱۶/۵	-	۲۰
باسیلوس سرئوس	۱۱/۵	۱۳	۱۴/۸	۱۶/۲	-	۱۹
سودوموناس آئروژینورا	۱۳	۱۳/۳	۱۵/۸	۱۷/۷	-	۲۶
اشریشیای کلی	۱۱/۳	۱۲/۶	۱۵	۱۷	-	۲۲

در روش چاهک نتایج نشان داد که افزایش شدیدی در اندازهٔ هالهٔ عدم رشد باکتری‌ها صورت گرفته است که این افزایش بیشتر در باکتری‌های گرم منفی دیده شد.

جدول ۶. آزمون mg/ml MBC /MIC باکتری‌ها برحسب میلی‌متر در غلظت‌های مختلف

غلظت عصاره(mg/ml) و نانوذرات(µg/ml) / سویهٔ باکتری	MIC µg/ml, mg/ml	MBC µg/ml, mg/ml
استافیلوکوکوس آرئوس	۶/۲۵	۲۵
باسیلوس سرئوس	۶/۲۵	۱۵/۵
سودوموناس آئروژینورا	۳/۱۲۵	۶/۲۵
اشریشیای کلی	۶/۲۵	۱۲/۵

نتایج این آزمون نشان م دهد که با ادغام نان نقره و عصارهٔ *گل همیشه‌بهار* تمامی باکتری‌ها زیر تأثیر این ترکیب قرار گرفتند؛ چنان‌که کمینه غلظت ممانعت‌کنندگی و کشندگی باکتری‌ها در مقایسه با آزمون‌های پیشین کاهش معناداری داشته است($p < ۰/۰۰۱$). این ترکیب بیشترین تأثیر را بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* داشت و کمترین اثر را بر

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*.

۴. بحث

انسان‌ها از دیرباز از گیاهان در نقش افزودنی‌های غذایی، نیز درمان بیماری‌ها استفاده کرده‌اند. در حال حاضر در سراسر جهان سالانه گیاهان زیادی به‌لحاظ دارابودن ویژگی‌های درمانی مورد بررسی قرار می‌گیرند. بخشی از این پژوهش‌ها بر تعیین خصوصیات ضد میکروبی گیاهان دارویی متمرکز است. این امر با توجه به بروز مشکلاتی از جمله مقاومت‌های میکروبی و عوارض آنتی‌بیوتیک‌ها تأیید شده است. پایین بودن دوز عفونت-زایی بسیاری از پاتوژن‌های غذازاد نیازمند تحقیق‌های گسترده در زمینهٔ ترکیب‌های دارویی جدید با توان باکتری‌کشی بالا است که در راستای نیل به این هدف استفاده از ترکیب‌های روغنی حاصل از گیاهان برای تأمین سلامت و بهداشت غذا پر اهمیت است(۳۰). باتوجه به تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها در مقادیر بسیار اندک و در حد میکروگرم بر روی باکتری‌های پاتوژن در مورد گیاهان نیز سعی می‌شود تا با غربالگری آن‌ها گیاهانی که اثر ضد میکروبی قوی‌تری دارند مشخص شوند تا با کاربرد غلظت‌های پایین‌تر آن‌ها از خصوصیات ضد میکروبی مطلوب-تری بهره جست. از گیاه *گل همیشه‌بهار*، یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی مرسوم، به‌طور گسترده‌ای در طب سنتی ایران استفاده می‌شود. این گیاه از خانوادهٔ کاسنیان است که برای درمان تعداد زیادی از بیماری‌ها و در ترکیب با داروهای هموپاتیک استفاده شده است و تاریخچهٔ مصرف آن در پزشکی به قرن دوازدهم باز می‌گردد. از این گیاه به‌صورت داروی سنتی در رژیم‌های غذایی نیز استفاده شده است(۳۱). قسمت مورد استفادهٔ این گیاه برگ و گل آن است و مهم‌ترین مواد مؤثرهٔ درمانی آن شامل فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، تری‌ترپنوئیدها، کاروتنوئیدها، استرول، کلسترول، ویتامینه‌ای A، اسیدهای آلی، لعاب، مواد موسیلاژی، صمغ و آلبومین است. افزون‌براین، گیاه *گل همیشه‌بهار* دارای ۰/۲ – ۰/۴ درصد اسانس است که اجسام مهم آن شامل منتون، ایزومنتون، گاماترپی نن، کاریوفیلن و توکوفرول، پلی‌ساکاریدها، کالاندولین، آلفاوبتا آمیرین و تاراگزاسترول هستند(۱۶, ۳۲). در این پژوهش مشخص شد که عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار* در غلظت‌های حدود ۳۰ mg/ml از رشد باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمایش پیشگیری می‌کند؛ درحالی‌که برای اثر بر باکتری‌های گرم منفی به غلظت‌های بالاتری از آن نیاز است. اسانس آن نیز اثر بازدارندگی چشمگیری بر *استافیلوکوکوس آرئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیاکلی* دارد. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر خاصیت ضد باکتریایی عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار* بر ضد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است. اثر بازدارندگی رشد این عصاره بر باکتری‌های گرم مثبت از غلظت حدود ۳۰ mg/ml آغاز می‌شود. با افزایش غلظت عصاره تا ۴۰۰ mg/ml ناحیهٔ عدم رشد به نحو چشمگیری افزایش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که اثر عصارهٔ متانولی بر ضد باکترهای گرم منفی بسیار ضعیف‌تر از انواع گرم مثبت است؛ به‌گونه‌ای که در غلظت ۴۰۰ mg/ml از عصارهٔ متانولی برگ تأثیر بازدارندگی ضعیفی بر ضد *اشریشیاکلی* نشان می‌دهد و در هیچ‌یک از غلظت‌های مورد آزمون اثر بازدارندگی بر *سودوموناس آئروژینوزا* ندارد و دلیل احتمالی این است که حضور لیپوپلی ساکاریدهای دیوارهٔ سلولی احتمالا مانع از رسیدن ترکیب‌های فعال اسانس و عصاره به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی می-شوند(۳۳). به‌طور کلی فراورده‌های گیاهی منجر به گرانوله شدن سیتوپلاسم، گسیختگی غشای سیتوپلاسمی(۳۴) غیر فعال‌شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم‌های درون‌سلولی و برون-سلولی و متلاشی‌شدن دیواره سلولی می شوند(۳۵). به‌طوری‌که بیشتر عصاره‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم مثبت اثر بازدارندگی و بر باکتری‌های گرم منفی تأثیر کمتری دارند که از این میان باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم‌ترین باکتری نسبت به اغلب عصاره‌های گیاهی است. غفاری و همکاران در مقاله‌ای با عنوان "ارزیابی کشندگی عصارهٔ الکلی و آبی *گل همیشه‌بهار* بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی" نشان دادند که عصارهٔ *گل همیشه‌بهار* اثر لیشمانیاکشی خوبی دارد و به‌احتمال می‌تواند در درمان لیشمانیا به‌کار رود(۳۶). دوستار و همکاران در پژوهشی با عنوان" تأثیرعصارهٔ *گل همیشه‌بهار* بر بیان پروتئین بتا-کاتنین هسته‌ای در سرطان کولورکتال موش صحرایی "به این نتیجه رسیدند که عصاره *گل همیشه‌بهار* بر بیان پروتئین بتا-کاتنین هسته‌ای درسلول‌های نابه‌جای کریپتی در سرطان کولورکتال تجربی در موش صحرایی اثر مهاری دارد(۳۷). قاسمی پیربلوطی و همکاران در مقاله‌ای با عنوان "اثراسیدجاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدها در عصارهٔ *گل همیشه‌بهار*" نشان دادند که اثرات تیمارهای محلول‌پاشی اسیدجاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان کاروتنوئید و میزان پلی‌فنل در عصارهٔ *گل همیشه‌بهار*در سطح احتمال یک درصد و بر میزان فلاونوئید کل در سطح ۵ درصد معنادار بودند(۳۲). Haroonو همکاران در مقاله‌ای با عنوان "بررسی خواص آنتی-اکسیدانی و آنتی‌گلیسیمی عصارهٔ *گل همیشه‌بهار*" نشان دادند که این گیاه دارای خاصیت ضداکسیدانی است و نقش مؤثری

در کاهش عوارض ناشی از بیماری دیابت یک دارد(۳۸). Alicia و همکاران در مقاله‌ای با عنوان "بررسی تأثیر عصاره *گل همیشه‌بهار* بر التهابات حاد و مزمن دهان در موش نژاد ویستار" به این نتیجه رسیدند که گیاه *گل همیشه‌بهار* اثر ضد التهابی دارد(۳۹). زارع مهذبیه و همکاران در تحقیقی با عنوان "مقایسهٔ تأثیر گل گیاه *همیشه‌بهار* با سفالسپورین‌ها بر باکتری‌های جداشده از بیماران مبتلا به سلولیت" نشان دادند که باکتری-های گرم مثبت مانند استرپتوکوکوس و استافیلوکوکوس نسبت به عصاره حساس و باکتری‌های گرم منفی مانند اشریشیا، سودوموناس و پروتئوس در برابر این عصاره مقاوم بودند که نتایج پژوهش حاضر با نتایج محققان فوق هم‌خوانی دارد(۴۰). نانوذرات نقره به‌دلیل اندازهٔ کمی که دارند، سطح تماس بیشتری با فضای بیرون دارند و تأثیر بیشتری بر غشای سلول‌ها می-گذارند(۴۱). Khosravi-Darani و همکارانش طی پژوهشی مشخص کردند که اثرات مهاری نانوذرات نقره بر باکتری‌های *اشریشیاکلی* بیش از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* است. نانوذرات نقره امید تازه‌ای است برای درمان باکتری بیماری‌زای انسانی که مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها توسعه یافته است(۴۲). Kim گزارش کرد که نانوذرات نقره با قطر ۲۰ نانومتر می‌تواند مانع رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* شود(۴۳). از پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که بیشترین اثر ضد باکتریایی عصارهٔ گیاه *گل همیشه‌بهار* بر ضد باکتری‌های گرم مثبت است؛ به‌گونه‌ای که ترکیب‌های فعال موجود در این عصاره بر *سودوموناس آئروژینوزا* که واجد غشای خارجی همراه با پورین‌هایی با منافذ بسیار کوچک است، هیچ‌گونه اثر بازدارندگی رشد ندارد. با توجه به اثر ضد باکتریایی چشمگیر عصارهٔ متانولی گیاه *گل همیشه‌بهار* بر باکتری‌های بیماری‌زا به‌ویژه نمونه‌های گرم مثبت که در ایجاد انواع عفونت‌های مخرب و بیمارستانی نقش دارند، این عصاره می‌تواند یک فرآوردهٔ گیاهی طبیعی مدنظر قرار گیرد.

قدردانی

این پژوهش بر اساس طرح پژوهشی تأییدشده از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر صورت گرفته است که بدین‌وسیله از این معاونت قدردانی می‌شود.

References

[1]. Adwan G, Abu-Shanab B, Adwan K. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa strains. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2010;3(4):266-9.
[2]. Jafari-Sales A, Pashazadeh M. Study of chemical composition and antimicrobial properties of Rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oil on Staphylococcus aureus and Escherichia coli in vitro. International Journal of Life Sciences and Biotechnology. 2020;3(1):62-9.
[3]. Jafari-Sales A, Pashazadeh M. Antibacterial Effect of Methanolic Extract of Saffron Petal (Crocus sativus L.) on Some Standard Gram Positive and Gram Negative Pathogenic Bacteria In vitro. Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants (CUPMAP). 2020;3(1):1-7.
[4]. Jafari-Sales A, Shahniani A, Fathi R, Malekzadeh P, Mobaiyen H, Bonab FR. Evaluation of Antibacterial Activity of Essential Oil of Ziziphora clinopodioides and Achillea wilhelmsii on Antibiotic-resistant Strains of Staphylococcus aureus. Internal Medicine and Medical Investigation Journal. 2017;2(2):49-56.
[5]. Mobaiyen H, Jafari Sales A, Sayyahi J. Evaluating Antimicrobial Effects of Centaurea Plant's Essential Oil on Pathogenic Bacteria: Staphylococcus Aureus, Staphylococcus Epidermidis, and Escherichia Coli Isolated from Clinical Specimens. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2016;5(4):479-87.
[6]. Jafari-Sales A, Mobaiyen H, Jafari B, Sayyahi J. Assessment of Antibacterial Effect of Alcoholic Extract of Centaurea depressa MB, Reseda lutea L. and Fumaria asepala on Selected Standard Strains in Vitro. Scientific Journal of Nursing, Midwifery and Paramedical Faculty. 2019 Dec 10;5(3):63-73.
[7]. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food control. 2007;18(5):414-20.
[8]. Celiktas OY, Kocabas EH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser K. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry. 2007;100(2):553-9.
[9]. Mobaiyen H, Jafari-Sales A. Antibacterial effects of methanolic extracts of Reum ribes L. and Hyssopus officinalis on some standard pathogenic bacteria. Jorjani Biomedicine Journal. 2019 Sep 10;7(3):34-44.
[10]. Hussain AI, Anwar F, Sherazi STH, Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (Ocimum basilicum) essential oils depends on seasonal variations. Food chemistry. 2008;108(3):986-95.
[11]. Jafari-Sales A, Bagherizadeh Y, Malekzadeh P, Ahmadi B, Bonab F. Evaluation of the Antimicrobial Effects of Essential Oil of Reseda Lutea L. on Pathogenic Bacteria: Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, and Escherichia coli. Archives of Clinical Microbiology. 2017;8(3).
[12]. Jafari-Sales A, Jafari B, Sayyahi J, Zohoori-Bonab T. Evaluation of antibacterial activity of ethanolic extract of malva neglecta and althaea officinalis l. On antibiotic-resistant strains of staphylococcus aureus. J Biol Today World. 2015;4(2):58-62.
[13]. Jafari-Sales A, Rasi-Bonab F, Sayyahi J. The Survey on Antimicrobial Effects of Methanolic Extract of Carum Copticum L. on Staphylococcus Aureus, Bacillus Cereus, Escherichia Coli and Pseudomonas Aeruginosa in Laboratory Conditions. Paramedical Sciences and Military Health. 2019 Mar 1;13(4):19-25.
[14]. Khafagi IK, Dewedar A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. Journal of ethnopharmacology. 2000;71(3):365-76.
[15]. Sales AJ. Evaluation of antibacterial activity of ethanol extract of lavandula stoechas l. plant on antibiotic-resistant strains of staphylococcus aureus. Journal of Current Research in Science. 2014;2(6):641.
[16]. Khalid KA, EL-Ghorab AH. The effect of presowing low temperature on essential oil content and chemical composition of Calendula officinalis. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2006;9(1):32-41.
[17]. Jafari-sales A, Shadi-Dizaji A. Evaluation of Inhibitory Effect of Methanol Extract of Allium Sativum in vitro on

Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Scientific Journal of Nursing, Midwifery and Paramedical Faculty. 2019 Jul 10;5(1):61-8.
[18]. Sundar Rao K. Antibacterial activity of some medicinal plants of Papua New Guinea. International journal of pharmacognosy. 1996;34(3):223-5.
[19]. Vlietinck A, Van Hoof L, Totte J, Lasure A, Berghe DV, Rwangabo P, et al. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. Journal of ethnopharmacology. 1995;46(1):31-47.
[20]. Zargari A. Medicinal plants: Tehrari University Publications. ISBN; 1995.
[21]. Kemper KJ. Calendula (Calendula officinalis .(Longwood Herbal Task Force. 1999;1.
[22]. MH SS. Medicinal plants and treatment by plants. Tehran: Donyae Taghzieh Publication; 2006.
[23]. Dorman H, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of applied microbiology. 2000;88(2):308-16.
[24]. Krag K. Plants used as contraceptives by the North American Indians: an ethnobotanical study. Botanical Museum Cambridge, MA: Harvard University. 1976;1177.
[25]. Mozherenkov V, Shubina L. Treatment of chronic conjunctivitis with Calendula. Meditsinskaia sestra. 1976;35(4):33.
[26]. Vijayasarathy V, Sharma L, Prakash A. Indigenous drug treatment for hemorrhoids. Probe. 1981;20(4):285-7.
[27]. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann M-C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. Toxicological sciences. 2005;88(2):412-9.
[28]. Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M, Hofmann T. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. Ecotoxicology. 2008 Jul 1;17(5):326-43.
[29]. Hussain SM, Javorina AK, Schrand AM, Duhart HM, Ali SF, Schlager JJ. The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion. Toxicological sciences. 2006;92(2):456-63.
[30]. Gill A, Holley R. Disruption of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakei cellular membranes by plant oil aromatics. International journal of food microbiology. 2006;108(1):1-9.
[31]. Zitterl-Eglseer K, Sosa S, Jurenitsch J, Schubert-Zsilavecz M, Della Loggia R, Tubaro A, et al. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (Calendula officinalis L.). Journal of ethnopharmacology. 1997;57(2):139-44.
[32]. Ghasemi Pirbalouti A, Mosavi Haris SA, Tirgir F, Hamedi B. Effect of jasmonic acid and salicylic acid on polyphenol and flavenoids in extract of Calendula officinalis L. flower. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs). 2012;3(3):175-80.
[33]. Duraipandiyan V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. BMC complementary and alternative medicine. 2006;6(1):35.
[34]. Caccioni DR, Guizzardi M, Biondi DM, Renda A, Ruberto G. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on Penicillium digitatum and Penicillium italicum. International Journal of Food Microbiology. 1998;43(1-2):73-9.
[35]. Kraft K, Hobbs C. Pocket guide to herbal medicine: Georg Thieme Verlag; 2004.
[36]. Maspi N, Ghafarifar F ,Bahrami A, Bastaminejad S, SHAMSI M. Evaluation of leishmanicidal effect of watery & ethanolic flowers calendula officinalis extract on promastigotes of leishmania major (MRHO/IR/75/ER) in Vitro. 2010.
[37]. Doustar U, Mohajeri D. Immunohistochemical Study of the Effect of Calendula Officinalis of ÃŸ-catenin Protein Expression in Experimental Colon Cancer. Govaresh. 2010;15(1):26-31.
[38]. Ahmad H, Khan I, Wahid A. Antiglycation and antioxidation properties of juglans regia and calendula officinalis: possible role in reducing diabetic complications and slowing down ageing. Journal of Traditional Chinese Medicine. 2012;32(3):411-4.
[39]. Lagarto A, Bueno V, Guerra I, Valdés O, Vega Y, Torres L. Acute and subchronic oral toxicities of Calendula officinalis extract in Wistar rats. Experimental and toxicologic pathology. 2011;63(4):387-91.
[40]. Eslami G, Taheri S, Ayatollahi SA, Zare Mohazzabiyyeh R. Effects of Calendula officinalis extract on bacteria isolated. Research in Medicine. 2011 Jan 1;34(4):214-8.
[41]. Nakagawa Y, Shimazu K, Ebihara M, Nakagawa K. Aspergillus niger pneumonia with fatal pulmonary oxalosis. Journal of Infection and Chemotherapy. 1999;5(2):97-100.
[42]. Asadi M, Khosravi-Darani K, Mortazavi A, Hajseyed Javadi N, Azadnia E, Kiani Harchegani A, et al. Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by chemical reduction on Staphylococcus aureus and Escheirchia coli. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2014;8(4):83-92.
[43]. Kim J-S. Antibacterial activity of Ag+ ion-containing silver nanoparticles prepared using the alcohol reduction method. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2007;13(5):718-22.

Comparative study on the effects of silver nanoparticles and methanolic extracts of Calendula officinalis on pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* under laboratory conditions

Behboud Jafari[1*], Alireza monadi sefidan[2]

1. Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
2. Department of Microbiology, College of Medicine, Tehran Medicine University, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: In recent years, the drug resistance and side effects of antimicrobial drugs have increased in the treatment of infections. Therefore, the use of new herbal medicines with less side effects and nanotechnology in the medical arena can be a great help in treating these types of infections. The purpose of this study is to compare the effects of silver nanoparticles and methanolic extracts of *Calendula officinalis* on four strains of pathogens bacterial.

Materials and Methods: In this descriptive-laboratory study, the plant was identified as a plant of *C.officinalis*, based on herbological characteristics in the Herbarium section of Islami Azad University, Ahar Branch. In this study, the antimicrobial effects of methanolic extract of *C.officinalis* were studied by Soxhlet extractor method at concentrations of 20 mg / ml to 400 mg / ml of methanolic extract and 10 to 80 µg / ml concentrations of silver nanoparticles. Then, their antibacterial effects were investigated using well-diffusion and dilution methods.

Results: The findings showed that methanolic extract of *C.officinalis* prevents the growth of *S.aureus*, *B.cereus* and *E.coli*. While the inhibitory effect of silver nanoparticles on *P.aeruginosa* and *E.coli* bacteria is more than gram-positive bacteria. The effect of the combination of *C.officinalis* extract and silver nanoparticles was much greater than the effect of each of them.

Conclusion: The results showed that the flower extract of the *C.officinalis* has an antibacterial effect. Therefore, this extract can be a good option for future studies in In Vivo to provide antibacterial drugs.

Received: 2018/11/07
Accepted: 2018/12/30

Keywords Antibacterial, *Calendula officinalis*, Silver nanoparticles.