یازدهمین کنگره ملی سراسری
فناوریهای نوین در حوزه توسعه پایدار ایران
11th National Congress of
the New Technologies in Sustainable Development of Iran
senaconf.ir

بررسی امکان کاربرد صمغ بومی بارهنگ به عنوان یک ترکیب مغذی در محیط کشت باکتری

کیمیا صراف ماموری[۱]، سمیه رهایی[۲*]، محبوبه زارع [۳]، مهراب نصیری کناری[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران kimia.sarraf76@gmail.com

[۲]عضو هیئت علمی دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران S.rahaiee@ausmt.ac.ir

[۳] عضو هیئت علمی دانشکده گیاهان دارویی، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران mahboobeh.zare93@gmail.com

[۴] دکترای زیست شناسی سلولی و مولکولی ، پژوهشکده شمال، انستیتو پاستور ایران Mehran.nasirikenari@gmail.com

چکیده

بارهنگ کبیر با نام علمی (*Plantago major L.*) گیاهی چند ساله از تیره بارهنگیان می باشد. گیاه بارهنگ دارای خواص ضد میکروبی، ضد سم، ضد ویروس و ضد عفونی کنندگی می باشد. همچنین بارهنگ می تواند در درمان و التیام زخم ها موثر باشد و به طور سنتی در ایران و بسیاری از کشورهای دیگر جهان از برگ های این گیاه بدین منظور بهره برده اند. صمغ این گیاه به دلیل دارا بودن انواع کربوهیدرات ها از جمله گلوکز، زایلوز، فروکتوز و ... می تواند به عنوان یک منبع کربن مغذی در محیط کشت استفاده گردد. در این مطالعه، امکان کاربرد صمغ بارهنگ در محیط کشت باکتری بررسی شده است و جهت آنالیز از روش های تفرق اشعه ایکس (XRD) و اسپکتروسکوپی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) استفاده شده است، همچنین خاصیت ضد میکروبی صمغ توسط آزمون انتشار دیسک (Disk Diffusion) مورد مطالعه قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی

ضد میکروبی، صمغ دانه بارهنگ، محیط کشت باکتری، منبع کربن

۱. مقدمه

بارهنگ یا *Plantago major L.* متعلق به راسته *Plantaginales*، زیر رده های *Asteridae*، رده *Magnolipsida* و خانواده *Plantaginaceae* می باشد [۱]. از نظر گیاهشناسی، بارهنگ گیاهی پایا، ظاهرا بی کرک یا کمی کرک پوش است. برگ های آن طوقه ای، تخم مرغی پهن با ۳ تا ۹ رگبرگ برجسته، و دارای دمبرگ نسبتا بلند می باشد [۲]. تعداد گونه های این جنس را ۲۸۲ گونه گزارش کرده اند که ۲۲ گونه از این جنس در ایران می روید [۱]. زمان گلدهی گیاه بارهنگ کبیر اردیبهشت تا شهریور ماه می باشد. گیاه بارهنگ در منطقه وسیعی از دو قاره اروپا و آسیا و همچنین شمال آفریقا و آمریکای شمالی می روید که در ایران تقریبا در تمام نقاط رشد می کند [۲]. این گیاه مقدار زیادی بذر تولید می کند و به همین دلیل یکی از فراوان ترین و گسترده ترین محصولات دارویی در سراسر جهان است که در بسیاری از نقاط جهان یافت می شود [۶]. ریشه، برگ و دانه این گیاه اثر نرم کننده داشته و از آن ها به عنوان تصفیه کننده خون و ناراحتی های آسم استفاده می گردد [۲]. از بارهنگ به همراه قدومه و دانه به می توان مخلوطی تهیه کرد که به عنوان نرم کننده سینه مصرف سنتی دارد. جوشانده دانه بارهنگ در رفع بیماری های التهابی کلیه و مثانه موثر است [۳]. بارهنگ را برای بهبود افراد مبتلا به برونشیت و به عنوان ضد التهاب و کاهنده درد تجویز می کنند، همچنین برای بارهنگ خاصیت آنتی اکسیدانی در نظر گرفته اند [۱]. از برگ های بارهنگ به طور سنتی در ایران و بیشتر کشورهای جهان به منظور ترمیم زخم بهره برده اند [۶]. از ترکیبات شیمیایی بارهنگ می توان به موسیلاژ یا صمغ، ماده پلانتاژین، تانن و رزین اشاره کرد [۱]. صمغ نوعی هیدروکلوئید، یک ماده با زنجیره بلند از پلی ساکارید با وزن مولکولی بالا می باشد که به طور عمده از منابع گیاهی به دست می آید [۶ ، ۴]. با انجام کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[1] مشخص شد که این صمغ دارای هشت نوع مونوساکارید از جمله گلوکز (۲/۷۶٪)، فروکتوز (۰/۹۲٪)، زایلوز (۱۰/۴۶٪)، رامنوز (۲۱/۸۴٪)، گالاکتوز (۲/۴۶ ٪)، آرابینوز (۵۲/۶۱٪)، ساکارز (۵/۲۳٪) و گلوکورونیک اسید (۳/۶۹٪) می باشد [۴]. با توجه به دارا بودن انواع قندها به عنوان منبع کربن، این صمغ می تواند جایگزین کربوهیدرات در محیط کشت باکتری گردد. یکی از کاربردهای نانوسلولز باکتریایی استفاده از این ماده به عنوان پانسمان زخم است. سلولز باکتریایی توسط جنس *استوباکتر* به عنوان فیلم زیستی ساخته می شود. ظرفیت بالای نگهداری آب و مبادله بخار با محیط عامل برتری این ماده در مقایسه با سایر پانسمان های مرسوم زخم می باشد. *گلوکونواستوباکتر زایلینوس* یک باکتری گرم منفی، میله ای شکل و تولید کننده سلولز می باشد. این باکتری قابلیت استفاده از فروکتوز، ساکارز و گلوکز به عنوان منبع کربن برای تولید سلولز را دارد. این باکتری در محدوده دماهای ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد قادر به فعالیت می باشد و به کاهش ناگهانی آب در محیط کشت مقاوم است. لذا در این مطالعه، ما امکان کاربرد صمغ بارهنگ به عنوان جایگزین گلوکز در محیط کشت حاوی باکتری *گلوکونواستوباکتر زایلینوس* در جهت تهیه سلولز را مورد بررسی قرار داده ایم.

۲. روش کار

۲-۱ تهیه صمغ بارهنگ

دانه بارهنگ از داروخانه گیاهان دارویی شهرستان آمل تهیه گردید. دانه بارهنگ با نسبت ۳۰ به ۱ در آب مقطر مخلوط شد. مخلوط آب و دانه توسط محلول سدیم هیدروکسید ۱ مولار به pH =۸ رسید و سپس این مخلوط به مدت ۱/۵ ساعت بر روی حرارت ۷۵ درجه سانتی گراد تحت همزنی مداوم قرار گرفت و در نهایت صمغ مناسبی به دست آمد که با استفاده از پارچه صافی از دانه ها جدا گردید.

[1] HPLC

۲-۲- تهیه محیط کشت و تولید سلولز باکتریایی

جهت کشت باکتری از محیط تغییر یافته هیسترین- شرام[۲] براث استفاده شد که ترکیب اصلی این محیط گلوکز می باشد. برای تهیه محیط کشت، به جای قند گلوکز موجود در محیط از صمغ بدست آمده از بارهنگ استفاده شد؛ سپس باکتری مذکور در محیط، کشت داده شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰- ۸ روز گرمخانه گذاری گردید. پس از این مدت، یک لایه پلیکل زرد رنگ بر روی سطح محیط کشت مشاهده شد که همان سلولز باکتریایی است.

۲-۳- طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) فیلم تولید شده

برای انجام این آزمون ابتدا نمونه سلولز به دست آمده به صورت کامل خشک شده و در دسیکاتور قرار گرفت. سپس نمونه با پودر پتاسیم برماید با نسبت مشخص مخلوط گشته و از آن قرص تهیه شد و در آخر طیف نمونه با استفاده از دستگاه طیف سنجی مادون قرمز (Perkin Elmer، انگلستان) مورد بررسی قرار گرفت. توان تفکیک برای نمونه در گستره ۶۵۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی متر در نظر گرفته شد [۴].

۲-۴- بررسی ساختار بلوری با پراش پرتو ایکس (XRD)

آنالیز XRD یک روش پر کاربرد به منظور بررسی خصوصیات بلورها، تعیین کیفی مواد ناشناس، فازهای تشکیل شده، درصد بلوری شدن و اندازه ی متوسط بلورهای مواد و فیلم ها می باشد. در این مطالعه به منظور بررسی خصوصیات بلوری فیلم سلولزی به دست آمده از آنالیز XRD (Bruker AXS) استفاده گردید [۸].

۲-۵- بررسی اثر ضد باکتریایی صمغ بارهنگ

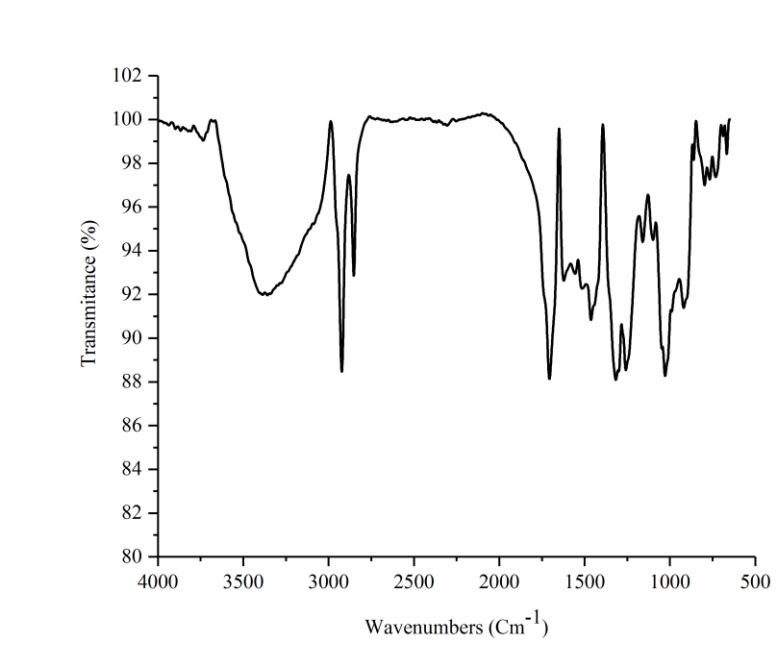
جهت مطالعه فعالیت ضد باکتریایی صمغ، از باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و باکتری های گرم منفی *Escherichia coli* ، *Salmonella typhi* و *Pseudomonas aeruginosa* استفاده گردید. فعالیت ضد باکتریایی توسط روش متداول انتشار دیسک اندازه گیری شد. به منظور انجام تست ضد میکروبی، سوسپانسیون های میکروبی رشد یافته در محیط کشت نوترینت براث که با نیم مک فارلند استاندارد شده بودند را روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت دادیم. سپس غلظت ۰/۵٪ از صمغ بارهنگ را تهیه کرده و روی دیسک های خالی موجود بر روی محیط کشت بارگذاری کرده و در نهایت پلیت ها را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دادیم و قدرت ضد باکتریایی صمغ را بر اساس قطر ناحیه بازداری توسعه یافته اطراف دیسک محاسبه نمودیم [۹].

[2]Hestrin-Schramm

۳. بحث

۳-۱- طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) فیلم سلولزی

طیف سنجی مادون قرمز به منظور تشخیص و تعیین گروه های عملکردی قندها و کربوهیدرات های پیچیده استفاده می گردد. فاصله بین پیک های ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ بر سانتی متر به عنوان ناحیه اثر انگشت برای کربوهیدرات ها استفاده می شود [۴]. وجود طول موج در محدوده ۳۲۰۰ تا ۳۵۰۰ بر سانتی متر احتمالا مربوط به پیوند O-H باشد. حضور پیک در نواحی ۲۹۲۲/۵۴ و ۲۸۵۲/۳۷ بر سانتی متر مربوط به ارتعاش خمشی CH_2-CH می باشد [۱۱]. وجود پیک در ناحیه ۱۶۲۱/۶۰ بر سانتی متر می تواند مربوط به کشش ارتعاشات C=O آمید نوع I باشد [۵]. وجود طول موج در نواحی ۱۴۶۲/۶۱ و ۱۳۱۶/۸۹ بر سانتی متر مربوط به پیوند C-H است. حضور پیک در نواحی ۱۰۹۸/۹۹ و ۱۱۵۹/۶۴ بر سانتی متر نیز می تواند مربوط به پیوند C-O باشد [۱۰].

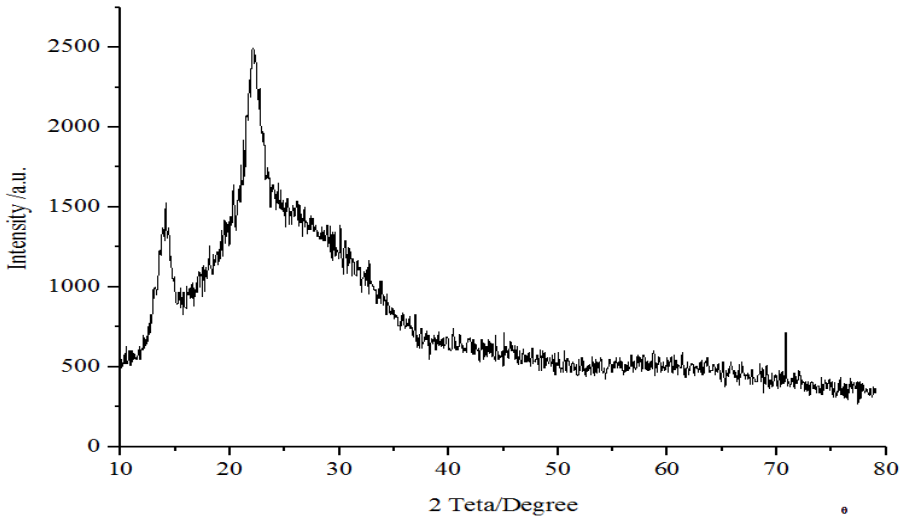


شکل۱. طیف سنجی FTIR فیلم سلولزی بدست آمده از محیط کشت حاوی صمغ بارهنگ

۳-۲- پراش پرتو ایکس (XRD) فیلم تهیه شده

در مورد سلولز باکتریایی خالص که محیط کشت آن حاوی گلوکز باشد سه پیک مشخص در نواحی° ۷۴ /۱۴، ° ۱۶/۶۰ و ° ۲۲/۶ وجود دارد که به ترتیب مربوط به صفحات کریستالی ۱۱۰،۱۰۰،۰۱۰ می باشد [۱۲]. نتیجه آنالیز به دست آمده از فیلم تولید شده در محیط

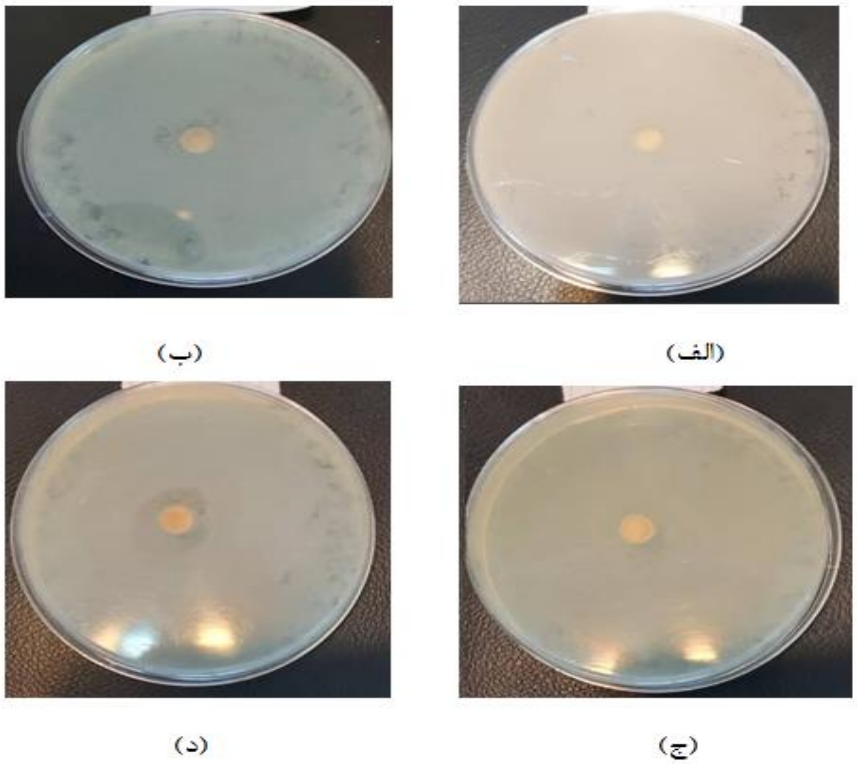
کشت حاوی صمغ بارهنگ نشان می دهد که جایگزین شدن صمغ بارهنگ به جای گلوکز به عنوان منبع کربن سبب کاهش پیک شده و دو پیک در نواحی ° ۱۴/۰۸۴ و ° ۲۲/۳۵۱ مشاهده می گردد که می تواند بیانگر این مطلب باشد که در حضور صمغ بارهنگ در محیط کشت، ساختار کریستالی فیلم به سمت آمورف بودن تغییر یافته است به عبارتی دیگر عدم حضور گلوکز در محیط کشت می تواند از میزان کریستاله بودن فیلم را کاهش دهد.



شکل ۲. پراش پرتو ایکس (XRD) فیلم حاصله از محیط کشت حاوی صمغ بارهنگ

۳-۳- نتایج ضد میکروبی صمغ بارهنگ

نتایج به دست آمده از آزمون ضد میکروبی دیسک های لود شده با صمغ بارهنگ نشان داد که صمغ مذکور فاقد هرگونه خاصیت ضد میکروبی بر روی سویه های باکتریایی مذکور بوده است. بر اساس مطالعه علیزاده و همکاران (۲۰۱۷) عصاره آبی بارهنگ کبیر هیچ اثر مهار کنندگی بر روی باکتری های مذکور نداشته در حالیکه بیشترین قطر هاله عدم رشد برای عصاره اتانولی بارهنگ کبیر مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* بود [۲].



شکل ۳. نتایج آزمون ضد میکروبی صمغ بارهنگ (الف: *Salmonella typhi*، ب: *Pseudomonas aeruginosa*، ج: *Escherichia coli* و د: *Staphylococcus aureus*)

۴. نتیجه گیری

با توجه به اینکه صمغ بارهنگ دارای هشت نوع کربوهیدرات مختلف است و از طرفی خاصیت ضد التهابی نیز دارد، در این پژوهش صمغ بارهنگ جایگزین گلوکز در محیط کشت باکتری *استوباکتر زایلینوس* گردید و فیلم به دست آمده مورد ارزیابی قرار گرفت. فیلم سلولزی حاصل از محیط کشت باکتری دارای صمغ بارهنگ شفاف و بسیار انعطاف پذیر بود. نتایج تست FTIR نشان داد که در فیلم بدست آمده برهم کنش های مربوط به ترکیبات موجود در صمغ بارهنگ نیز وجود دارد به عبارتی ترکیبات کربوهیدراتی صمغ بارهنگ در ایجاد و تشکیل فیلم سلولزی نقش موثری داشته اند. همچنین، نتایج آنالیز XRD نشان داد که با حضور صمغ بارهنگ از کریستالیزاسیون سلولز کاسته شده است که می تواند به علت ایجاد پیوندهای هیدروژنی جدید باشد. نتایج آزمون ضد باکتریایی نیز نشان داد که صمغ بارهنگ بر روی سویه های مورد مطالعه خاصیت ضد باکتریایی ندارد لذا جهت ایجاد خاصیت ضد میکروبی در فیلم سلولزی بدست آمده، باید از یک ترکیب ضد میکروبی مناسب بهره جست. با توجه به نتایج حاصله نتیجه گیری می شود که به دلیل مقرون به صرفه بودن و بومی بودن صمغ بارهنگ، می توان از آن به عنوان جایگزین مناسب گلوکز در محیط کشت باکتری جهت تولید سلولز استفاده نمود و از فیلم حاصله به عنوان یک زخم پوش نسبتا ارزان و رایج بهره گرفت. در این زمینه مطالعات بیشتری در حال انجام است.

منابع

[1] آمنه جمشیدی، مرضیه حاجتی، غلامرضا بخشی خانیکی، ۱۳۹۸. تاثیر عضاره های الکلی و آبی گونه هایی از جنس بارهنگ در سنین ۳-۲ و ۵ ماهگی بر روی میکروارگانیسم های مختلف.

[2] بهروز علی زاده بهبهانی، فخری شهیدی، فریده طباطبایی یزدی، سید علی مرتضوی، محبت محبی، ۲۰۱۷. اثر ضد میکروبی و برهمکنش عصاره های آبی و اتانولی بارهنگ کبیر (Plantago major) بر استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا در شرایط برون تنی، ۲۱، ۸-۱.

[3] شیرین رحیمی، زهرا شیخ الاسلامی، سید مهدی سیدین اردبیلی، ۱۳۹۸. بررسی تاثیر صمغ بومی بارهنگ کبیر (Plantago major L.) بر کیفیت و خواص حسی کیک روغنی کم چرب ترکیبی (گندم- کینوآ)، ۱۶.

[4] رسول نیکنام، علی ایاسه، بابک قنبر زاده، ۱۳۹۷. مطالعه خواص فیزیکوشیمیایی و وزن مولکولی صمغ دانه بارهنگ استخراج شده با پیش تیمار فراصوت، ۱۵.

[5] رفتنی امیری، سیده خدیجه حسینی، ۲۰۲۱، تهیه پودر زرشک تولیدی به روش کف پوشی و اثر دمای خشک کن بر ویژگی های آن. *فناوری های نوین غذایی*، ۸ (۲)، ۲۵۳-۲۷۲.

[6] Behrooz,A.B., Farideh,T.Y., Fakhri,S., Mohammad Ali, H., Seyed Ali, M., Mohebbat, M., 2017. Plantago major seed mucilage: Optimization of extraction and some physicochemical and rheological aspects,155,68-77.

[7] Nassim,M.R., Fatemeh, S., Mahsa, M.C., Samin, K., Marzieh,R., Farzaneh, C., Seyyed Ali, M., Bahram, R., 2018. The Wound Healing Effect of Plantago Major Leaf Extract in a Rat Model: Pilot Experimental Confirmation of a Traditional Belief in Persian Medicine. *Herbal Medicines Journal*, *3*(1), 26-30.

[8] Cao, G., Wang, Y., 2004. Nanostructures and nanomaterials: synthesis. *Properties and Applications*, *2*.

[9] Surendhiran,D., Li,Ch., Cui, H., Lin,L., 2020. Fabrication of high stability active nanofibers encapsulated with pomegranate peel extract using chitosan/PEO for meat preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, *23*, 100439.

[10] Linda,O., Janja,L., France, C., Mirjam, L., Marija,G., 2021. Properties of bacterial cellulose produced using white and red grape bagasse as a nutrient source. *Processes*, *9*(7), 1088.

[11] Csaba Zoltan, K.S., Marta,S., Anicuta Stoica, G., Sorina Ion, J., Szabolcs, S., Luliana, J., Tanase, D., 2012. Biodegradation behavior of composite films with poly (vinyl alcohol) matrix. *Journal of Polymers and the Environment*, *20*(2), 422-430.

[12] Wang, P., Li, Y., Zhang, C., Que, F., Weiss, J., & Zhang, H. (2020). Characterization and antioxidant activity of trilayer gelatin/dextran-propyl gallate/gelatin films: Electrospinning versus solvent casting. *Lwt*, *128*, 109536.