نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵، ص. ۲۷۹-۲۷۰
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 30, No. 2, Summer 2016, P. 270-279
ISSN: 2008 - 4730

اثرات ضد باکتریایی ترکیبی اسانس کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaffarian) و کلپوره (*Teucrium polium* L.) با نانوذرات سنتزی نقره علیه باکتری‌های غذا زاد

مجید عزیزی[1*] - منصور مشرقی[2] - فاطمه عروجعلیان[3]- ناصر شاه طهماسبی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۰۸

چکیده

به منظور بررسی برهم‌کنش نانوذرات نقره با اسانس‌های گیاهان دارویی کرفس‌کوهی و کلپوره از نظر اثرات ضدباکتریایی، آزمایشی براساس محاسبه حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) ترکیبی و تعیین شاخص FIC یا غلظت بازدارنده افتراقی و با روش ساده شده checkboard طراحی و به اجرا درآمد. اسانس گیاهان مورد بررسی به روش تقطیر با آب استخراج گردید. در این تحقیق باکتری‌های آلوده کننده مواد غذایی رایج مانند *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli* O157:H7 و *Salmonella enterica* و *Pseudomonas aureogenosa* مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان داد که خاصیت ضدباکتریایی اسانس کلپوره قویتر(MIC بین ۰/۱۶ تا ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از اسانس کرفس‌کوهی (MIC بین ۰/۳ تا ۲/۵ میلی‌گرم در میلی لیتر) بود. خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره نیز (MIC بین ۰/۰۰۶ تا ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بسیار قابل توجه بود. محاسبه غلظت بازدارنده افتراقی (شاخص FIC) حاکی از وجود اثرات هم افزایی بین نانوذرات نقره و اسانس هر دو گیاه بود که بستگی به نوع پاتوژن مورد بررسی داشت. در نتیجه‌ی کاربرد توام نانوذرات نقره و اسانس این دو گیاه بویژه اسانس کلپوره با غلظت کمتر اسانس خاصیت بازدارندگی قابل توجهی بدست آمد. در هیچکدام از تیمارها برهم‌کنش آنتاگونیستی بین نانوذرات نقره و اسانس این دو گیاه مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: برهمکنش، سینرژیست، گیاهان دارویی، نانوذرات نقره

مقدمه

استفاده نامناسب از آنتی‌بیوتیک‌ها و عدم رعایت غلظت توصیه شده منجر به گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها گردیده است (۱۲). این امر نیاز به کشف و استفاده از ترکیبات طبیعی دارای خاصیت ضد میکروبی را دو چندان نموده است. استفاده از گیاهان دارویی بومی هر منطقه در درمان بیماری‌ها و همچنین استفاده از آن‌ها در صنایع غذایی سابقه طولانی دارد. اثرات ضد میکروبی متابولیتهای ثانویه گیاهی مانند اسانس‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۲۷) و مشخص شده است که اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارای خواص حشره کشی، ضد قارچی، ضد انگل، ضد باکتری، ضد ویروس، آنتی اکسیدانت و سیتوتوکسیک می‌باشند (۱۱).

از این مواد هم برای جلوگیری از رشد باکتری‌های و کپک‌های آلوده کننده مواد غذایی به منظور افزایش عمر نگهداری غذاهای فرآیند شده در سیستم غذایی استفاده می‌شود) (۱ و ۹). نانو تکنولوژی امروزه در بسیاری از علوم جایگاه ویژه‌ای یافته و طی آن با کوچک نمودن اندازه ذرات در حد نانومتر خصوصیات متحصر به فردی بدست می‌آید. این علم در زمینه‌های مختلف از پزشکی و داروسازی گرفته تا فیزیک، شیمی و کشاورزی و بیولوژی روز به روز کاربردهای جدیدی پیدا می‌کند (۴ و ۵). در این میان استفاده از نانوذرات نقره کاربردهای وسیعتری پیدا کرده است(۳،۵،۱۳). از جمله این کاربردها اثرات ضد باکتریایی است و بر اساس نتایج بدست آمده (۱۷ و ۲۱) نانوذرات نقره نیز اثرات ضد باکتریایی داشته و کاربرد آن‌ها اخیرا مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (۲۴).

کرفس‌کوهی *Kelussia odoratissima* Mozaffarian از تیره چتریان بوده و در زبان فارسی "کلوس" نامیده می‌شود. این گیا ه چند ساله و بسیار معطر است. این گیاه در ارتفاعات و مناطق برف گیر ناحیه زاگرس مرکزی و با حداقل ارتفاع ۲۵۰۰ متر از سطح دریا و بارش سالیانه حدود ۴۰۰ میلی‌مترکه اغلب به صورت برف است،

۱- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*-نویسنده مسئول: (Email: azizi@um.ac.ir
۲- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- دکتری نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه تهران
۴- دانشیار گروه فیزیک، دانشگاه فردوسی مشهد

رویش می‌یابد .ازعمده ترین رویشگاه‌های طبیعی این گیاه می‌توان به ارتفاعات کوه‌های سه منطقه کوهرنگ، بازفت و دوآب صمصامی در استان چهار محال و بختیاری اشاره کرد (۱۸).

کلپوره (*Teucrium polium* L.) گیاهی معطر از خانواده نعنائیان است که در مناطق فقیر از نظر مواد غذایی و مواد آلی، سواحل سنگلاخی و ماسه زار نواحی مختلف اروپا، مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا از جمله ایران می روید. این گونه دارویی به صورت وحشی در بعضی مناطق ایران از جمله خراسان نیز مشاهده می‌شود (۱۸).

اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهان مختلف علیه بسیاری از باکتریها و مورد بررسی قرار گرفته و نقش موثر آن‌ها در کنترل آن‌ها اثبات شده است (۱ و ۹). عروجعلیان و همکاران (۱۹) اثرات ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه و زیره سبز را علیه باکتری‌های مشابه بکار بردند و نشان دادند که اسانس گیاهان خانواده کرفس اثرات ضد باکتریایی متوسط تا قوی دارد. آن‌ها اثرات سینرژیستی را بین این دو اسانس اثبات کردند. اثرات ضد باکتریایی به روش‌های متفاوتی مورد بررسی قرار می‌گیرند که یکی از دقیق‌ترین آن‌ها روش میکرودایلوشن است. با توجه به تاثیر اسانس‌ها بر خواص ارگانولپتیکی مواد غذایی، تعیین دقیق MIC آن‌ها با استفاده از تکنیک میکرودایلوشن و نیز بررسی برهمکنش آن‌ها با نانوذرات نقره به منظور به حداقل رساندن میزان مصرف این مواد در صنایع غذایی و همچنین غلبه بر مقاومت باکتریایی مورد توجه می باشد. محققان مختلف بر وجود خاصیت سینرژیستی بین اسانس گیاهان مختلف تاکید نموده‌اند و این خاصیت را اساس استفاده از گیاهان دارویی بصورت مخلوط در طب سنتی می‌دانند (۱۹ و ۳۱). همچنین اخیرا استفاده از اسانس گیاهان دارویی در ترکیب با خصوصیات منحصر بفرد این نانوذرات برای کنترل میکروب‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان یک روش جدید و نو اثبات شده است(۲۵ و ۲۶). در این تحقیق اثرات ضد باکتریایی اسانس دو گیاه دارویی فوق به همراه نانوذرات نقره علیه برخی باکتری‌های آلوده کننده مواد غذایی رایج مانند *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli* O157H7 و *Salmonella enterica* و *P. aureogenosa* مورد بررسی قرار گرفت. هدف از انجام این تحقیق تلفیق خصوصیات منحصر بفرد نانوذرات نقره و خصوصیات ضدمیکروبی اسانس کرفس‌کوهی و کلپوره به منظور دستیابی به یک نانوبیوسیستم است که قادر باشد با کمترین میزان اسانس‌های گیاهی بالاترین خاصیت ضدباکتریایی را ایجاد کند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

پیکر رویشی کرفس‌کوهی از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان و پیکر رویشی کلپوره از دانشکده کشاورزی مشهد تهیه و هر دو نمونه در پژوهشکده علوم گیاهی بررسی به ثبت رسیده و تایید شدند. اسانس گیری به روش تقطیر با آب[1] ، توسط دستگاه کلونجر[2] با استفاده از ۲۵ گرم از نمونه های خرد شده از دو گیاه، بمدت ۳ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه انجام گرفت. اسانس بدست آمده با سولفات سدیم خشک آبگیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه تا زمان مصرف نگهداری گردیدند.

تهیه نانوذرات نقره

نانوذرات نقره از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه گردید. این نانوذرات به روش سبز[3] و با استفاده از عصاره آبی گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) به نسبت یک به ۱۰ تهیه شده بودند و با دستگاه Particle analyser اندازه ذرات آن‌ها بین ۹۰-۱۰۰ نانومتر تعیین شده بود.

سویه‌های باکتری‌های مورد آزمایش

در این تحقیق با توجه به عوامل مهم مسمومیت‌زای مواد غذایی از هر دو گروه باکتری گرم مثبت و گرم منفی استفاده گردید. از باکتری‌های گرم مثبت شامل *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)، *Bacillus cereus* (ATCC 11778) و *Listeria monocytogenes* (ATCC 19112) و از باکتری‌های گرم منفی *E. coli O157:H7* (ATTC 700728) و *Salmonella enterica* (ATCC 49416) و *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) انتخاب شدند و از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند. باکتری‌های مورد نظر از استوک گلیسیرول ۱۵ درصد در دمای ۸۵- درجه سانتی‌گراد خارج و در محیط مایع تریپتیکاز سویا (Merck, Darmstadt, Germany)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد احیا شدند. پس از آن باکتری‌ها در محیط تریپتیکاز سویا آگار (Merck, Darmstadt, Germany) برای اثبات خلوص کلنی‌ها کشت شدند.

1- Hydrodistilation
2- Clevenger
۳ - Green synthesis

تعیین خاصیت ضد باکتریایی

سنجش میزان حداقل غلظت بازدارندگی[۱] (MIC) با استفاده از متد میکرودایلوشن[۲]

مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بر اساس مقالات منتشر شده (کالمبا و همکاران، ۹؛ تپ و همکاران، ۲۷) تعیین گردید. برای این منظور از سویه های باکتریایی پاتوژن یاد شده یک کشت ۲۴-۲۲ ساعته(کشت شبانه) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محیط مولر هینتون براث (MHB, Oxoid) تهیه شد. محلول‌های استوک از اسانس‌ها و مواد استاندارد ضد میکروب (آنتی بیوتیک کلرامفنیکل) در DMSO[۳] تهیه شدند.

محلول‌های رقیق‌تر با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث از ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تا ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شدند و ۷۰ میکرو لیتر از آن‌ها به میکروتیترپلیت‌های ۹۶ خانه‌ایی که قبلاً حاوی ۷۰ میکرو لیتر محیط کشت MHB بودند اضافه گردید. سپس ۷۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند که حاوی[۸] ۱۰ باکتری در هر میلی‌لیتر[۴] بود، به میکروتیترپلیت‌ها اضافه گردید. در مجموع این آزمایش با حجم ۲۱۰ میکرولیتر در هر چاهک انجام شد. آزمایشات مشابه برای کنترل مثبت (شامل MHB ، DMSO و باکتری تحت تیمار) و کنترل استریلیتی یا کنترل منفی (شامل MHB، DMSO و اسانس مورد آزمایش) بود. نمونه‌ها به مدت ۲۴-۲۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه نگهداری شدند. اولین چاهک بدون کدورت به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) ، به صورت mg/ml گزارش شد. تمام آزمایشات حداقل برای سه با تکرار گردید و میانگین داده‌های بدست آمده، به عنوان نتایج MIC و MBC ارائه گردید (جداول ۱تا ۳). در این پژوهش از کلرامفنیکل به عنوان ترکیب استاندارد جهت مقایسه نیز استفاده گردید.

سنجش میزان حداقل غلظت کشندگی[۵] (MBC)

حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس‌ها با توجه به نتایج MIC تعیین شد. میزان ۵ میکرولیتر از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آن‌ها کاملاً متوقف شده بود، به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد و به مدت ۲۴-۲۲ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه نگهداری شدند. غلظت‌هایی که فاقد رشد باکتری بودند، به عنوان مقادیر MBC گزارش شدند (۴).

سنجش غلظت بازدارنده افتراقی[۶] (FIC) به منظور تعیین برهمکنش اسانس و نانوذرات نقره

با توجه به هدف از تحقیق، فعالیت ضد باکتریایی مخلوط اسانس هر یک از گیاهان مورد نظر بصورت ترکیب با نانوذرات نقره نیز مورد ارزیابی قرارگرفت. عکس‌العمل متقابل این دو با استفاده از فرمول (۱) و براساس محاسبه شاخص FIC یا غلظت بازدارنده افتراقی و با روش ساده شده checkboard انجام گرفت (۱۹ و ۲۰). این روش یکی از متداول‌ترین تکنیک‌های کاربردی در تعیین برهم‌کنش دو ماده ضد میکروب در شرایط In vitro می‌باشد چرا که اصول آزمایش کاملاً قابل درک و محاسبات ریاضی و تفسیر نتایج آن ساده می‌باشد.

برای تعیین بر هم کنش دو اسانس یاد شده (FIC) از فرمول زیر استفاده شد.

$$\text{SumFIC}_{BC}=\frac{\text{MIC}_B \text{ in combination}}{\text{MIC}_B \text{ alone}}+\frac{\text{MIC}_C \text{ in combination}}{\text{MIC}_C \text{ alone}} \quad (۱)$$

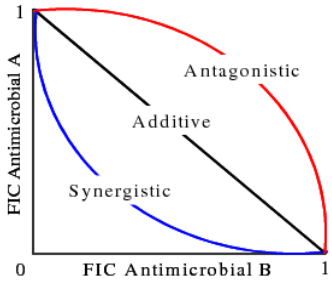
Sum FIC_{BC}: مجموع غلظت بازدارندگی افتراقی اسانس و نانوذرات نقره

B: اسانس؛ C : نانوذرات نقره

MIC_B: حداقل غلظت بازدارندگی اسانس

MIC_C: حداقل غلظت بازدارندگی نانوذرات نقره

FIC_{Index} برای اسانس ها و نانوذرات نقره محاسبه شدند. مقادیر کوچک‌تر از ۰/۹ نشان دهنده اثرات سینرژیستی، مقادیر مابین ۰/۹ تا ۱/۱ موید اثرات افزایشی[۷] و مقادیر بیشتر از ۱/۱ حاکی از وجود اثرات آنتاگونیستی در نظر گرفته می‌شود (۱۹ و ۲۲). همچنین با رسم ایزوبولوگرام مربوط به FIC آزمایشات میتوان بر اساس مدل زیر نوع برهمکنش را تعیین نمود.



شکل -۱ ایزوبولوگرام شماتیک تعیین نوع روابط برهمکنشی بین دو فاکتور A و B

Fig 1 Schematic isobologram of interaction between two

---

۱ -Minimum inhibitory concentration

۲- Microdilution assay

۳- Dimethyle sulfoxide

۴ -108 colony forming units (cfu/ml) (according to MC Farland turbidity standards)

۵ - Minimum bactericidal concentration

۶ - Fractional inhibitory concentration

۵- در برهمکنش افزایشی اثرات بازدارندگی کل برابر مجموع اثرات بازدارندگی هر کدام از عوامل است و درواقع اثرهر کدام از عوامل با یکدیگر جمع می‌شوند در حالی‌که در برهمکنش سینرژیستی اثر بازدارندگی کل بیشتر از مجموع اثرات بازدارندگی هرکدام از عوامل خواهد بود.

factors A and B

نتایج و بحث

خواص ضد باکتریایی اسانس کرفس‌کوهی

نتایج حاصل از بررسی MIC و MBC (بر حسب mg/ml) اسانس کرفس‌کوهی علیه باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است. همانگونه که از این جدول بر می آید MIC اسانس کرفس‌کوهی علیه باکتری‌های گرم مثبت شامل *S. aureus*، *B. cereus* و *L. monocytogenes* مابین ۰/۳۱ تا ۱/۲۵ متغیر است. از میان این باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* حساسیت بیشتر و *B. cereus* حساسیت کمتری نشان داد. میزان MBC اسانس کرفس‌کوهی علیه *B. cereus* و *L. monocytogenes* با میزان MIC برابر بود در حالی‌که میزان MBC اسانس کرفس‌کوهی علیه*B. cereus* برابر ۰/۶۲ بدست آمد.

بررسی MIC اسانس کرفس‌کوهی علیه باکتری‌های گرم منفی مورد بررسی شامل *E. coli* O157H7، *S. enterica* و *P. aeruginosa* نشان داد که مقادیر آن بین ۰/۶۲ تا ۲/۵ متغیر است. همان‌گونه که از این جدول مشخص است از میان باکتریهای گرم منفی *S. enterica* حساسیت کمتر داشت و *P. aeruginosa* حساست بیشتری نشان داد. این نتایج همچنین نشان دادند که در باکتری‌های گرم منفی MIC اسانس کرفس‌کوهی با MBC آن برابر است. در مجموع بر اساس این یافته‌ها MIC اسانس کرفس‌کوهی علیه باکتری‌های گرم مثبت کوچک‌تر از باکتری‌های گرم منفی بدست آمد (جدول ۱).

جدول ۱- فعالیت ضد باکتریایی (MIC و MBC) اسانس کرفس‌کوهی و کلپوره به روش میکرودایلوشن

Table 1- Antibacterial activity (MIC & MBC) of *K. odoratissima* Mozaff. and *T. polium* L. essential oils by microdilution Method

پاتوژن Pathogens	واکنش گرم G	نژاد ATCC	کرفس‌کوهی *K. odoratissima*		کلپوره *T. polium*	
			MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
S. aureus	+	ATCC 25923	0.31	0.62	0.16	0.31
B. cereus	+	ATCC 11778	1.25	1.25	0.62	0.62
L. monocytogenes	+	ATCC 19112	0.62	0.62	0.31	0.62
E. coli O157:H7	-	ATCC 700728	1.25	1.25	0.62	0.62
S. enterica	-	ATCC 49416	2.5	2.5	1.25	1.25
P. aeruginosa	-	ATCC 15442	0.62	0.62	0.31	0.62

MIC= حداقل غلظت بازدارندگی، MBC= حداقل غلظت کشندگی

خواص ضد باکتریایی اسانس کلپوره

مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی اسانس کلپوره علیه باکتری‌های گرم مثبت مابین ۰/۱۶ تا ۰/۶۲ متغیر بود (جدول ۱). مشابه نتایج حاصل از اسانس کرفس‌کوهی حساس‌ترین باکتری به اسانس کلپوره *S. aureus* بود. میزان MBC اسانس کلپوره نیز در جدول ۱ آورده شده است. به استثناء *B. cereus* که در آن MIC با MBC برابر بود در *S. aureus* و *L. monocytogenes* میزان MBC دو برابر MIC بدست آمد.

بررسی MIC اسانس کلپوره علیه باکتری‌های گرم منفی نشان داد که مقادیر آن بین ۰/۳۱ تا ۱/۲۵ متغیر است. در این بین MIC مربوط به *P. aeruginosa* برابر ۰/۳۱ بدست آمد در حالی‌که MIC اسانس کلپوره علیه *E. coli O157:H7* برابر ۰/۶۲ و MIC مربوط به *S. enterica* برابر ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. در مورد اسانس کلپوره نیز باکتری‌های گرم منفی MIC بالاتری داشتند. بررسی MBC اسانس کلپوره نشان داد که MBC مربوط به *P. aeruginosa* دو برابر MIC آن بدست آمد در حالی‌که MBC اسانس کلپوره علیه بقیه باکتری‌های گرم منفی برابر MIC آن‌ها بود.

مقایسه نتایج اثرات بازدارندگی اسانس کرفس‌کوهی و کلپوره نشان میدهد که در مجموع اسانس کلپوره خاصیت ضد باکتریایی قوی تری نسبت به اسانس کرفس‌کوهی دارد و در هر دو باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساس‌تر بودند. بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس گیاهان دیگر از خانواده نعنا مانند آویشن باغی، مرزه، نعنا فلفلی، حاکی از قوی تر بودن اثرات آن‌هاست (۱) در حالی‌که گاچکار و همکاران (۷) خواص ضد باکتریایی اسانس گیاهان خانواده کرفس را متوسط تا قوی گزارش دادند. عوجلیان و همکاران (۱۹) نیز خواص ضد باکتریایی زیره سیاه و زیره سبز را بررسی و نشان دادن که بین این دو اسانس خاصیت سینرژیستی وجود دارد.

خواص ضد باکتریایی نانوذرات نقره

نتایج حاصل از بررسی اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتزی

در این پژوهش حاکی از خاصیت ضد باکتریایی قوی این نانوذرات میباشد(جدول ۲). حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نانوذرات نقره علیه باکتریهای گرم مثبت بین ۰/۰۱۲ تا ۰/۰۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد که نسبت به اسانس‌ها بسیار کمتر است. نتایج این تحقیق با نتایج وی و همکاران (۳۰) مطابقت دارد آن‌ها نیز در تحقیقات خود MIC نانوذرات نقره علیه باکتری *S. aureus* را برابر ۰/۰۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آوردند. حداقل غلظت بازدارندگی نانوذرات نقره علیه باکتری‌های گرم منفی بین ۰/۰۰۶ تا ۰/۰۱۲ بود. در تمام باکتری‌های مورد بررسی MBC دو برابر MIC بدست آمده بود. لخاگواجاو و همکاران (۱۳) اثرات ضد باکتریایی محلول کلوئیدی نانوذرات نقره را بررسی نمودند آن‌ها MIC محلول کلوئیدی نقره علیه باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* را بترتیب ۰/۰۰۴ و ۰/۰۰۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آوردند. شاید علت این اختلاف تفاوت در ATCC باکتری‌های مورد بررسی باشد. از طرف دیگر Rai و همکاران (۲۱) و مارتینز-کاستانون و همکاران(۱۶) نشان دادند که خاصیت ضدباکتریایی نانوذرات وابستگی زیادی به اندزه و شکل ذره دارد. اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است (۱۴ و ۱۷).

اگرچه مکانیسم دقیق اثرات بازدارندگی نانوذرات نقره بر باکتری‌ها هنوز بطور دقیق مشخص نگردیده است ولی مکانیسم‌های احتمالی آن توسط برخی از محققین ارائه شده است (۱۴). در مجموع اعتقاد بر این است که نانوذرات نقره به دیواره سلولی باکتری‌ها متصل شده و منجر به دناتوره شدن پروتئین‌ها و در نهایت مرگ سلولی خواهد شد. نانوذرات نقره همچنین با اکسیژن واکنش داده و با تاثیر بر گروه‌های تیول (S-H) موجود در دیواره سلول باکتری تشکیل R-S-S-R را داده که منجر به توقف تنفس و مرگ سلولی می‌گردد (۱۰).

جدول ۲- فعالیت ضدباکتریایی (MIC و MBC) نانوذرات نقره به روش میکرودایلوشن

Table 2- Antibacterial activity (MIC & MBC) of silver nanoparticles by microdilution method

پاتوژن Pathogens	واکنش گرم G	نژاد ATCC	نانو ذرات نقره Ag nanoparticle	
			MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
S. aureus	+	ATCC 25923	0.025	0.050
B. cereus	+	ATCC 11778	0.025	0.050
L. monocytogenes	+	ATCC 19112	0.012	0.025
E. coli O157:H7	-	ATCC 700728	0.006	0.012
S. enterica	-	ATCC 49416	0.012	0.025
P. aeruginosa	-	ATCC 15442	0.006	0.012

MIC= حداقل غلظت بازدارندگی، MBC= حداقل غلظت کشندگی

نتایج حاصل از برهمکنش اسانس کرفس‌کوهی و نانوذرات نقره

نتایج کاربرد توأم اسانس کرفس‌کوهی و نانوذرات نقره در شکل ۲ آمده است. در این شکل MIC اسانس کرفس‌کوهی به تنهایی در ستون‌های سمت چپ مربوط به هر پاتوژن و MIC مربوط به کاربرد توأم این اسانس در ترکیب با نانوذرات نقره در ستون‌های وسط مربوط به هر پاتوژن آورده شده است. به منظور مقایسه MIC کلرامفنیکل در ستونهای سمت راست مربوط به هر پاتوژن نیز ارائه گردیده است. این نتایج نشان می‌دهند که استفاده ترکیبی اسانس کرفس‌کوهی و نانوذرات نقره علیه اغلب پاتوژن‌ها خاصیت ضد باکتریایی بیشتری نسبت به کاربرد انفرادی هر کدام به تنهایی دارد.

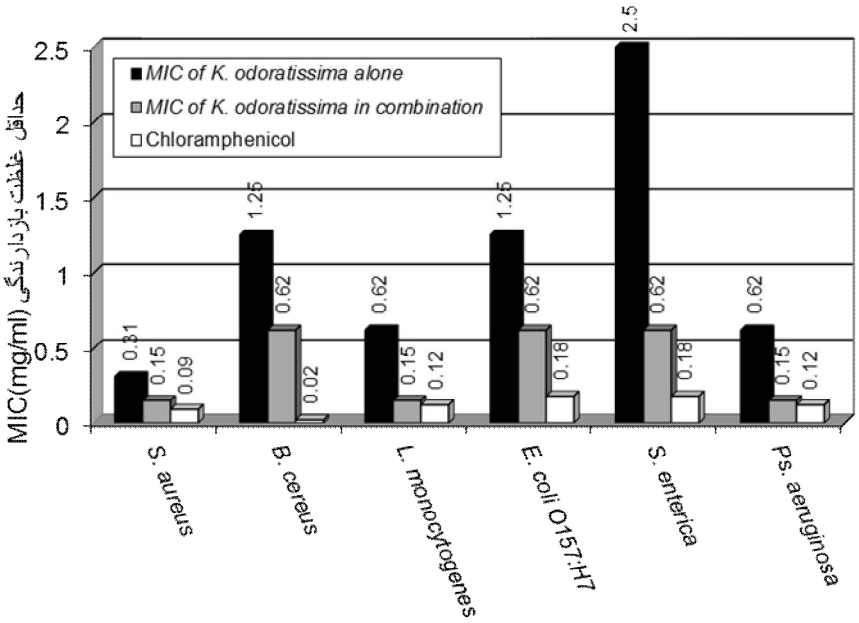
فیاض و همکاران(۴) نیز با بررسی برهمکنش نانوذرات نقره با برخی از آنتی بیوتیک‌ها نشان دادند که کاربرد توام نانوذرات نقره و آنتی بیوتیک‌هایی مانند آمپی سیلین خاصیت ضدباکتریایی قوی‌تری خواهد داشت. افزایش خاصیت بازدارندگی اسانس‌ها در اثر کاربرد توام نانوذرات نقره توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است. چیفریوک و همکاران (۲) به منظور جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و ایجاد مقاومت در قارچ *Candidda albicance* و *Candidda tropicalis* یک نانوبیوسیستم حاصل از تلفیق اسانس رزماری و نانوذرات نقره را بدست آورد که اثرات بازدارندگی بسیار قابل توجهی داشت. آن‌ها نیز بر کاربرد توام اسانس گیاهان دارویی و نانوذرات نقره تاکید نمودند.

نتایج حاصل از برهمکنش اسانس کلپوره و نانوذرات نقره

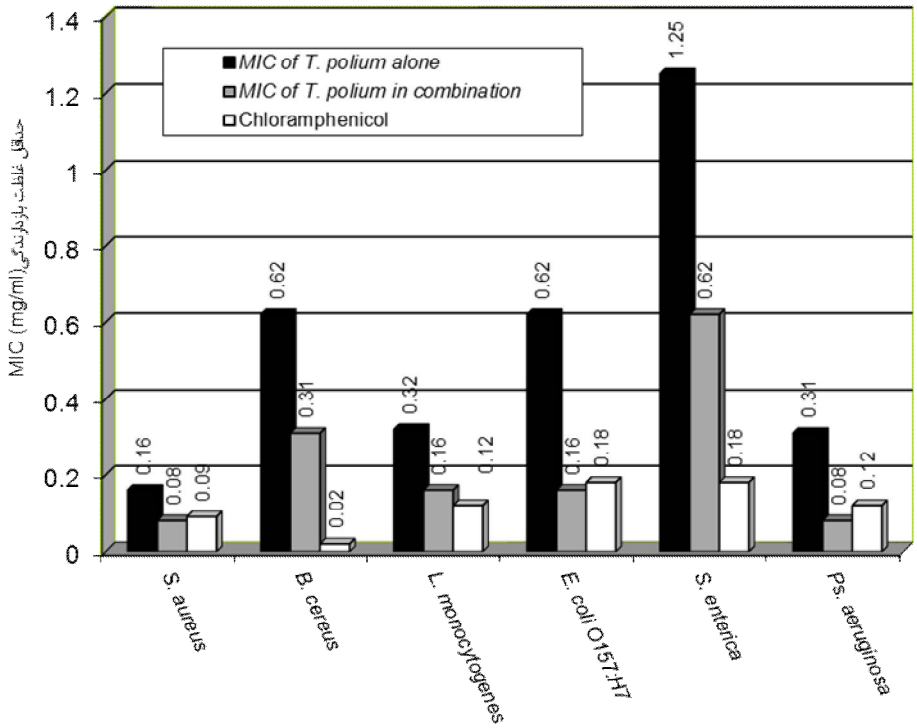
نتایج کاربرد توأم اسانس کلپوره و نانوذرات نقره در شکل ۳ آمده است این شکل مقایسه‌ی MIC اسانس کلپوره به تنهایی در ستون اول مربوط به هر پاتوژن و MIC مربوط به کاربرد توأم این اسانس در ترکیب با نانوذرات نقره را در ستون‌های دوم مربوط به هر پاتوژن را نشان میدهد. این نتایج مشابه نتایج حاصل از برهمکنش اسانس کرفس‌کوهی و نانوذرات نقره نشان میدهند که کاربرد توام اسانس کلپوره و نانوذرات نقره بطور چشمگیری MIC را کاهش میدهد. این

کاهش در باکتری *S. enterica* و *P. aeruginosa* و *E. coli* که همگی گرم منفی هستند شدید تر از باکتریهای گرم مثبت است.

به منظور تعیین نوع برهمکنش ضروری است شاخص FIC یا غلظت بازدارنده افتراقی را بر اساس فرمول ۱ محاسبه نمود.



شکل۲- مقایسه MIC اسانس کرفس کوهی به تنهایی و در ترکیب با نانو ذرات نقره بر باکتری‌های غذا زاد و مقایسه با کلرامفنیکل
Fig 2 MIC comparison of *K. odoratissima* essential oil alone and in combination with SNP on food-borne pathogens and chloramphenicol



شکل۳- مقایسه MIC اسانس کلپوره به تنهایی و در ترکیب با نانو ذرات نقره بر باکتری‌های غذا زاد و مقایسه با کلرامفنیکل

Fig 3 MIC comparison of *T. polium* essential oil alone and in combination with SNP on food-borne pathogens and chloramphenicol

نتایج FIC $_{Index}$ اسانس کرفس‌کوهی و نـانوذرات نقـره و تأثیر بر باکتری‌های غذا زاد

به منظور تعیین نوع برهمکنش ضروری است شـاخص FIC یـا غلظت بازدارنده افتراقی را بر اساس فرمول(۱) محاسبه نمود. در این تحقیـق مقـادیر غلظـت بازدارنـدگی افتراقـی (FIC $_I$) بـه روش Modified dilution checkboard (۱۹) تعیین شد و مقادیر FIC بدست آمده برای اسانس کرفس‌کوهی در جدول ۳ آورده شده اسـت. بررسـی FIC_I نشـان داد کـه در بـاکتری گـرم مثبـت *L. monocytogenes* و بـاکتری‌هـای گـرم منفـی *S. enterica* و *P. aeruginosa* بین اسانس کرفس‌کـوهی و نـانوذرات نقـره خاصـیت سینرژیستی (FIC $_I$ <0.9) وجود دارد. بررسی نمودارهای ایزوبولوگرام مربوط به اسانس کرفس‌کوهی و نانوذرات نقـره (شـکل ۴) نیـز ایـن حالت را تایید نمود. این در حالی بود که در باکتری های گرم مثبت *S. aureus* , *B. cereus* و باکتری گرم منفی *E. coli* بین اسانس کرفس‌کـوهی و نـانوذرات نقـره اثـر افزایشـی (9/0 >FIC_I< 1/1) مشاهده شد و نمودارهای ایزوبولوگرام (شکل ۴) نیز آنرا تایید نمود. در این آزمایش حالت آنتاگونیستی(FIC_I > 1/1) بین این دو مشـاهده نشد. نتایج نشان می‌دهد که در مـورد دو بـاکتری *S. aureus* و *P. aeruginosa* اثرات ترکیبی از تاثیر آنتی بیوتیـک کلرامفنیکـل نیـز بیشتر بودند.

جدول ۳- برهمکنش اسانسکرفس‌کوهی و نانوذرات نقره

Table 3 Interaction between *Kelussia odoratissima* essential oil with silver nanoparticle

پاتوژن Pathogens	واکنش گرم G	نژاد ATCC	MIC ترکیبی (mg/ml) MIC in combination		FICکرفس کوهی (mg/ml)	FICنانوذرات نقره (mg/ml)	شاخص FIC
			کرفس کوهی Ko	نانوذرات نقره SNP	FIC_{Ko}	FIC_{SNP}	FIC_i^*
S. aureus	+	ATCC 25923	0.15	0.012	0.48	0.48	0.96
B. cereus	+	ATCC 11778	0.62	0.012	0.50	0.50	1
L. monocytogenes	+	ATCC 19112	0.15	0.003	0.25	0.25	0.50
E. coli O157:H7	-	ATCC 700728	0.62	0.003	0.50	0.50	1
S. enterica	-	ATCC 49416	0.62	0.006	0.25	0.50	0.75
P. aeruginosa	-	ATCC 15442	0.15	0.003	0.24	0.50	0.74

Ko: *Kelussia odoratissima* , SNP: Silver Nanoparticles, FIC $_I$: FIC $_{Index}$

جدول ٤-برهمکنش اسانس کلپوره و نانوذرات نقره

Table 4 Interaction between *T. polium* essential oil with silver nanoparticles

پاتوژن Pathogens	واکنش گرم G	نژاد ATCC	MIC ترکیبی (mg/ml) MIC in combination		FICکلپوره (mg/ml)	FICنانوذرات نقره (mg/ml)	شاخص FIC
			کلپوره Tp	نانوذرات نقره SNP	FIC_{Tp}	FIC_{SNP}	FIC_i^*
S. aureus	+	ATCC 25923	0.08	0.012	0. 50	0.48	1
B. cereus	+	ATCC 11778	0.31	0.012	0. 50	0.48	1
L. monocytogenes	+	ATCC 19112	0.16	0.006	0.50	0.50	1
E. coli O157:H7	-	ATCC 700728	0.16	0.0015	0.25	0.25	0.50
S. enterica	-	ATCC 49416	0.62	0.003	0.50	0.25	0.75
P. aeruginosa	-	ATCC 15442	0.08	0.003	0.25	0.50	0.75

: FIC $_{Index}$ FIC $_I$: Silver Nanoparticles, SNP : Teucrium polium, Tp

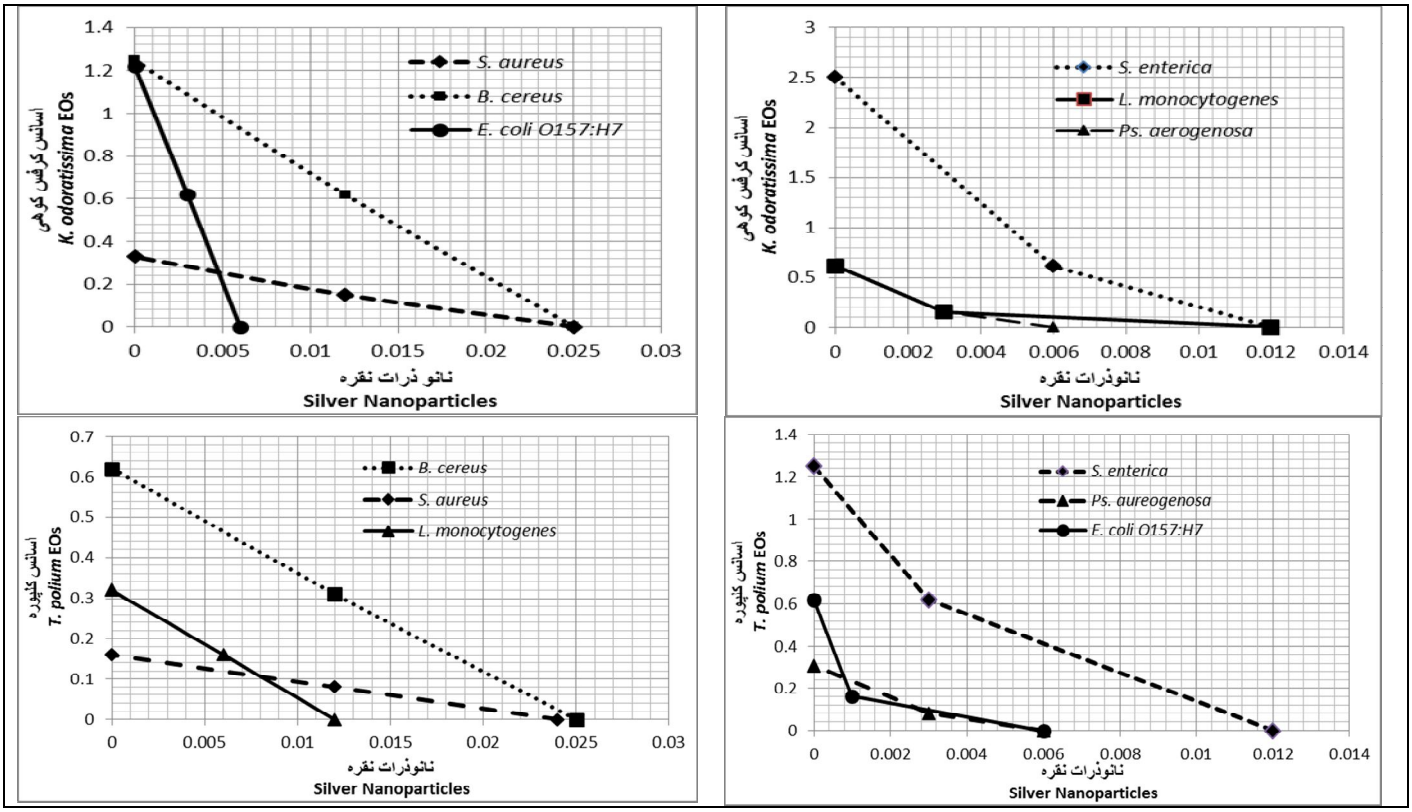
FIC_I^* کمتر از ۰/۹ نشان دهنده اثر سینرژیستی، FIC $_I$ مابین ۱/۱ تا ۰/۹ نشان دهنده اثر افزایشی و FIC $_I$ بیشتر از ۱/۱ نشان دهنده اثر آنتاگونیستی می باشد جذب نوری در طول موج ۶۳۰ nm خوانده شد.

FIC $_I$< 0.9 means Synergistic interaction,0.9 <FIC $_I$<1 means additive interaction and FIC $_I$>1.1 means antagonistic activity

Absorption was measured at 630nm

نتایج FIC Index اسانس کلپوره و نانوذرات نقره و تأثیر بر باکتری‌های غذا زاد

مقادیر FIC بدست آمده برای اسانس کلپوره در جدول شماره ۴ آورده شده است. بررسی FIC I نشان داد که در تمام باکتری گرم مثبت مورد بررسی در آزمایش برهمکنش بین اسانس کلپوره و نانوذرات نقره بصورت افزایشی (0/9 <FICI< 1/1) است در حالیکه در باکتری‌های گرم منفی این برهمکنش از نوع سینرژیستی است (FIC I <9/0). بررسی نمودارهای ایزوبولوگرام مربوط به اسانس کلپوره (شکل ۴) نیز این حالت را تایید نمود. در این آزمایش مشابه اسانس کرفس‌کوهی حالت آنتاگونیستی (FICI> 1/1) بین اسانس کلپوره و نانوذرات نقره مشاهده نشد.



شکل ٤- ایزوبولوگرام مربوط به اسانس کرفس‌کوهی (بالا) و اسانس کلپوره (پایین)
برهمکنش سینرژیستی(شکل سمت راست) برهمکنش افزایشی (شکل سمت چپ)

Fig 4- Isobologram of the *K. odoratissima* (Up) and *T. polium* (down) essential oils
Synergistic (Right) and additive (Left) interaction

بر اساس تحقیقات صورت گرفته باکتری‌های گرم مثبت نسبت به اسانس‌ها حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند (۲۳). بدلیل وجود غشاءهای خارجی احاطه کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی منطقی به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها در برابر اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها حساسیت کمتری از خود نشان دهند. این غشاء خارجی انتشار مواد هیدروفوب از میان این لایه پوشاننده لیپوپلی‌ساکاریدی را محدود می‌کند. در باکتری‌های گرم مثبت تماس مستقیم ترکیبات هیدروفوب اسانس‌ها با این فسفولیپید دو لایه‌ایی صورت می‌گیرد. این محل جایی است که این ترکیبات اثر خود را بر جای می‌گذارند. این اثر یا بصورت افزایش نفوذپذیری یون‌ها و یا نشت ترکیبات حیاتی سلولی رخ می‌دهد و یا اینکه بصورت ناتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می‌کند (۲۳). برخی از محققین ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزاء غالب موجود در اسانس‌ها را با فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها گزارش نموده‌اند.

فعالیت ضد باکتریایی بیشتر کلپوره نسبت به کرفس کوهی به دلیل زیاد بودن میزان تیمول و گاماترپاینن آن است (۶). خاصیت ضد باکتریایی اسانس این گیاه بخوبی گزارش شده است (۶). اگرچه بروز فعالیت ضد باکتریایی اغلب بسیار واضح است ولی مکانیزم عمل آن بطور کامل درک نشده است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهند اسانس‌ها اثرات ضد باکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می‌کنند. بررسیهای صورت گرفته در خصوص مکانیزم عمل اسانس‌ها اثبات نموده است که این ترکیبات نفوذپذیری غشاء را افزایش می‌دهند. اجزای اسانس با نفوذ در غشاء منجر به متورم شدن غشاء گردیده و فعالیت آنرا تحت تاثیر قرار می‌دهند (کاهش می‌دهند) و شرایط را برای نفوذ نانوذرات نقره فراهم نموده و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهند شد (۸). اجزای اسانس نیز اثرات ضد باکتریایی متفاوتی دارند، آلتر و همکاران (۲۸) اظهار نمودند که گروه هیدروکسیل موجود در ملکول اجزای اسانس مانند کارواکرول، تیمول، سایمن و منتول برای بروز خاصیت ضد باکتریایی آن‌ها بسیار مهم است. ونکر و شوکلا (۲۹) نیز اثرات سینرژیستی بین اسانس و نانوذرات نقره را گزارش نمودند (۲۶). آن‌ها با استفاده از عصاره برگ لیمو موفق به تولید نانو ذرات نقره شدند و با کاربرد آن‌ها بر روی دو قارچ *Fusarium oxysporum* و *Alternaria brassicicola* نشان دادند که مکانیسم تاثیر خواص ضد میکروبی آن‌ها تاثیر بر ساختار /DNA و همچنین اختلال در کار پروتئین هاست. عوجعلیان و همکاران (۱۹) اثرات سینرژیستی بین اسانس زیره سیاه و زیره سبز را گزارش نمودند و اظهار نمودند که مصرف توام چند گیاه دارویی که در نسخه های سنتی مشاهده میشود اثراتی به مراتب بیشتر از مصرف هر گیاه به تنهایی دارد (۱۸). محبوبی و همکاران (۱۵) در قارچهای *Candida albicans* و *Aspergillus niger* بین اسانس گیاه مورد (*Myrtus communis*) و آمفوتریسین B اثرات سینرژیستی مشاهده نمودند (۱۴). در مجموع می‌توان اظهار نمود که کاربرد توام اسانس‌های گیاهی و نانوذرات نقره روشی جدید است که می‌تواند با مصرف میزان اسانس کمتر، اثرات ضد باکتریایی قوی تری را بدست آورد که از نظر ایجاد مقاوت باکتریایی مطلوب‌تر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل اجرای طرح پژوهشی شماره ۱۴۹۶۹ است که با حمایت مالی معاون محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا گردید.

منابع

1-Burt S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.

2-Chifiriuc C., Grumezescu V., Grumezescu A.M., Saviuc C., Lazăr V., and Andronescu E. 2012. Hybrid magnetite nanoparticles/*Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. Nanoscale Research Letters, 7:209-216.

3-Cho K., Park J., Osaka T., and Park S., 2005. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient, Electrochim Acta, 51: 956–960.

4-Fayaz A. M., Balaji K., Girilal M., Yadav R., Kalaichelvan P. Th., and Venketesan R. 2010. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 6: 103–109.

5-Fondevila M. 2010. Potential Use of Silver Nanoparticles as an Additive in Animal Feeding, Silver Nanoparticles, David Pozo Perez (Ed.), ISBN: 978-953-307-028-5, InTech, Available from:http://www.intechopen.com/books/silver-nanoparticles/potential-use-of-silver-nanoparticles-as-an-additive-inanimal-feeding.

6-Friedman M., Henika P. R., and Mandrell R. E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenese, and Salmonella enterica. Journal of Food Protection, 65, 1545–1560.

7-Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M. R., Taghizadeh M., Alipoor Astaneh Sh., and Rasooli I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, *102*, 898-904.

8-Holly R. A., and Patel D. (2005). Improvement in shelf life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Chemistry, 22, 273–292.

9-Kalemba D., and Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, 10: 813–829.

10-Kim J. S., E. Kuk et al. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 3(1): 95-101.

11-Kordali S., Kotan R., Mavi A., Cakir A., Ala A., and Yildirim A., 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities

of Turkish *Artemisia absinthium*, A. *dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 9452–9458.
12-Kotzé M. and Eloff J. N., 2002. Extraction of antibacterial compound from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). *South African Journal of Botany,* 68: 62–67.
13-Lkhagvajav N., Yasa I., Çelik E., Koizhaiganova M, and Sari Ö. 2011. Antimicrobial Activity of Colloidal Silver Nanoparticles Prepared by Sol-Gel Methods, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 6(1): 149 – 154.
14-Lok C., 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles, Journal of Proteome Research, 5: 916–924.
15-Mahboubi M., and Ghazian Bidgoli F., (2010). In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. Phytomedicine, 17(10):771-774.
16- Martinez-Castanon G. A. Nino-Martınez N., Martınez-Gutierrez F., Martınez-Mendoza J. R. and Ruiz F. 2008. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. Journal of Nanoparticle Research, 10:1343–1348.
17-Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A, Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., and Yacaman M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles, Nanotechnology, 16: 2346–2353.
18-Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhange Moaser: Tehran. 2004. p671
19-Oroojalian F., Kasra-Kermanshahi R., Azizi M. and Bassami M.R. 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry, 120:766-770.
20-Pillai S.K., Moellering C. and Elipoulos G.M., 2005. Antimicrobial combinations. 365-373, In: V. Lorian, (ed.), Antibiotic in laboratory medicine, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 922p.
21-Rai M., Yadav A., and Gade A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances, 27: 76–83.
22-Romano C. S., Abadi K., Repetto V., Vojnov A., A. and Moreno S. 2009. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. Food Chemistry, 115: 456-461.
23-Sandri I. G., Zacaria J., Fracaro F., Delamare A. P. L., and Echeverrigaray S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus Culina against foodborne pathogens and spoiling bacteria. Food Chemistry, 103, 823–828.
24-Sarkar S., Jana A.D., Samanta S.K., and Mostafa G., 2007. Facile synthesis of silver nanoparticles with highly efficient anti-microbial property. Polyhedron, 26: 4419–4426.
25-Saviuc C., Grumezescu AM., Oprea E., Radulescu V., Dascalu L., Chifiriuc MC., Bucur M., Banu O., and Lazar V. 2011a. Antifungal activity of some vegetal extracts on *Candida* biofilms developed on inert substratum. Biointerface Research Applied Chemistry, 1:15-23.
26-Saviuc C., Grumezescu AM., Holban A., Bleotu C., Chifiriuc C., Balaure P., and Lazar V. 2011b. Phenotypical studies of raw and nanosystem embedded *Eugenia carryophyllata* buds essential oil antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains. Biointerface Research Applied Chemistry, 1:111-118.
27-Tepe B., Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., and Vardar-Unlu G., 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (montbret et aucher ex benth.) and *Salvia multicaulis* (vahl). Food Chemistry, 84: 519–525.
28-Ulte A., Bennik M. H. J., and Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology, 68, 1561–1568.
29-Vankar P. S. and Shukla D., 2012. Biosynthesis of silver nanoparticles using lemon leaves extract and its application for antimicrobial finish on fabric. Applied Nanoscience, 2:163–168.
30-Wei D., Sun W., Qian W., Ye Y., and Mac X. 2009. The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. Carbohydrate Research, 344: 2375–2382.
31-Zargari A. 1988. Medicinal Plants (Vol. 2). Tehran, Iran: Tehran University Publications.