بررسی اثر نانوذرات نقره بر قدرت ضد میکروبی عصاره الکلی گیاه اسپند در برابر باکتری اشریشیاکلای

مهدی موسوی کمازانی*

پردیس علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۰۹ تاریخ تصحیح: ۹۷/۰۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۲۵

چکیده

امروزه استفاده از گیاهان دارویی به دلیل کاهش اثرات و عوارض جانبی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. گیاه اسپند از دیرباز برای ضدعفونی کردن رواج داشته است. این مطالعه به هدف بررسی اثر نانوذرات نقره بر قدرت ضد میکروبی گیاه اسپند روی باکتری اشریشیاکلای صورت گرفته است. ابتدا نانوذرات نقره با روشی جدید و سبز تهیه و سپس برای تولید نانوکامپوزیت نقره/عصاره اسپند به کار گرفته شدند. فرایند آنتی باکتریال با استفاده از روش دیسک گذاری دیفیوژن بر محیط کشت مولرهینتون صورت گرفت. با توجه به هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک‌ها که بیانگر اثرات آنتاگونیستی نانوذرات نقره و عصاره الکی گیاه اسپند می‌باشد، قدرت ضد میکروبی نانوکامپوزیت حاصل در مقایسه با هر کدام از نانوذرات نقره و گیاه اسپند به طور جداگانه بیشتر است. با توجه به نتایج می‌توان از این ترکیب در ساخت مواد ضدعفونی کننده بهره برد.

کلمات کلیدی : نانوذرات نقره، عصاره اسپند، ضد میکروبی، اشریشیاکلای.

۱- مقدمه

اثرات جانبی استفاده از آنتی بیوتیک‌های شیمیایی باعث روی آوردن به استفاده از آنتی بیوتیک‌های گیاهی شده است و اثر آنتی باکتریال بسیاری از گیاهان نیز به اثبات رسیده است [۳-۱]. گیاه اسپند به دلیل دارا بودن آلکانوئیدهای مختلف دارای اثرات آنتی باکتریال می‌باشد [۶-۴]. اسپند، گیاهی چندساله یا پایا از تیره نیتراریاسه (Nitrariaceae) است. نام انگلیسی اسپند (Syrian rue) به دلیل شباهت این گیاه به سِداب (Rue) اتخاذ شده است. این گیاه از اوایل خرداد تا اوایل شهریور گل می‌دهد و گل‌های آن سفید رنگ هستند. کپسول‌های حاوی دانه، سه حفره ای بوده و حدود پنجاه دانه را در خود نگهداری می‌کنند [۴].

***.نویسنده مسئول**: استادیار پردیس علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان M.Mousavi@semnan.ac.ir

گل‌ها و مخصوصاً دانه‌های اسپند سرشار از آلکالوئیدهای گروه بتا-کربولین است که همگی بازدارنده‌های مونوآمین اکسیداز هستند؛ به همین دلیل خوردن جوشانده اسپند در اندازه‌های کم (۱ الی ۳ گرم) خواص ضد افسردگی و آرام بخش و در اندازه‌های زیاد (۳ الی ۱۵ گرم) خواص روان گردان دارد. آنزیم مونوآمین اکسیداز در بدن وظیفه هضم و شکستن بسیاری از مولکول‌های طبیعی مصرفی انسان را دارد؛ یک دسته مهم از این مولکول‌های طبیعی، ایندول آلکالوئیدها هستند که اکثراً روان گردان‌های قوی محسوب می‌شوند [۵]. در تحقیقات آزمایشگاهی، عصاره اسفند خواص ضد میکروبی در برابر میکروب‌هایی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلای و کاندیداآلبیکانس را نشان داده است [۹-۶]. به تازگی آلکالوییدهای بتاکاربولین موجود در گیاه و دانه‌های اسپند به دلیل خاصیت ضد تومور (ضد سرطان) آن مورد توجه قرار گرفته‌اند. ترکیبات شیمیایی گیاه اسپند شامل مواد ضد میکروبی از نوع فلاونوئیدها و آلکالوئیدها می‌باشد و در بخش‌های مختلف آن (دانه، کالوس و نهال) زیاد یافت می‌شود. از جمله آلکالوئیدهای مهم آن می‌توان به هارمین، هارمالین، هارمالول، پگانین و آلکالوئیدهای کینازولین اشاره کرد [۱۰]. اشریشیاکلای اولین بار در سال ۱۸۸۵ توسط تئودور اشریش تعریف گردید. این ارگانیسم به عنوان قسمتی از فلور نرمال روده چند ساعت بعد از تولد، سیستم گوارش انسان و حیوانات پستاندار را کلونیزه نموده و با این عمل نقش مهمی در فیزیولوژی سیستم گوارش ایفا می‌نماید. لازم به ذکر است که برخی از سویه‌های اشریشیاکلای با به دست آوردن عوامل ویرولانس از طریق عوامل ژنتیکی قابل انتقال مانند پلاسمیدها، ترانسپوزن‌ها، باکتریوفاژها و لوکوس‌های پاتوژنیسیتی به صورت سویه‌های بیماری‌زا درمی‌آیند [۱۱].

تا به حال مطالعات زیادی در مورد اثرات ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی صورت گرفته است. در مطالعه‌ای صفاهانی و همکارانش اثرات ضد میکروبی ۲۳ گونه مختلف گیاهی از جمله اسپند را روی استافیلوکوکوس مقاوم و حساس به متی‌سیلین انجام دادند و قدرت آنتی باکتریال گیاه اسپند را مشخص کردند. در مطالعه‌ی دیگری اثر ضد میکروبی عصاره اسپند روی چندین باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک از جمله سالمونلاتیفی بررسی شد و عصاره‌ی اسپند اثرات آنتی بیوتیکی خوبی علیه میکرو ارگانیسم‌های مقاوم به چندین آنتی بیوتیک نشان داد [۱۲]. در آزمایش دیگری اثر عصاره‌ی الکلی اسپند روی مخمر در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. بر اساس نتایج حاصل عصاره الکلی دانه‌های اسپند فعالیت مهارکننده و کشنده‌ی قابل توجهی روی مخمرها دارند. در مطالعه‌ای که توسط فضلی بزاز و همکارانش صورت گرفت اثرات ضدمیکربی دود و آلکالوئیدهای گیاه اسپند با استفاده از روش رقت در آگار و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد میکروارگانیسم (MIC) بررسی شد. همچنین، اثر ضدمیکروبی دود حاصل از سوزاندن وزن مشخصی از دانه‌های اسپند با وارد کردن دود به محیط کشت حاوی میکروب مطالعه شد و حداقل وزن اسپند سوزانده شده برای مهار رشد میکروب محاسبه گردید [۱۳]. با وجود مطالعات گسترده که چند مورد هم در بالا ذکر شد اما باز هم چالش‌هایی برای ضرورت تحقیقات در این زمینه وجود دارد از جمله: در مطالعه‌های فوق بررسی اثر آنتی بیوتیکی عصاره

گیاه اسپند با روش دیسک گذاری دیفیوژن انجام نگرفته است. علاوه بر این، اثر افزایشی نانوذرات نقره بر قدرت آنتی باکتریال عصاره اسپند نیز بررسی نشده است. این مطالعه با هدف رفع چالش‌های مذکور و نیز افزایش قدرت آنتی‌باکتریال عصاره گیاه اسپند توسط نانوذرات نقره علیه باکتری اشریشیاکلای انجام شد. برای این منظور، ابتدا نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره‌ی گیاه نارنگی به عنوان عامل کاهنده و نیز پوشاننده تولید کردیم. عصاره‌ی بعضی گیاهان حاوی مولکول‌های زیادی می‌باشند که می‌توانند به عنوان کاهنده، پوشاننده و رنگینه مورد استفاده قرار گیرند. ما در کارهای قبلی خود بعضی از آن‌ها را معرفی کرده و برای تولید نانوساختارها و نیز سلول‌های خورشیدی به کار بردیم [۱۴, ۱۵].

۲-بخش تجربی

۲-۱- مواد

تمامی مواد از شرکت مرک خریداری شدند و هیچ‌گونه خالص‌سازی مجددی انجام نشد. پلیت باکتری اشریشیا کلای با سویه‌ی دی اچ ۵ آلفا و شماره‌ی ATCC 2790 از دانشگاه علوم پزشکی سنندج تهیه شد. برای تهیه‌ی پودر گیاه، برگ‌های درخت نارنگی جمع آوری و پس از شستن به مدت چهار روز در سایه خشک و آسیاب شدند.

۲-۲- روش های آزمایشگاهی

۲-۲-۱- عصاره‌گیری با روش ماسراسیون

۲۰۰ گرم گیاه خرد شده در ظرفی مناسب (شیشه، استیل، چینی و غیره) ریخته شد و مقدار ۱ لیتر متانول ۷۰ درصد به آن اضافه گردید. برای جلوگیری از اثرات تابش نور روی مواد گیاهی، عمل عصاره‌گیری در مکانی محفوظ از تابش مستقیم نور انجام گرفت. همچنین، با محکم کردن درب ظرف از تبخیر حلال جلوگیری شد. عصاره‌گیری ضمن هم زدن مکرر طی ۵ روز انجام شد. سپس، عصاره حاصل را صاف و باقیمانده گیاهی با دستگاه پرس تحت فشار قرار گرفت. در نهایت عصاره‌ها با هم مخلوط و در دمای کمتر از ۱۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۵ روز نگهداری شدند [۱۶].

۲-۲-۲- تولید نانوذرات نقره

مخلوطی از ۱۵ میلی‌لیتر عصاره‌ی گیاه و ۷۵ میلی‌لیتر محلول نقره نیترات ۶ میلی مولار تهیه شد و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم دردمای ۵۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از کدر شدن رنگ محلول، رسوب حاصل با دستگاه سانتریفیوژ جدا شد.

۳-۲-۲- روش دیسک گذاری

۱-۳-۲-۲- تهیه‌ی محیط کشت مولرهینتون آگار

مقدار لازم از محیط کشت در آب مقطر ریخته و حرارت داده شد تا به جوش آمد و شفاف گردید. سپس، محلول حاصل جهت استریل شدن به اتوکلاو (با فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱درجه به مدت ۱۵دقیقه) منتقل شد. در ادامه، چند پلیت استریل شده با الکل در زیر هود دور یک چراغ الکلی روشن قرار گرفتند. به اندازه ۱۵ میلی‌لیتر از محیط استریل شده درون هر پلیت ریخته شد و زمان داده شد تا محیط جامد گردید. فیلد دسته بلند با شعله استریل گشت و کشت خطی شروع شد. نمونه‌های تهیه شده در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس ازگذشت ۲۴ ساعت نمونه‌ها از انکوباتور خارج شدند. به تعداد لازم پلیت شیشه‌ای و لوله آزمایش استریل شدند. در زیر هود با شرایط استریل و چراغ روشن، در هر پلیت یک یا دو عدد دیسک شاهد با پنس استریل شده قرار داده شد. دیسک‌ها از عصاره‌ی تغلیظ شده (۵٪ وزنی-وزنی در حلال اتانول) پر شدند و زمان داده شد تا دیسک‌ها خشک شدند. سپس، با پنس استریل در هر پلیت حاوی ای کلای (E. coli) مثبت، تعداد ۵ عدد دیسک حاوی عصاره گذاشته شد. پس از۲۴ ساعت انکوبه کردن برخی از دیسک‌ها هاله عدم رشد را ایجاد کرده بودند. دو بار دیگر آزمایش تکرار شد و همان نتایج به دست آمد [۱۷, ۱۸].

۲-۳-۲-۲- روش چاهک‌گذاری

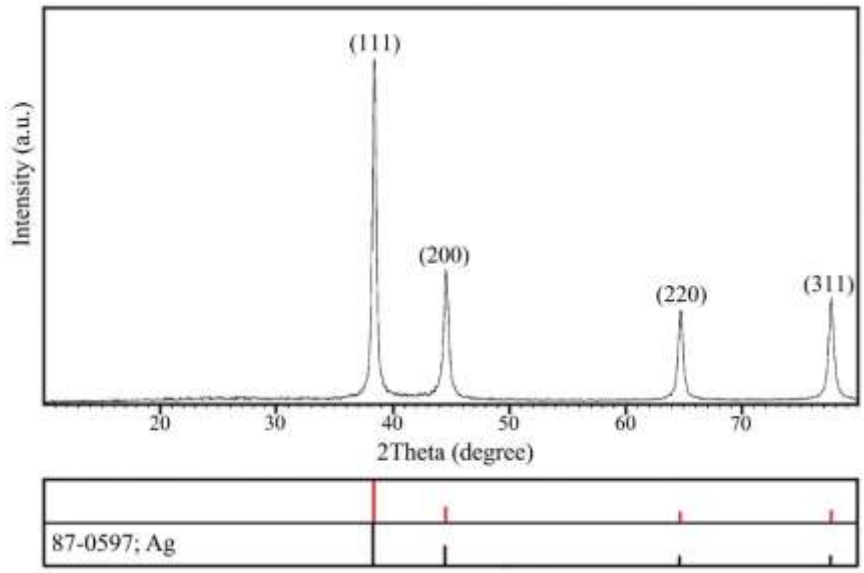
روش کار همانند روش دیسک گذاری بود اما به جای قرار دادن دیسک، با استفاده از قسمت انتهایی پیپت پاستور در محیط کشت چاهکی ایجاد و محیط کشت آن قسمت خارج گردید. سپس، داخل چاهک ها ۱۰ میکرولیتر از عصاره ریخته شد و بقیه مراحل کار مانند روش دیسک گذاری ادامه یافت. هدف از انجام این مرحله مقایسه روش دیسک گذاری و چاهک بود [۱۹].

۳- نتایج و بحث

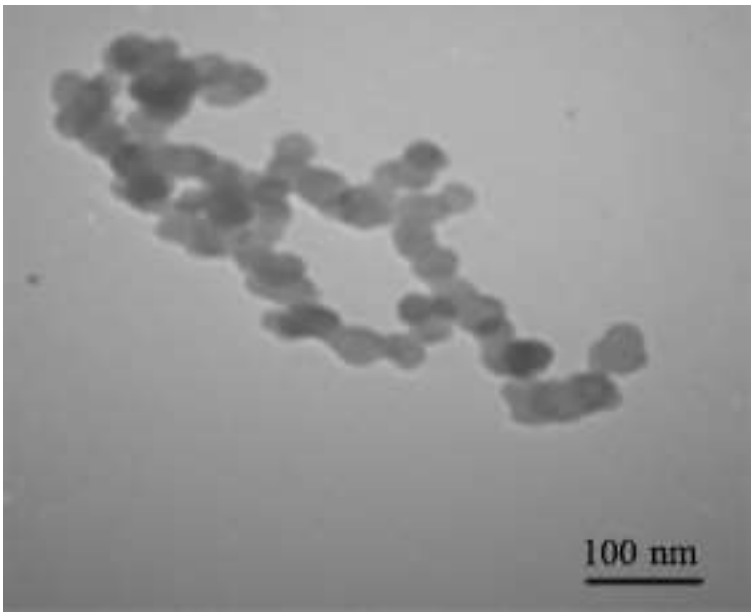
۱-۳ شناسایی نانوذرات و نانوکامپوزیت تولیدی

شکل ۱ الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) نانوذرات نقره تولید شده را نشان می‌دهد. تمامی پیک‌ها در شکل ۱ با فاز مکعبی Ag (JCPDS = 87-0597 و پارامتر شبکه a = 4.0862) مطابق هستند. با استفاده از رابطه‌ی شرر میانگین اندازه دانه‌ی بلوری نقره حدود ۲۳ نانومتر به دست آمد.

شکل ۲ به تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانوذرات نقره ساخته شده مربوط می‌شود. با توجه به این تصویر نانوذرات حاصل تقریباً کروی شکل هستند و اندازه‌ای حدود ۲۰ نانومتر دارند. با توجه به این نتایج، عصاره‌ی گیاه نارنگی کاهنده‌ی مناسبی برای کاهش Ag^+ به Ag می‌باشد. علاوه براین، می‌تواند نقش عامل پوشاننده هم ایفا کند و در نتیجه برای تولید نانوذرات با استفاده ازآن نیازی به سورفکتانت نیست.

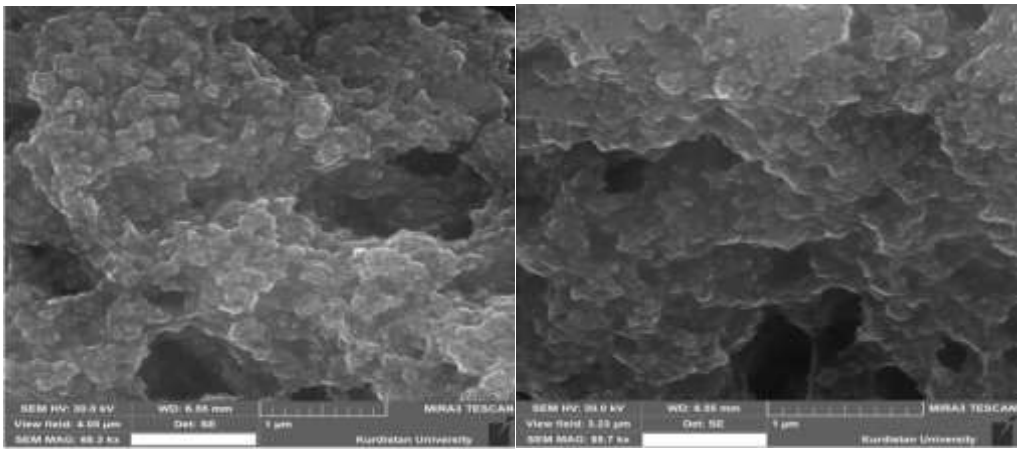


شکل ۱- الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات نقره



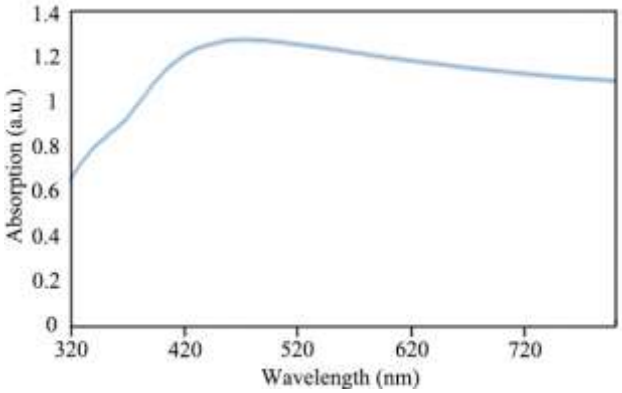
شکل ۲- تصویر TEM نانوذرات نقره تهیه شده

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نانوکامپوزیت نقره/اسپند در شکل ۳ نشان داده شده است. باتوجه به تصاویر نانوذرات نقره روی اسپند پخش شده‌اند.



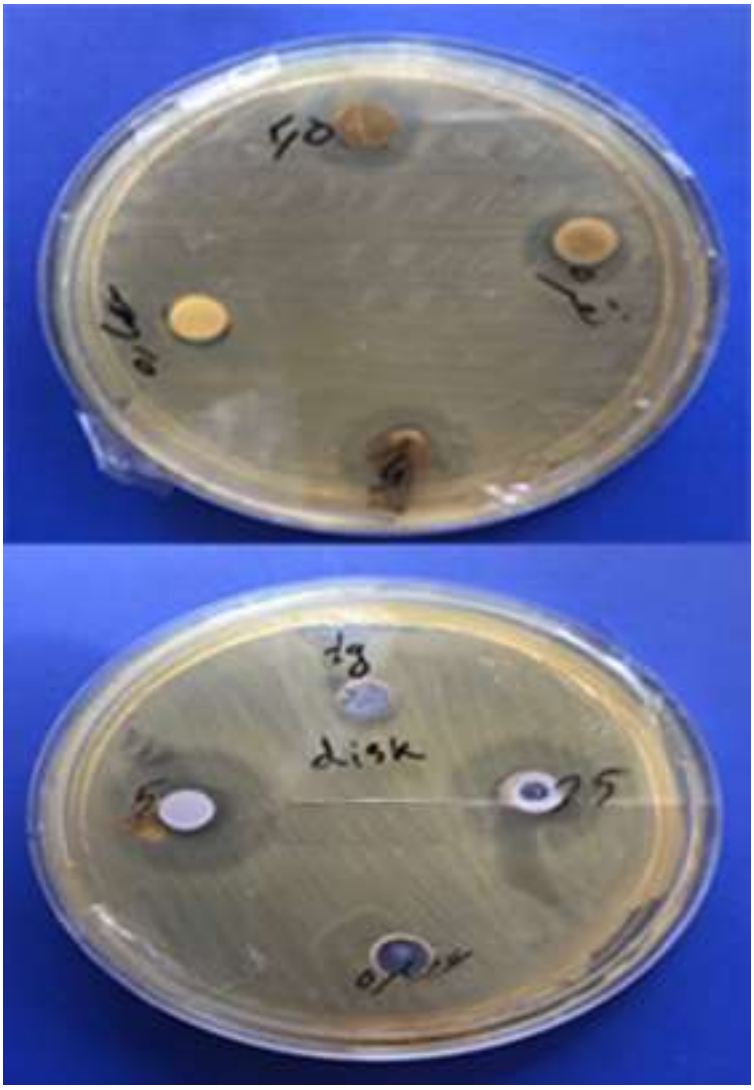
شکل ۳- تصاویر SEM کامپوزیت نانو ذرات نقره/عصاره اسپند

شکل ۴ طیف جذبی UV-Vis کامپوزیت نانوذرات نقره/عصاره اسپند را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه نانوذرات نقره با اندازه حدود ۲۰ نانومتر بیشترین جذب را در طول موج ۴۲۰ نانومتر دارند این طیف حضور نانوذرات نقره در کامپوزیت را نشان می‌دهد. همچنین، وجود عصاره اسپند باعث جذب در ناحیه مرئی و درنتیجه پهن شدن پیک شده است.



شکل ۴- طیف UV-Vis کامپوزیت نانوذرات نقره/عصاره اسپند

طبق نتایج حاصل از شکل ۵ که به مشاهده‌ی تشکیل هاله در دیسک ها مربوط می‌شود عصاره اسپند و نانوذرات نقره تولید شده، هر کدام به تنهایی، دارای اثر آنتی باکتریال می‌باشند؛ اما نکته جالب توجه در این تحقیق اثر آنتاگونیستی عصاره اسپند و نانوذرات نقره می‌باشد که باعث تاثیر چند برابری اثر آنتی باکتریالی شده است. همان‌طور که در پلیت‌ها مشاهده می‌شود قطر هاله‌ی تشکیل شده برای کامپوزیت نانوذرات نقره/عصاره بیشتر از هرکدام از این مواد به صورت جداگانه می‌باشد. نتایج در جدول ۱ ارائه شده‌اند.



شکل ۵- تست خاصیت آنتی باکتریال نمونه‌های ساخته شده

جدول ۱. مقایسه‌ی قدرت آنتی‌باکتریال نمونه‌های ساخته شده

	نانو ذرات نقره	عصاره اسپند	کامپوزیت نانوذرات نقره/عصاره اسپند با غلظت ۵ درصد نانوذرات نقره	کامپوزیت نانوذرات نقره/عصاره اسپند با غلظت ۲/۵ درصد نانو ذرات نقره
روش دیسک گذاری	۰±۱۳/۱ میلی‌متر	۰±۱۱/۲ میلی‌متر	۰±۱۸/۱ میلی‌متر	۰±۲۲/۱ میلی‌متر
روش چاهک	۰±۱۱/۱ میلی‌متر	۰±۱۳/۲میلی‌متر	۰±۲۵/۱ میلی‌متر	۰±۲۹/۱ میلی‌متر

۴- نتیجه گیری

در این مقاله، افزایش خاصیت آنتی باکتریال گیاه اسپند به کمک نانوذرات نقره دنبال شد. برای این هدف، ابتدا نانوذرات نقره با یک روش سبز و جدید با استفاده از عصاره پوست نارنگی به عنوان عامل کاهنده و پوشاننده تولید شد. سپس، نانوذرات

تولیدی برای تولید کامپوزیت عصاره اسپند/نانوذرات نقره به کار برده شدند. در پایان، خاصیت آنتی باکتریال کامپوزیت حاصل علیه باکتری اشریشیاکلای بررسی شد. نتایج حاصل، افزایش خاصیت ضدعفونی کننده گیاه اسپند را با اضافه شدن نانوذرات نقره نشان دادند.

۵- تقدیر و تشکر

نویسنده از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه سمنان صمیمانه تشکر می‌نماید.

۶- مراجع

[1] R. V. Akbar, M. Hossein, M. Aliakbar, T. K. Asghar, *J. Of Applied Chemistry*, **47** (1397) 223, in Persian.

[2] M. Hashem, Antifungal Properties of Crude Extracts of Five Egyptian Medicinal Plants Against Dermatophytes and Emerging Fungi, *Mycopathologia*, **172** (2011) 37.

[3] M. Mazandarani, S. Yassaghi, M.B. Rezaei and E.A. Ghaemi, Ethnobotany and antibacterial activity from essential oil of two endemic Hypericum species in North of Iran, *Asian Journal of Plant Sciences*, **6**(2), (2007) 354.

[4] A.F.M. Abdel-Fattah, K. Matsumoto and Y. Murakami, Central Serotonin Level-Dependent Changes in Body Temperature Following Administration of Tryptophan to Pargyline and Harmaline-Pretreated Rats, *Gene Pharmacology*, **28** (1997) 405.

[5] M. Chandrasekaran and V. Venkatesalu, Antibacterial and antifungal activity of Syzygium jambolanum seeds, *Journal of Ethnopharmacology*, **91** (2004) 105.

[6] G. Nenaah, Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of Peganum harmala (L) seeds and their combination effects, *Fitoterapia*, **81** (2010) 779.

[7] M.C.S. Oussalah and L.M.L. Saucier, 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*, **18** (2007) 414.

[8] D. Prashanth and S. John, Antibacterial activity of Peganum harmala, *Fitoterapia*, **70** (1999) 438.

[9] J.L. Rios, M.C. Recio and A. Ilar, Screening methods for natural product with antimicrobial activity: A review of the literature, *J. Ethnopharmacology*, **23** (1988) 127.

[10] E. Darabpour, A. Poshtkouhian Bavi, H. Motamedi and S.M. Seyyed Nejad, Antibacterial Activity of Different Parts of Peganum Harmala L. Growing In Iran Against Multi-Drug Resistant Bacteria, *EXCLI Journal*, **10** (2011) 252.

[11] H. De Valk, C. Jacquet, V. Goulet, V. Vaillant, A. Perra, F. Simon and et al. Surveillance of Listeria infections in Europe, *Eurosurveillance*, **10** (2005) 251.

[12] F.O. Ekhaise, A.E. Soroh, A. Falodun, Antibacterial properties and preliminary phytochemical Analysis of methanolic extract of ocimum gratissium (scent Leaves), *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, **3**(2) (2010) 81.

[13] F. Bibi Sedigheh, M. Ali Mohammad, S. N. Zahra, *Medicinal Herbs Blog*, Antimicrobial Effects of Smoke and Alkaloids on Spand, (1376).

[14] M. Mousavi-Kamazani, Z. Zarghami and M. Salavati-Niasari, Facile and Novel Chemical Synthesis, Characterization, and Formation Mechanism of Copper Sulfide (Cu_2S, Cu_2S/CuS, CuS) Nanostructures for Increasing the Efficiency of Solar Cells, *The Journal of Physical Chemistry C*, **120** (4), (2016) 2096.

[15] M. Mousavi-Kamazani, M. Salavati-Niasari and S.M. Hosseinpour-Mashkani, Synthesis and characterization of $CuInS_2$ quantum dot in the presence of novel precursors and its application in dyes solar cells, *Materials Letters*, **145**, (2015) 99.

[16] S. El-Rifaie and Peganum Harmala: Its Use in Certain Dermatoses, Inational j. dermatology, **19** (1980) 221.

[17] S.L. Foley, A.M. Lynne, Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance, J. Animal Sci. **86** (2008) 173.

[18] Food and Drug administration (FDA), Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook (2001).

[19] G. Frison, D. Favretto, F. Zancanaro, G. Fazzin, S.D. Ferrara, A case of b-carboline alkaloid intoxication following ingestion of peganum harmala seed extract, *Forensic Science International*, **179** (2008) 37.