

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

بهبود جعفری^{۱*}، علیرضا منادی سفیدان^۲

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۰۹

زمینه و هدف در سال‌های اخیر بروز مقاومت دارویی و عوارض جانبی داروهای ضد میکروبی شیمیایی در درمان عفونت‌ها افزایش یافته است؛ بنابراین استفاده از داروهای گیاهی جدید با عوارض جانبی کمتر و فناوری نانو در عرصه پزشکی می‌تواند کمک شایانی در درمان این نوع عفونت‌ها با شد. هدف از این پژوهش، بررسی مقایسه‌ای اثرات نانوذرات نقره و عصاره متانولی گل همیشه‌بهار بر روی چهار سویه 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 عصاره متانولی گل همیشه‌بهار با روش سوکسوله در غلظت‌های ۲۰ mg/ml تا ۴۰۰ mg/ml از عصاره 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 عصاره 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 عصاره گل همیشه‌بهار خاصیت ضد باکتریایی دارد. بنابراین این عصاره می‌تواند گزینه مناسبی در بررسی‌های آینده تحت وضعیت In Vivo برای تهیه داروهای ضد باکتریایی باشد.

کلیدواژه‌ها:

آنتی‌باکتریال، گل همیشه‌بهار، نانوذرات نقره.

۱. مقدمه

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). به این ترتیب گیاهان را می‌توان منبعی از مواد شیمیایی بالقوه مفید دانست که تنها بخشی از آن مورد بهره‌برداری قرار گرفته است. می-

مقاومت روزافزون بسیاری از باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض ناشی از مصرف داروهای ضد میکروبی، تمایل به استفاده از مواد مؤثره گیاهی یا ترکیب‌های طبیعی با اثر آنتی‌بیوتیکی را افزایش می‌دهد و گیاهان دارویی در نقش جایگزین طبیعی برای داروهای

* نویسنده مسئول: بهبود جعفری

نشانی: اهر، کیلومتر ۲ جاده اهر تبریز - مجتمع دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر

دورنگار: ۰۴۱۴۴۲۳۵۵۸۳

تلفن: ۰۴۱۴۴۲۳۹۷۵۸

رایانه: dr.behboud.jafari@gmail.com, b-jafari@iau-ahar.ac.ir

شناسه ORCID: 0000-0001-6269-4106

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0001-6269-4106

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۷، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۹، ص ۱۷۱-۱۶۳

آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

اضطراب به کار می‌برند (۲۳-۲۵). همچنین خاصیت ضد توموری عصاره این گیاه با دو مکانیسم سیتوتوکسیسیته و فعال‌سازی لنفوسیت‌ها در پژوهش‌های مختلف به تأیید رسیده است (۱۴). در هندوستان نیز گل همیشه‌بهار به‌طور موضعی در درمان هموروئید به کار می‌رفته است (۲۳). امروزه، گیاه همیشه‌بهار برای استفاده از مواد غذایی در ایالات متحده آمریکا 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 میکروپها بدون افزایش مقاومت‌های دارویی، استفاده از نانوتکنولوژی است. محققان نانوتکنولوژی ابعاد وسیعی از کاربردهای نانوذرات را شناسایی کرده‌اند که نقش بسیار زیادی در پزشکی، پیشگیری و درمان بیماری‌ها خواهد داشت (۲۷). یکی از این نانوذرات در زمینه 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 استفاده مفید از آن در زمینه بیوتکنولوژی و مهار اختصاصی میکروپها بررسی شده است. نانوذرات نقره بدون افزایش مقاومت دارویی، باعث مهار سیستم تنفسی باکتری‌ها می‌شود. این عنصر دارای خواص اختصاصی در میکروپ‌زدایی هستند و تهیه 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 عصاره 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 آئروژینوزا* انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه گیاهی از عرصه‌های طبیعی مسجد سلیمان تهیه دقت شد تا همه نمونه‌ها از یک عرصه جمع شوند. سپس نمونه‌ها از سوی گیاه‌شناسان و هرپاروم 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 ریشه گیاه، برای عصاره‌گیری از روش سوکسوله استفاده شد. به‌طوری‌که ۶۰ گرم پودر گیاه خشک‌شده همراه با ۳۰۰ ml متانول در نقش حلال به مدت ۸ ساعت در دستگاه عصاره‌گیر سوکسوله قرار داده شد. این حلال در دمای ۴۰ °C و با استفاده از دستگاه روتاری به آرامی تیخیر شد و عصاره غلیظ‌شده از آن به‌دست آمد. از عصاره‌های غلیظ‌شده با حلال ۵ درصد DMSO (Dimethylsulfoxide)، غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۵۰ و mg/ml

توان این مواد شیمیایی بالقوه مفید را نه‌تنها در قالب دارو، بلکه به‌صورت الگوی بی‌نظیر و نقطه 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 زمینه بهداشت و درمان انسانی و دامپزشکی تبدیل شده است؛ بنابراین یک نیاز مستمر در زمینه 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 زمینه بهداشت و درمان بیماری‌های انسانی و حیوانی برخوردار هستند و با داشتن ترکیب‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، عوامل حذف‌کننده 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 گسترده جهانی و معرفی اثرهای ضد باکتریایی گیاهان مختلف در سال‌های 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 از گیاهان جمع‌آوری‌شده به‌شکل تصادفی یا به یکی از روش‌های فوق انجام گرفته است. ادرین 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 گل همیشه‌بهار با نام علمی *Calendula officinalis* از خانواده کاسنیان (Asteraceae) و دارای نام‌های رایج Marigold و pot و 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. در کشورهای 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 تاریخچه مصرف آن در پزشکی به قرن دوازدهم بر می‌گردد (۲۱). گیاه همیشه‌بهار به‌دلیل داشتن ترکیب‌های شیمیایی از قبیل فلاونوئیدها، 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 به‌همین دلیل آن را در موارد سرفه، بی‌خوابی، آسم، تپش قلب، و

انکوباسیون، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده بررسی شدند و آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد (عدم رشد) به مثابه 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 کمیته غلظت کشنده (Minimum bactericidal concentration) MBC تعیین شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۷ انکوبه شدند. لوله حاوی کمترین غلظت عصاره که در پلیت مربوط به آن عدم رشد باکتری قابل مشاهده بود، به صورت MBC آن ماده در نظر گرفته شد.

برای اثبات خاصیت ضد میکروبی اسانس برگ از روش تهیه رقت در آگار استفاده شد؛ چنان‌که غلظت ۱۰۰۰ mg/ml اسانس در DMSO در محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه شد. پلیت‌ها ۳۰ دقیقه در دمای °C ۲۵ قرار گرفتند. سوسپانسیون میکروبی با غلظت $10^6 \text{ cfu/ml} \times 1/5$ تهیه و در جای مخصوص خود تلقیح شد. در کنار هر یک از پلیت‌های فوق از یک پلیت به مثابه شاهد که تنها حاوی DMSO و محیط کشت بدون اسانس بود استفاده شد. محیط‌های کشت تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای °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 برات استفاده شد. طریقه آماده‌سازی محیط‌های کشت، سوش‌های باکتریایی و روش انجام کار همانند روش‌های استفاده شده در آزمون عصاره متانولی گیاه گل همیشه‌بهار بود. به منظور بررسی اثر سینرژیسمی مصرف هم-زمان نانوذرات نقره و عصاره متانولی گیاه گل همیشه‌بهار که سری‌های رقتی که در دو آزمون پیشین ذکر شد به هم افزوده شدند و در قالب یک غلظت مورد استفاده قرار گرفتند. روش انجام این بخش از پژوهش همانند آزمون‌های پیشین بود. برای کاهش خطای آزمایش هر یک از آزمایش‌های فوق ۵ مرتبه تکرار شد. به منظور بررسی وجود اختلاف معنادار در نتایج به دست آمده از آزمون آنالیز واریانس و کای اسکور استفاده شد و اختلاف بین گروه‌ها در سطح معناداری $p < 0.001$ تعیین شد.

۳. نتایج

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های عصاره متانولی گل همیشه‌بهار به روش انتشار چاهک در جدول شماره ۱ آمده است. مقایسه بین

۴۰۰ برای استفاده در آزمایش تعیین Minimum inhibitory (Concentration) MIC و Disc diffusion تهیه شد. میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش شامل باسیلوس سرئوس (۱۲۴۷ : ATCC)، استافیلوکوکوس آرئوس (۲۵۹۲۳ : ATCC)، سودوموناس آئروژینوزا (۲۷۸۵۳ : ATCC) اشریشیاکلی (۲۵۹۲۲ : ATCC) به صورت لیوفلیزه از کلکسیون میکروبی دانشگاه تهران تهیه شد. نمونه‌های میکروبی مطابق با روش استاندارد احیا شدند و از آن‌جا که تعداد باکتری تلقیح شده یکی از مهم‌ترین متغیرهایی است که بر این پژوهش اثر می‌گذارد، تراکم سوسپانسیون میکروبی تلقیحی باید استاندارد باشد. بدین منظور برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان باکتری ۵-۴ کلنی به محیط کشت مولر هینتون برات منتقل شد تا کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با لوله شماره ۵/۰ استاندارد مک فارلند (کدورت معادل $10^8 \times 1/5$ باکتری در هر میلی‌لیتر) تنظیم شود. برای رسیدن به غلظت $10^6 \text{ cfu/ml} \times 1/5$ را باکتری در هر میلی‌لیتر، سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل لوله ۵/۰ مک فارلند به نسبت ۰/۰۱ رقیق شد. به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره متانولی ۴ غلظت ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۴۰۰ mg/ml از عصاره متانولی گیاه در حلال ۵ درصد DMSO تهیه شد. در این بررسی، اثر ضد میکروبی عصاره متانولی به دو روش Agar Well Diffusion و Dilution Test بررسی شد. در روش انتشار چاهک ۵۰۰ ml از سوسپانسیون میکروبی $10^6 \text{ cfu/ml} \times 1/5$ بر محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال یافت و به وسیله سواب استریل در ۳ جهت کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ mm و به فاصله ۲/۵ cm از هم در سطح آگار ایجاد شد. در ادامه ۱۰۰ μl از غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۴۰۰ mg/ml از عصاره متانولی به درون هر چاهک تزریق شد. شاهد منفی با استفاده از محلولی که برای حل کردن عصاره‌ها به کار گرفته شد (۵٪ DMSO) به دست آمد و از آنتی-بیوتیک کلرامفنیکل نیز به منزله شاهد مثبت استفاده گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۷ انکوبه شد و پس از مدت معین کشت‌های میکروبی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. با استفاده از روش رقت لوله‌ای، کمیته غلظت مهارکنندگی رشد و کمیته غلظت کشندگی عصاره متانولی تعیین شد در این روش جهت تعیین MIC از عصاره متانولی تهیه شده، سریال‌های رقتی ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/ml در محیط مولر هینتون برات به دست آمد. سپس به هر کدام از رقت‌ها ۱ ml از سوسپانسیون باکتریایی فعال، $10^6 \text{ cfu/ml} \times 1/5$ 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 °C ۳۷ انکوبه شدند. پس از طی زمان

باکتری مورد آزمایش در جدول شماره ۲ مشخص شده اند. نتایج حاصل نشان می دهد که غلظت ۲۵ mg/ml از عصاره متانولی گیاه گل همیشه بهار، بر استافیلوکوکوس آرنوس اثر کشندگی دارد. غلظت کشنده این عصاره علیه باسیلوس سرئوس ۱۲/۵ mg/ml به دست آمد. این نتایج بیانگر آن است که در بین باکتری های مورد آزمایش از نظر حساسیت عصاره گیاه گل همیشه بهار اختلاف معناداری وجود دارد (p < ۰/۰۰۱). به عبارت دیگر بیشترین حساسیت به عصاره متانولی گیاه گل همیشه بهار در باسیلوس سرئوس و کمترین حساسیت در سودوموناس آئروژینوزا وجود داشته است. آزمایش های مربوط به تأثیر غلظت ۱۰۰۰ mg/ml اسانس برگ بر ضد باکتری های باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس آرنوس و اشیریشیای کلی اثر مهارکنندگی نشان داد و بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا هیچ اثر مهارکنندگی و کاهش رشد مشاهده نشد.

غلظت های ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۴۰۰ mg/ml از عصاره متانولی به روش انتشار چاهک بر چهار سویه باکتری های استافیلوکوکوس آرنوس، باسیلوس سرئوس، اشیریشیای کلی و سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که دو باکتری استافیلوکوکوس آرنوس و باسیلوس سرئوس بیشترین حساسیت میکروبی در برابر عصاره متانولی را دارند و این اثر بازدارندگی با افزایش غلظت عصاره متانولی بر این دو باکتری افزایش یافت که به صورت افزایش هاله عدم رشد دیده شد. نتایج حاصل از قطر هاله عدم رشد نشان می دهد اثرات مهارکنندگی رشد عصاره متانولی گیاه گل همیشه بهار بر باکتری های گرم منفی مورد آزمایش بسیار کم بوده است؛ به گونه ای که هیچ اثری از ممانعت رشد بر سودوموناس آئروژینوزا نداشت. غلظت های ۴۰۰ mg/ml عصاره متانولی برگ اثر بازدارندگی کمی بر اشیریشیای کلی نشان داد. مقادیر مربوط به کمینه غلظت مهارکنندگی (MIC) و کمینه غلظت کشندگی (MBC) عصاره متانولی گیاه گل همیشه بهار بر ضد چهار

جدول ۱. قطر هاله عدم رشد بر حسب mm چهار سویه باکتری از عصاره متانولی گیاه گل همیشه بهار در غلظت های مختلف

غلظت عصاره (mg/ml)	۲۰	۳۰	۵۰	۴۰۰	کنترل منفی	کنترل مثبت
سویه باکتری						
استافیلوکوکوس آرنوس	۷	۹	۱۰	۱۸	--	۲۰
باسیلوس سرئوس	--	۸	۸	۱۸	--	۱۹
اشیریشیای کلی	--	--	--	۱۲	--	۲۶
سودوموناس آئروژینوزا	--	--	--	--	--	۲۲

جدول ۲. کمینه غلظت مهارکنندگی و کمینه غلظت کشندگی عصاره متانولی گیاه گل همیشه بهار بر باکتری های مورد آزمایش بر حسب (mg/ml)

غلظت عصاره (mg/ml)	MIC	MBC
سویه باکتری		
استافیلوکوکوس آرنوس	۱۲/۵	۲۵
باسیلوس سرئوس	۶/۲۵	۱۲/۵
اشیریشیای کلی	۱۰۰	۲۰۰
سودوموناس آئروژینوزا	--	--

تأثیر غلظت های مختلف نانوذرات نقره به روش انتشار از چاهک در جدول شماره ۳ آمده است.

تأثیر غلظت های نانوذرات نقره بر باکتری های بیماری زا، نشان داد که اثرات مهارتی نانوذرات نقره بر باکتری های گرم منفی بیش از باکتری های گرم مثبت بود. نتایج حاصل از

جدول ۳. قطر هاله عدم رشد باکتری ها بر حسب میلی متر در غلظت های مختلف نانوذرات نقره به روش انتشار از چاهک

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

را بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته است (جدول ۴).

نتایج این آزمون نشان می‌دهد که نان ذرات نقره بیشترین تأثیر را بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و کمترین تأثیر

جدول ۴. آزمون $MBC/MIC \mu g/ml$ باکتری‌ها بر حسب میلی‌متر در غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره به روش لوله‌ای

غلظت نانوذرات ($\mu g/ml$)	MIC $\mu g/ml$	MBC $\mu g/ml$
سویه باکتری		
استافیلوکوکوس آرنوس	۵۰	۱۰۰
باسیلوس سرئوس	۵۰	۵۰
سودوموناس آئروژینوزا	۱۲/۵	۲۵
اشریشیای کلی	۶/۲۵	۱۲/۵

ترکیب در جداول ۵ و ۶ که با روش‌های انتشار از چاهک و آزمون MIC انجام گرفته شد بیان شده است.

با مخلوط کردن رقت‌های تهیه‌شده نانوذرات نقره و عصاره متانولی گیاه گل همیشه‌بهار در آزمون‌های پیشین، یک غلظت ترکیبی به دست آمد. نتایج آزمون ضد باکتریایی این

جدول ۵. قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها بر حسب میلی‌متر در غلظت‌های ترکیبی نانوذرات نقره و عصاره متانولی گل همیشه‌بهار به روش انتشار از چاهک

غلظت عصاره (mg/ml) و نانوذرات ($\mu g/ml$)	کنترل مثبت				کنترل منفی	
	$mg/ml 20$ $\mu g/ml 10+$	$mg/ml 30$ $\mu g/ml 20+$	$mg/ml 50$ $\mu g/ml 40+$	$mg/ml 400$ $\mu g/ml 80+$		
سویه باکتری						
استافیلوکوکوس آرنوس	۱۱/۸	۱۳/۳	۱۴/۹	۱۶/۵	-	۲۰
باسیلوس سرئوس	۱۱/۵	۱۳	۱۴/۸	۱۶/۲	-	۱۹
سودوموناس آئروژینوزا	۱۳	۱۳/۳	۱۵/۸	۱۷/۷	-	۲۶
اشریشیای کلی	۱۱/۳	۱۲/۶	۱۵	۱۷	-	۲۲

افزایش بیشتر در باکتری‌های گرم منفی دیده شد.

در روش چاهک نتایج نشان داد که افزایش شدیدی در اندازه هاله عدم رشد باکتری‌ها صورت گرفته است که این

جدول ۶. آزمون $MBC/MIC mg/ml$ باکتری‌ها بر حسب میلی‌متر در غلظت‌های مختلف

غلظت عصاره (mg/ml) و نانوذرات ($\mu g/ml$)	MIC $\mu g/ml$, mg/ml	MBC $\mu g/ml$, mg/ml
سویه باکتری		
استافیلوکوکوس آرنوس	۶/۲۵	۲۵
باسیلوس سرئوس	۶/۲۵	۱۵/۵
سودوموناس آئروژینوزا	۳/۱۲۵	۶/۲۵
اشریشیای کلی	۶/۲۵	۱۲/۵

باکتری‌ها در مقایسه با آزمون‌های پیشین کاهش معناداری داشته است ($p < 0/001$). این ترکیب بیشترین تأثیر را بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* داشت و کمترین اثر را بر

نتایج این آزمون نشان م دهد که با ادغام نان نقره و عصاره گل همیشه‌بهار تمامی باکتری‌ها زیر تأثیر این ترکیب قرار گرفتند؛ چنان‌که کمینه غلظت ممانعت‌کنندگی و کشندگی

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 زمینه 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). با توجه 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 بهره‌جست. از گیاه گل همیشه‌بهار، یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی مرسوم، به‌طور گسترده‌ای در طب سنتی ایران استفاده می‌شود. این گیاه از خانواده کاسنیان است که برای درمان تعداد زیادی از بیماری‌ها و در ترکیب با داروهای هموپاتیک استفاده شده است و تاریخچه 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 استفاده این گیاه برگ و گل آن است و مهم‌ترین مواد مؤثره 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، گاماترپی‌ن، کاربوفیلین و توکوفرول، پلی‌ساکاریدها، کالاندولین، آلفاوبتا آمیرین و تاراگزاسترول هستند (۱۶، ۳۲). در این پژوهش مشخص شد که عصاره 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 اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشریشیاکلی دارد. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر

خاصیت ضد باکتریایی عصاره 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 ناحیه عدم رشد به نحو چشمگیری افزایش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که اثر عصاره متانولی بر ضد باکتری‌های گرم منفی بسیار ضعیف‌تر از انواع گرم مثبت است؛ به‌گونه‌ای که در غلظت ۴۰۰ mg/ml از عصاره 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 لیپوبلی ساکاریدهای دیواره سلولی احتمالاً مانع از رسیدن ترکیب‌های فعال اسانس و عصاره به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی می‌شوند (۳۳). به‌طور کلی فراورده‌های گیاهی منجر به گرانبه شدن سیتوپلاسم، گسیختگی غشای سیتوپلاسمی (۳۴) غیر فعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم‌های درون سلولی و برون-سلولی و متلاشی شدن دیواره سلولی می‌شوند (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 عصاره الکلی و آبی گل همیشه‌بهار بر پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی" نشان دادند که عصاره گل همیشه‌بهار اثر لیشمانیاکشی خوبی دارد و به‌احتمال می‌تواند در درمان لیشمانیا به‌کار رود (۳۶). دوستار و همکاران در پژوهشی با عنوان "تأثیر عصاره 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 در سلول‌های نابه‌جای کریپتی در سرطان کولورکتال تجربی در موش صحرایی اثر مهاری دارد (۳۷). قاسمی پیربلوطی و همکاران در مقاله‌ای با عنوان "اثر اسیدجاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدها در عصاره گل همیشه‌بهار" نشان دادند که اثرات تیمارهای محلول‌پاشی اسیدجاسمونیک و سالیسیلیک بر میزان کاروتنوئید و میزان پلی‌فنل در عصاره گل همیشه‌بهار در سطح احتمال یک درصد و بر میزان فلاونوئید کل در سطح ۵ درصد معنادار بودند (۳۲). Haroon و همکاران در مقاله‌ای با عنوان "بررسی خواص آنتی-اکسیدانی و آنتی‌گلیسمی عصاره گل همیشه‌بهار" نشان دادند که این گیاه دارای خاصیت ضداکسیدانی است و نقش مؤثری

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 عصاره گیاه گل همیشه‌بهار بر ضد باکتری‌های گرم مثبت است؛ به گونه‌ای 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 عصاره 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 فرآورده 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

- 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.
- 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.
- 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.
- Jafari-Sales A, Shahnian A, Fathi R, Malekzadeh P, Mobaiven H, Bonab FR. Evaluation of Antibacterial Activity of Essential Oil of *Ziziphora clinopodioides* and *Achillea wilhelmii* on Antibiotic-resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *Internal Medicine and Medical Investigation Journal*. 2017;2(2):49-56.
- Mobaiven H, Jafari Sales A, Savvahi 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.
- Jafari-Sales A, Mobaiven H, Jafari B, Savvahi J. Assessment of Antibacterial Effect of Alcoholic Extract of *Centaurea depressa* MB, *Reseda lutea* L. and *Fumaria asepalis* on Selected Standard Strains in Vitro. *Scientific Journal of Nursing, Midwifery and Paramedical Faculty*. 2019 Dec 10;5(3):63-73.
- 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.
- 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.
- Mobaiven 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.
- 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.
- 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).
- Jafari-Sales A, Jafari B, Savvahi 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.
- Jafari-Sales A, Rasi-Bonab F, Savvahi 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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: Donvae 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]. Vijayasathay 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, Hollev 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-Zsilavec M, Della Loggia R, Tubaro A, et al. Anti-oedematous activities of the main triterpene diol esters of marigold (Calendula officinalis L.). Journal of ethnopharmacology. 1997;57(2):139-44.
- [32]. Ghasemi Pirbalouti A, Mosavi Haris SA, Tirgir F, Hamed B. Effect of jasmonic acid and salicylic acid on polyphenol and flavonoids in extract of Calendula officinalis L. flower. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs). 2012;3(3):175-80.
- [33]. Duraipandiyar 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 γ -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, Avatollahi SA, Zare Mohazzabiyveh 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, Hajseved Javadi N, Azadnia E, Kiani Harchegani A, et al. Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by chemical reduction on Staphylococcus aureus and Escherichia 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 sefidan²

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.