Archive of SID

بررسی فعالیت ضد باکتریایی ریشه گیاه نوروزک(*Salvia leriifolia* Benth.) در مراحل مختلف رشد و نمو

معصومه مدرس* و پروانه ابریشم چی

مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۸۸/۶/۱۷

چکیده

گیاه دارویی نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.)، از تیره نعناع (Lamiaceae) و بومی استان خراسان می‌باشد و دارای خواص با ارزش متعددی از جمله خواص ضد درد، ضد التهاب، آرام بخش، کاهش دهنده قند خون و آنتی‌اکسیدان است. در این تحقیق به منظور تعیین بهترین مرحله رشد و نمو برای استفاده بهینه از خواص ضد باکتریایی ریشه این گیاه ، وجود این خاصیت در مراحل مختلف رشد و نمو گیاه بررسی گردید. ریشه گیاه در سه مرحله مختلف از رشد و نمو (مرحله رویشی ، مرحله گلدهی و مرحله رسیدگی بذر) جمع‌آوری و خشک گردید. سپس عصاره متانولی ریشه در دستگاه تبخیرگردان، تحت خلاء خشک شد. اثرضد میکروبی غلظتهای ۵ ،۱۰ ،۱۵و۲۰ هزار میلی‌گرم در لیتر از عصاره به روش disc diffusion اندازه‌گیری شد. این پژوهش بر روی باکتریهای *Escherichia coli, Staphylococcus aureus Pseudomonas aeruginosa* , *Klebsiella pneumoniae* , و *Proteus mirabilis* انجام شد. پس از ۲۴ ساعت، قطر هاله ممانعت از رشد اندازه‌گیری و اثر بازدارندگی این عصاره‌ها با یکدیگر و با آنتی‌بیوتیکهای تتراسیکلین ، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین مقایسه گردید. تجزیه وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP و بر اساس آزمون HSD در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گردید. براساس نتایج حاصل، در تمام موارد *S. aureus* و *P. aeruginosa* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم ترین باکتریها نسبت به عصاره بودند. بیشترین فعالیت ضد باکتریایی ریشه در مرحله رویشی مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری بین مرحله رویشی و دو مرحله گلدهی و رسیدگی بذر وجود داشت. از طرف دیگر تأثیر ضد میکروبی عصاره ریشه به ویژه در مرحله رویشی به طور معنی داری بیشتر از تأثیر آنتی‌بیوتیکهای مذکور و در مواردی مشابه با تأثیر آنها بود. بنابر این به نظر می رسد که بهترین زمان برای بهره برداری از خاصیت ضد باکتریایی ریشه، مرحله رشد رویشی گیاه نوروزک است.

واژه های کلیدی: *Salvia leriifolia* ،ضد باکتری، ریشه، رشد و نمو.

*نویسندهٔ مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۵۱۵۸۷۵۵۱ ، پست الکترونیکی: m_modarres70@yahoo.com

مقدمه

نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) گیاهی است از تیره نعناع (Lamiaceae) که بومی استان خراسان می باشد(۲۲). گزارشهای مختلفی در ارتباط با خواص درمانی گیاه نوروزک وجود دارد. عصاره آبی برگ آن خواب آور بوده و دارای اثر شل کنندگی عضلانی است و از این نظر با دیازپام قابل مقایسه است(۱۶). همچنین تأثیر ضد التهابی جوشاندهٔ برگ گیاه، از نظر کارآیی مشابه با داروی دیکلوفناک است(۱۴). از طرف دیگرعصاره های آبی و الکلی دانه و برگ این گونه سبب کاهش قند خون شده (۴) و از ایجاد و توسعه زخمهای معده در موش جلوگیری می‌کند (۱۵). عصاره های آبی و الکلی ریشه گیاه نیز دارای خاصیت محافظت کنندگی عصبی در برابر کم خونیهای موضعی(Cerebral ischemia) در مغزموش می باشد (۲۳).

www.SID.ir

خاصیت آنتی‌اکسیدانی برگ و ریشه گیاه نوروزک نیز در ارتباط با حضورمتابولیت ثانویه ای از نوع شالکونها به نام بوتئین است(۶، ۱۱، ۱۳). شالکونها گروهی از متابولیتهای ثانویه گیاهی و پیش‌ساز طبیعی فلاونوئیدها هستند که فعالیتهای ضد التهابی ، ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد سرطانی آنها مشخص شده است(۸) خواص دارویی این ترکیبات عمدتاً از خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آنها ناشی می‌شود(۲۱) .

ارزش دارویی گیاه نوروزک وابسته به متابولیتهای ثانویه‌ای ازجمله ترپنوئیدها ، ساپونین‌ها ، فلاونوئیدها ، تاننها و آلکالوئیدها می‌باشد. در اسانس این گیاه ۱۷ نوع ترپن با درصدهای متفاوت وجود دارد. ترکیبات بورنئول با ۲۶ درصد، ایونول با ۱۵ درصد و ۱،۸-سینئول با ۹ درصد بیشترین سهم را به خود اختصاص می‌دهند(۵).

گزارشهای متعددی در مورد خواص ضد میکروبی عصاره برگ و ریشه نوروزک وجود دارد. اثر ضد میکروبی اسانس وعصارهٔ متانولی برگ نوروزک بر میکروارگانیسم های *Escherichia coli*،*Staphylococcus aureus* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Pseudomonas aeruginosa* و*Proteus mirabilis* بررسی گردیده است. در این بررسی عصاره گیاه بر تمامی میکروارگانیسم های مورد آزمایش اثر بازدارندگی داشته‌است. همچنین تأثیر اسانس برگ گیاه بر*S. aureus*، *P. aeruginosa* و *C. albicans* قابل توجه و به ویژه اثر آن بر *C. albicans* با داروی ضد قارچی کلوتریمازول، که امروزه به طور وسیعی در درمان عفونتهای کاندیدیایی استفاده می‌شود ،قابل قیاس بوده است(۱). همچنین عصاره متانولی ریشه نوروزک نیز بر میکروارگانیسم‌ها اثر بازدارندگی داشته است به طوری که اثر آن بر*S. aureus* و*B. subtilis* قوی تر بوده است(۳).

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه گیاه نوروزک در مراحل مختلف رشد ونمو نشان داده است که بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی ریشه در مرحله رویشی وکمترین آن در مرحله گلدهی وجود دارد و تفاوت بین این دو معنی دار است(۷).

میزان ونوع مواد موثره موجود در گیاهان که عمدتاً متابولیت‌های ثانویه هستند، در طول دوره رشد ونمو گیاه تغییر می کند، بنابراین خواص دارویی گیاهان که وابسته به حضور متابولیت‌های ثانویه است نیزممکن است دچار تغییر شود. طبق بررسیهای به عمل آمده تا به حال گزارشی در مورد بررسی خاصیت ضد باکتریایی این گیاه، در ارتباط با مراحل مختلف رشد ونمو وجود ندارد. بنا براین، از آنجا که تحقیق در مورد بهترین مرحله رشد و نمو گیاه برای استفاده بهینه از خواص دارویی آن می‌تواند راهگشای استفاده مؤثرتر از این گیاه در داروسازی باشد، در این تحقیق فعالیت ضدباکتریایی ریشه گیاه نوروزک در مراحل مختلف رشد و نمو بررسی گردید، تا مناسب ترین زمان برای برداشت ریشه گیاه جهت استفاده از خواص ضدمیکروبی آن مشخص شود .

مواد و روشها

الف- تهیه نمونه گیاهی: جمع آوری گیاه در سه مرحله از رشد و نمو یعنی رشد رویشی(مرحله۱) ، گلدهی(مرحله۲) و رسیدگی بذر(مرحله۳) به ترتیب در ۲۷ اسفند ۱۳۸۴ ،۲۷ فروردین و۲۶ اردیبهشت ۱۳۸۵ از منطقه کبودان واقع در شمال شهرستان بردسکن (استان خراسان رضوی) که دور از دسترس دام بود، انجام شد و شناسایی گونه توسط هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد تأیید گردید. بعد از هر بار جمع آوری ، ریشه ها به طور جداگانه در تاریکی و دمای پایین خشک شدند و تا زمان انجام آزمایش در کیسه کتانی و ظروف در بسته در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی گراد) نگهداری گردیدند و سپس توسط آسیاب پودر شدند.

ب- استخراج عصاره گیاهی: ریشه های خردشده نوروزک درمدت یک شبانه روز با متانول خالص به نسبت

www.SID.ir

۱ : ۱۰ (وزنی : حجمی) روی شیکر در دمای اتاق عصاره گیری شد. عصاره حاصل با کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف گردید. بقایای گیاهی مجدداً با متانول به مدت یک شبانه روز دیگر با همان شرایط قبل تحت عملیات استخراج قرار گرفت ومحلول صاف شده به عصاره اولیه اضافه شد. عصاره استخراجی با کربن فعال (۱ گرم کربن : ۵ گرم گیاه خرد شده) به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر در دمای اتاق رنگ بری و سپس با کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف شد تا محلول شفافی به رنگ قهوه ای به دست آید. عصاره متانولی سپس به نسبت ۱ :۷ تحت خلأ و دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی گراد توسط دستگاه تبخیرگردان تغلیظ و سپس در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی گراد و زیر هود تا حد خشکی تبخیر گردید (۲۶). سپس دانسیته عصاره ها از طریق اندازه گیری وزن عصاره خشک با ترازوی با دقت ۰.۱ میلی گرم و تقسیم بر حجم محلول عصاره اندازه گیری گردید و pH هرکدام از آنها با pH متر تعیین شد.

پ- تهیه سوسپانسیون میکروبی: میکروبهای مورد آزمایش ازکشت باکتریهای تازه تهیه شده از بیماران بیمارستان امام‌رضا واقع در شهر مشهد تهیه شد. باکتریهای *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus mirabilis* مورد استفاده قرار گرفت. باکتریها جهت خالص‌سازی در محیط کشت Nutrient Agar به عنوان کشت مادر کشت شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. سپس میکروبهای خالص شده در محیط کشت مایع Nutrient broth کشت شد. برای هر سری آزمایش کشت تازه ۲۴ ساعته تهیه شد. برای این کار یک لوپ از هر میکروب در ۵cc محلول محیط کشت فوق تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سوسپانسیون میکروبی با افزودن نرمال سالین ۰/۹ درصد و مقایسه کدورت آن با محلول ۰/۵ مک فارلند ، سوسپانسیونی با غلظت تقریبی $۱/۵\times۸^{۱۰}$ میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر بدست آمد که از آن برای تلقیح در محیط کشت مولر-هینتون آگار استفاده گردید(۱۹).

ت- عملیات کشت و تهیه تیمارهای مختلف از عصاره ها: برای بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های حاصل از ریشه در سه مرحله مختلف از رشد و نمو از روش disc diffusion استفاده گردید. غلظتهای ۵۰۰۰ ،۱۰۰۰۰ ، ۱۵۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ میلی گرم در لیتر از عصاره خشک با کمک آب مقطر استریل تهیه شد. در غلظت ۲۰۰۰۰میلی گرم در لیتر pH عصاره در مراحل رویشی، گلدهی و رسیدگی بذر به ترتیب ۴/۸۵ ، ۴/۹۶ و۵/۲۱ و دانسیته آنها نیز به ترتیب ۱/۰۳۳ ،۱/۰۳۱ و ۱/۰۳۰ بود. سپس دیسکهای بلانک با قطر ۶/۵ میلی‌متر(ساخت شرکت Mass Diagnostic ، کشور انگلستان) به مدت نیم ساعت در محلول عصاره در شرایط استریل خیسانده شدند و روی کشت باکتریها قرار گرفتند. از دیسک های خیسانده شده در متانول به عنوان شاهد منفی و از دیسکهای آماده(ساخت شرکت Mass Diagnostic ، کشور انگلستان) آنتی بیوتیکهای تتراسیکلین (غلظت ۳۰ میکروگرم) ،پنی سیلین (غلظت ۱۰ واحد) و آمپی سیلین (غلظت ۱۰ میکروگرم) به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. پتری دیشها ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و سپس قطر هاله ممانعت از رشد میکروبها اندازه گیری شد (۹).

ث- تجزیه و تحلیل آماری داده ها: بررسی خواص ضد میکروبی در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ارزیابی داده ها با نرم افزار آماری JMP و اختلاف میانگینها توسط آزمونHSD(Tukey) در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گردید .

نتایج

الف- تأثیر غلظتهای مختلف از عصاره (در هر یک از مراحل رشد و نمو) بر هر یک از باکتریها: آنالیز آماری

www.SID.ir

Archive of SID

داده ها نشان داد که اولاً تفاوت بین میانگینهای قطر هاله ممانعت از رشد حاصل از تأثیر غلظتهای مختلف عصاره ریشه (۵۰۰۰ ppm، ۱۰۰۰۰، ۱۵۰۰۰ و۲۰۰۰۰) که درسه مرحله مختلف از دوره زندگی گیاه برداشت شد برای هیچ کدام از باکتریها معنی دار نمی باشد (به استثنای غلظت ۱۵۰۰۰ ppm برای*S. aureus* در مرحله گلدهی). ثانیاً، هیچ کدام از عصاره ها بر باکتری *P. aeruginosa* اثر بازدارندگی نداشتند(جداول ۱تا۳).

بررسی قطر هاله ممانعت از رشد حاصل از تأثیر غلظتهای مختلف عصاره ریشه در هر یک از مراحل رشد و نمو بر روی هر باکتری و سپس مقایسه باکتریها با هم نشان داد که غلظت۱۵۰۰۰ ppm مناسب‌ترین غلظت جهت بازدارندگی از رشد برای کلیه باکتریها می باشد. بنابراین در مراحل بعد برای مقایسه اثر بازدارندگی عصاره بین باکتریهای مختلف این غلظت مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱- مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد پنج باکتری مختلف که تحت تأثیر غلظتهای مختلف از عصاره ریشه در مرحله رویشی (داده ها میانگین سه تکرار می باشد) .

عصاره ریشه در مرحله رویشی (mg/l)	قطر هاله ممانعت از رشد (mm)				
	S. aureus	*P. mirabilis*	*E. coli*	*P. aeroginosa*	*K. pneumoniae*
۵۰۰۰	۱۲/۳۳	۱۲/۵۳	۱۱	۶/۵	۸/۶۶
۱۰۰۰۰	۱۴/۶۶	۱۲/۶۶	۱۲	۶/۵	۸/۸۳
۱۵۰۰۰	۱۹	۱۲/۶۶	۱۲/۳۳	۶/۵	۹/۲۰
۲۰۰۰۰	۱۶/۶۶	۱۲/۶۶	۱۲/۳۳	۶/۵	۹/۴۰
شاهد متانول	۶/۵	۶/۵	۶/۵	۶/۵	۶/۵

جدول ۲- مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد پنج باکتری مختلف که تحت تأثیر غلظتهای مختلف ازعصاره ریشه در مرحله گلدهی ایجاد شدند(داده ها میانگین سه تکرار می باشد).

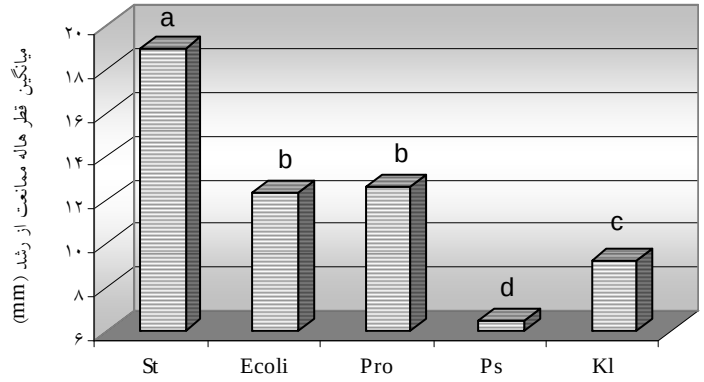
عصاره ریشه در مرحله گلدهی (mg/l)	قطر هاله ممانعت از رشد (mm)				
	S. aureus	*P. mirabilis*	*E. coli*	*P. aeroginosa*	*K. pneumoniae*
۵۰۰۰	۱۱/۰۱	۸/۵	۷/۵	۶/۵	۷
۱۰۰۰۰	۱۱/۰۳	۸/۶۳	۸/۵	۶/۵	۸/۱
۱۵۰۰۰	۱۲	۱۱/۱	۷/۸۳	۶/۵	۷/۶
۲۰۰۰۰	۱۱/۱	۹/۰۳	۷/۵	۶/۵	۷/۱۳
شاهد متانول	۶/۵	۶/۵	۶/۵	۶/۵	۶/۵

جدول ۳- مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد پنج باکتری مختلف که تحت تأثیر غلظتهای مختلف از عصاره ریشه در مرحله رسیدگی بذر ایجاد شدند(داده ها میانگین سه تکرار میباشد).

عصاره ریشه در مرحله رسیدگی بذر(mg/l)	قطر هاله ممانعت از رشد (mm)				
	S. aureus	*P. mirabilis*	*E. coli*	*P. aeroginosa*	*K. pneumoniae*
۵۰۰۰	۱۲/۳۳	۸/۶۶	۸	۶/۵	۸
۱۰۰۰۰	۱۴/۱۶	۸	۸/۲	۶/۵	۸/۴
۱۵۰۰۰	۱۴/۶۶	۹/۱۱	۸	۶/۵	۸
۲۰۰۰۰	۱۴/۲۶	۹/۰۶	۸/۳	۶/۵	۸/۱۲
شاهد متانول	۶/۵	۶/۵	۶/۵	۶/۵	۶/۵

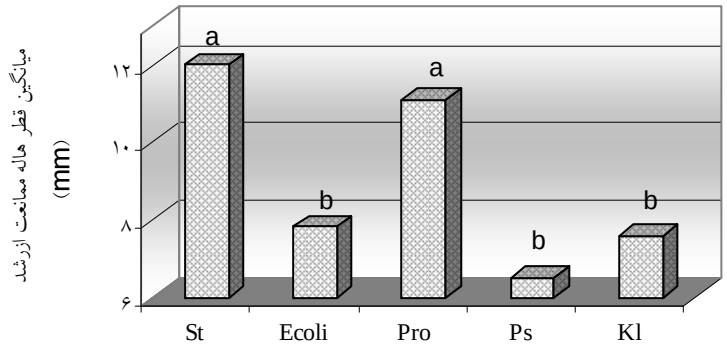
www.SID.ir

Archive of SID



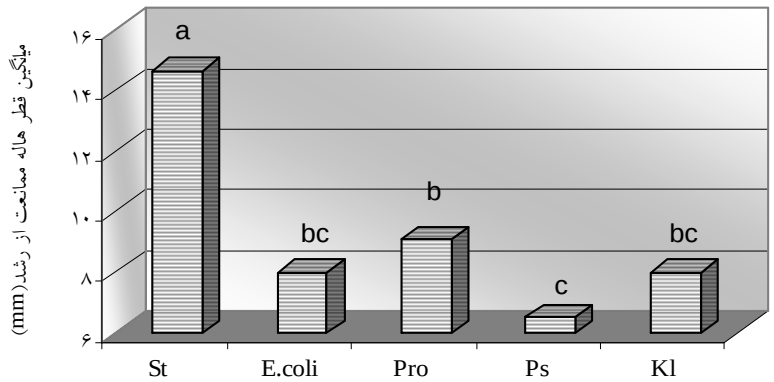
نمودار ۱ – مقایسه اثر باز دارندگی عصاره ریشه(غلظت۱۵۰۰۰) در مرحله رویشی برپنج باکتری مختلف بایکدیگر (ستونهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).

Kl= *K. pneumonica* Ps= *P. aeruginosa* Pro = *P .mirabilis* St= *S. aureus*



نمودار ۲ – مقایسه اثر باز دارندگی عصاره ریشه(غلظت۱۵۰۰۰) در مرحله گلدهی برپنج باکتری مختلف بایکـدیگر (سـتونهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).

Kl= *K .pneumonica* Ps= *P. aeruginosa* Pro = *P.mirabilis* St= *S. aureus*



نمودار۳ – مقایسه اثر باز دارندگی عصاره ریشه(غلظت۱۵۰۰۰) در مرحله رسیدگی بـذر بـرپنج بـاکتری مختلـف بایکـدیگر (سـتونهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).

Kl= *K. pneumoniae* Ps= *P. aeruginosa* Pro =*P . mirabilis* St= *S. aureus*

www.SID.ir

ب- مقایسه اثر عصاره ریشه(ppm ۱۵۰۰۰) در مرحله رویشی بر مهار رشد پنج باکتری مختلف با یکدیگر: آنالیز داده ها نشان داد که غلظتppm ۱۵۰۰۰ از عصاره ریشه در مرحله رویشی بیشترین اثربازدارندگی را بر *S. aureus* داشته است که تفاوت آن با دیگر باکتریها معنی‌دار بود. پس از آن بیشترین اثربازدارندگی را بر*P. mirabilis* و *E. coli* داشت که تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند ولی تفاوت آنها با *K. pneumoniae* و بر*P. aeruginosa* معنی‌دار بود (جدول ۱ و نمودار۱). با توجه به آنالیز آماری داده‌ها می‌توان اثر بازدارنده عصاره را بر رشد باکتریها به صورت زیربا هم مقایسه کرد:

S. aureus > P. mirabilis= E. coli> K. pneumoniae> P. aeruginosa

پ - مقایسه اثر ممانعت از رشد عصاره ریشه(ppm ۱۵۰۰۰) در مرحله گلدهی بر پنج باکتری مختلف با یکدیگر: مقایسه میانگینهای قطر هاله ممانعت از رشد و تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها مشخص کرد اثر بازدارندگی غلظتppm ۱۵۰۰۰ از عصاره ریشه در مرحله گلدهی در مورد *S. aureus* و *P. mirabilis* بیشتر از سایر باکتریها می باشد که تفاوت آنها با هم معنی‌دار نبود ولی نسبت به دیگر باکتریها معنی‌دار بود (جدول ۲ و نمودار۲). اثر بازدارنده عصاره را بر رشد باکتریها می توان به صورت زیر خلاصه کرد:

S. aureus = P. mirabilis> E. coli= K. pneumoniae= P. aeruginosa

ت - مقایسه اثر ممانعت از رشد عصاره ریشه در مرحله رسیدگی بذر بر پنج باکتری مختلف با یکدیگر: آنالیز داده ها نشان داد که غلظتppm۱۵۰۰۰ از عصاره ریشه در مرحله رسیدگی بذر بیشترین اثربازدارندگی را روی *S. aureus* داشته است که تفاوت آن با دیگر باکتریها معنی دار بود. بین اثربازدارندگی عصاره بر *P. mirabilis*و *K. pneumoniae* و*E. coli* تفاوت معنی داری وجود نداشت (جدول ۳ و نمودار۳). بنابراین به طور خلاصه می توان نوشت:

S. aureus > P. mirabilis= E. coli= K. pneumoniae= P. aeruginosa

ث – بررسی تأثیر مراحل رشد برخاصیت ضد باکتریایی عصاره ریشه: مقایسه تأثیر بازدارنده عصاره ریشه که در سه مرحله مختلف از رشد و نمو گیاه برداشت شده بودند نشان داد که برای همه باکتریهای مورد مطالعه (به استثنای *P. aeruginosa* که عصاره اثر بازدارنده بر آن نداشت)، بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به مرحله رشد رویشی بود که در اغلب موارد با سایر مراحل زندگی گیاه تفاوت معنی‌داری داشت (نمودارهای ۴ تا ۷). درمورد باکتری *K. pneumoniae* اگرچه اثر بازدارندگی عصاره ریشه در مرحله رشد رویشی بیشتر از دیگر مراحل بود ولی تفاوت بین آنها معنی دار نبود.

ج- مقایسه تأثیر ضد باکتریایی عصاره ریشه در مراحل مختلف رشد و نمو با تأثیر بازدارنده آنتی بیوتیکها: تجزیه وتحلیل آماری داده ها نشان داد که در مورد باکتری *S. aureus* اثربازدارندگی عصاره ریشه در مرحله رویشی بر*S. aureus* به طور معنی‌داری از اثربازدارندگی پنی‌سیلین براین باکتری بیشتر بود. همچنین اثر بازدارندگی این عصاره با تأثیر تتراسیکلین تفاوت معنی‌داری نداشت وبا آن قابل مقایسه بود. به علاوه اثر بازدارندگی عصاره ریشه در مرحله رسیدگی بذر برای این باکتری مشابه با پنی‌سیلین بود (نمودار۴).

در مورد باکتری *E. coli*، تأثیر بازدارنده عصاره ریشه در مرحله رویشی مشابه با آمپی‌سیلین بود. تتراسایکلین و پنی‌سیلین بر این باکتری اثر بازدارندگی نداشتند (جداول ۱، ۲، ۳ و ۴ و نمودار ۵).

برای باکتری *P. mirabilis* اثربازدارندگی آمپی‌سیلین وپنی‌سیلین به طور معنی‌داری بیشتر از عصاره ریشه در مرحله رویشی بود، در حالی که اثر بازدارندگی عصاره

www.SID.ir

Archive of SID

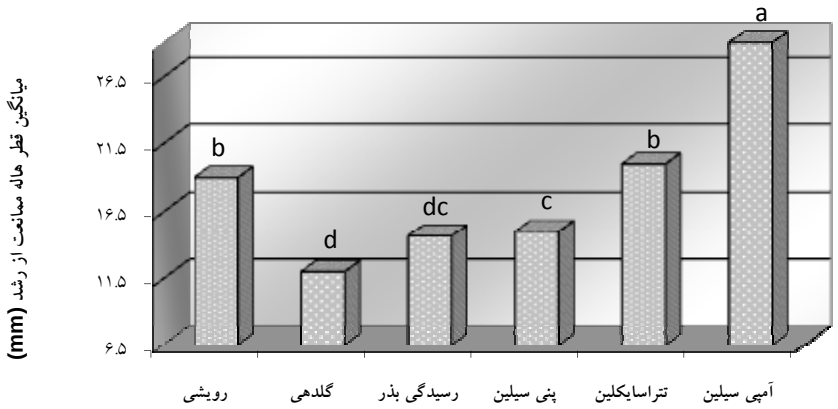
ریشه در این مرحله از اثر آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین که بر این باکتری اثری نداشت، بیشتر بود. (جداول ۱، ۲، ۳ و ۴ و نمودار ۶).

بیشتر بود. ولی تأثیر عصاره ریشه در مرحله رویشی از پنی سیلین و آمپی سیلین که بر این باکتری اثر بازدارندگی نداشتند، بیشتر بود. (جداول ۱، ۲، ۳ و ۴ و نمودار۷).

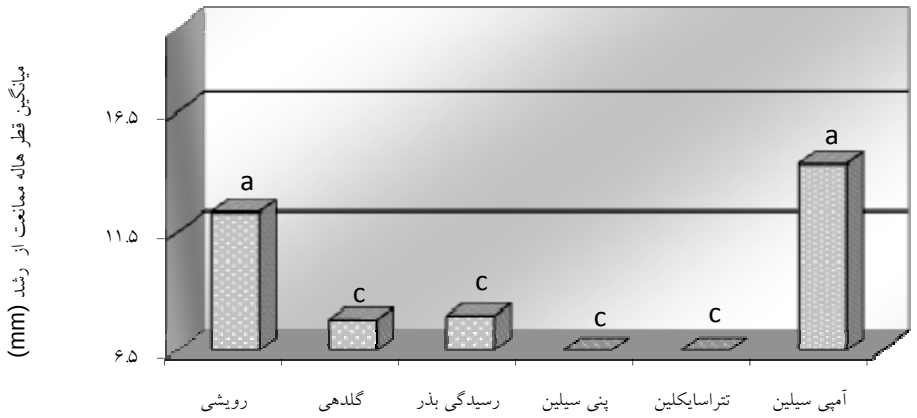
در مورد *K. pneumoniae* اثربازدارندگی تتراسایکلین از عصاره ریشه در همه مراحل رشد ونمو به طور معنی‌داری

جدول ۴- میانگین قطر هاله ممانعت از رشد باکتریها در اثر آنتی بیوتیکهای پنی سیلین ،آمپی سیلین وتتراسیکلین (داده ها میانگین سه تکرار می باشد).

نوع آنتی بیوتیک	قطر هاله ممانعت از رشد (mm)				
	S. aureus	*P. mirabilis*	*E. coli*	*P. aeroginosa*	*K. pneumoniae*
پنی سیلین	۱۵	۱۵/۶۷	۶/۵	۶/۵	۶/۵
آمپی سیلین	۲۹	۲۲/۶۷	۱۴/۳۳	۶/۵	۶/۵
تتراسیکلین	۲۰	۶/۵	۶/۵	۶/۵	۱۳/۲۵



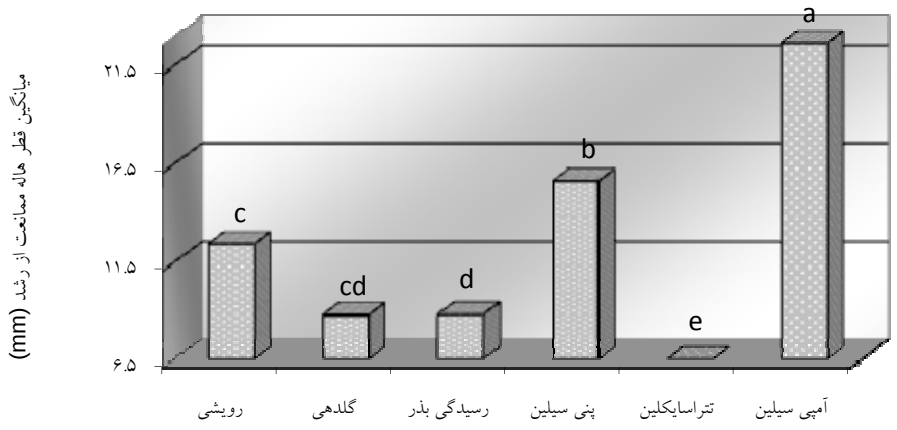
نمودار ۴ – مقایسه اثر بازدارندگی عصاره ریشه (ppm غلظت ۱۵۰۰۰)در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی‌بیوتیکها برروشد باکتری *S. aureus* (ستونهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).



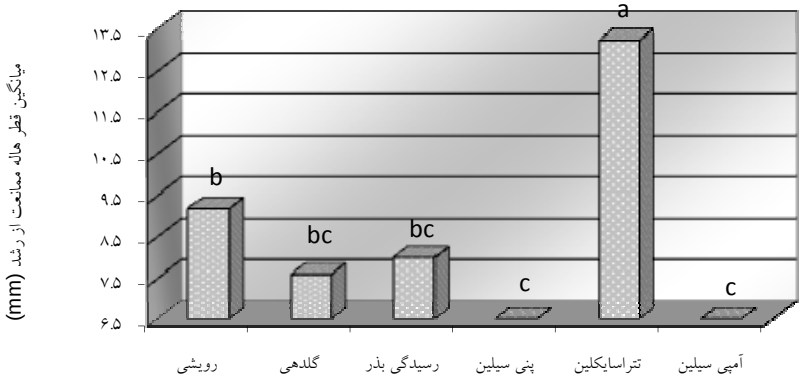
نمودار۵ – مقایسه اثر بازدارندگی عصاره ریشه(ppm غلظت ۱۵۰۰۰)در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی‌بیوتیکها برروشد باکتری *E coli*.(ستونهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۶- مقایسه اثر بازدارندگی عصاره ریشه(ppm غلظت ۱۵۰۰۰)در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی‌بیوتیکها بررشد باکتری *P. mirabilis* (ستونهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).



نمودار۷- مقایسه اثر بازدارندگی عصاره ریشه(ppm غلظت ۱۵۰۰۰)در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی‌بیوتیکها بررشد باکتری *K. pneumoniae*(ستونهای دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).

بحث

در رابطه با خواص ضدمیکروبی جنس Salvia گزارشات متعددی وجود دارد. به عنوان مثال *S. lanigeral* به علت داشتن ماده ای به نام lanigerol دارای اثر ضد میکروبی بر باکتریهای گرم مثبت می‌باشد(۱۰). فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی برگ وگل *S. partensis* ، *S. glutinosa* ، *S. acthapis* نیز گزارش شده است(۲۴). Gulcin و همکاران (۲۰۰۴) اثر ضد میکروبی قوی *Salvia sclarea* را بر *S. aureus* و انواع دیگری از باکتریها نشان دادند(۱۲). اگر چه تحقیقات انجام شده بر گونه های مختلف جنس *Salvia* و گیاه نوروزک اثبات کرده است که ریشه و برگ این گیاهان دارای خواص ضد میکروبی هستند ولی در هیچ کدام از این تحقیقات مشخص نشده است که آیا این خاصیت در مراحل مختلف رشد ونمو تغییر می‌کند و در این صورت در کدام مرحله از مراحل رشد و نمو گیاه ، بیشترین خاصیت ضد میکروبی در ریشه و برگ وجود دارد.

تحقیق حاضر با هدف پاسخگویی به این پرسش مهم صورت گرفت و نشان داد که خاصیت ضدمیکروبی در این گیاه به شدت و به طور معنی داری تحت تأثیر مرحله رشد و نمو گیاه قرار دارد به عنوان مثال زمانی که گیاه در مرحله

www.SID.ir

Archive of SID

رشد رویشی است، عصاره متانولی ریشه آن بیشترین اثر بازدارندگی را بر تمام باکتریهای مورد مطالعه به جز *P aeruginosa*. دارد واین بازدارندگی در بیشتر موارد با عصاره ریشه برداشت شده در سایر مراحل یعنی مرحله گلدهی و مرحله رسیدگی بذر تفاوت معنی‌داری نشان می دهد. از میان باکتریهای مورد بررسی تأثیر بازدارندگی عصاره ریشه در مرحله رویشی بر باکتری *S. aureus* بسیار چشمگیر می‌باشد و به طور معنی‌داری بیشتر از پنی‌سیلین است. در مرحله گلدهی و رسیدگی بذر نیز خاصیت ضد باکتریایی ریشه بر این باکتری با اثر بازدارندگی پنی‌سیلین قابل قیاس می‌باشد .

اثر بازدارندگی عصاره ریشه بر روی میکروبها با تحقیقات ulbelen مطابقت دارد، براساس تحقیقات وی ریشه گیاه *Salvia forskablace* اثر بازدارندگی بر روی *P. mirabilis,* *S. aureus*و *E. coli* و *Bacillus subtilis* دارد (۲۵).

جبارزاده (۱۳۷۸) نیز نشان داد که ریشه نوروزک برروی *S. aureus* و *E. coli* اثر بازدارنده دارد. گزارشهایی در مورد خاصیت آنتی اکسیدانی برگ و ریشه نوروزک وجود دارد. همچنین ارتباط این خاصیت با وجود ماده بوتئین از ترکیبات فلاونوئیدی (شالکونی) به اثبات رسیده است(۶، ۱۱، ۱۳) تحقیقات نشان داده است که برخی شالکونها دارای خواص دارویی از جمله فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی هستند (۲۰). بنابر این احتمال دارد که خاصیت ضد میکروبی ریشه این گیاه مربوط به حضور ترکیبات فلاونوئیدی در آن باشد. گزارشهایی دال بر تأثیر بازدارندگی قوی ترکیبات فلاونوئیدی بر روی باکتریهای گرم مثبت وجود دارد(۱۷). همچنین حبیبی وهمکاران در سال۱۳۷۷ ترکیب فلاونوئیدی ۵-هیدروکسی۴و۶و۷-تری‌متوکسی فلاون(I) را از نوروزک استخراج و ساختار آن را شناسایی کرده‌اند(۲). بنابراین تأثیر عصاره‌های ریشه بر روی باکتریهای گرم مثبت(*S. aureus*) منطقی به نظر می‌رسد. اثر بازدارندگی قوی بر باکتریهای گرم‌مثبت می‌تواند ناشی از آن باشد که ساختمان دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی دارای لایه های لیپوپروتئین، فسفولیپید(غشای خارجی) ولیپوپلی ساکاریدی است در حالی که باکتریهای گرم‌مثبت فاقد این ساختمان می باشند. وجود این لایه ها که با جاذبه هیدروفوبیکی به هم اتصال دارند سبب عدم نفوذ مولکولهای درشت مثل بعضی آنتی بیوتیکها و میکروب کشها در آنها شده و باعث مقاوم شدن باکتریهای گرم منفی می گردد (۱۹). تغییر خاصیت ضد میکروبی ریشه در مراحل مختلف رشد ونمو می‌تواند به دلیل تغییر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی یا اشکال فعال آنها (۱۸) باشد. بنابراین، احتمالاً میزان بالای ترکیبات فلاونوئیدی ریشه در مرحله رشد رویشی تا رسیدن به مرحله گلدهی کاهش تدریجی داشته و نهایتاً در مرحله رسیدگی بذر دوباره افزایش می یابد. با توجه به اینکه در مورد تمام باکتریهای مطالعه شده در این تحقیق عصاره ریشه در مرحله رویشی بیشترین تأثیر ضد باکتریایی را داشته است به نظر می‌رسد که، بهترین زمان بهره برداری از خاصیت ضد میکروبی ریشه گیاه ، اسفند ماه باشد. از طرف دیگر در این بررسی مشخص شد که سویه های وحشی مورد مطالعه که مستقیماً از بیماران تهیه شده بودند، نسبت به برخی آنتی بیوتیکهای مورد مطالعه مقاوم هستند ، برای مثال پنی‌سیلین و تتراسیکلین بر روی *E. coli* و پنی‌سیلین و آمپی سیلین بر روی *K. pneumoniae* بی اثر بودند و همچنین پنی‌سیلین بر روی *S. aureus* اثر کمی نشان داد، در حالی که عصاره ریشه گیاه که در اسفند ماه برداشت شده بود بر روی این باکتری کاملاً مؤثر بوده و اثر بازدارندگی آن به طور معنی‌داری بیشتر از این آنتی بیوتیکها بود. لذا به نظر می‌رسد که با توجه به فرآیند مقاوم شدن برخی سویه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای سنتزی رایج ، لزوم استفاده از ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی که برای مثال در عصاره ریشه مرحله رویشی این گیاه وجود دارد، ارزشمند باشد، که البته این امر پژوهشهای دقیق تر وکامل تری را در این زمینه می طلبد.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی: از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطرتأمین هزینه مالی این پژوهش وهمچنین از همکاری سرکار خانم پردلی در آزمایشگاه میکروبیولوژی تشکر وقدردانی می گردد.

منابع

۱- باغی، ن.، ۱۳۷۵. بررسی اثرات ضد میکروبی گیاه نوروزک. پایان نامه برای دریافت دکترای داروسازی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، صفحه: ۳۴-۳۱.

۲- حبیبی، ز. و روستائیان، ع.، ۱۳۷۷. بررسی شیمیایی سالویا لریفولیا. مجموعه خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره شیمی ومهندسی شیمی ایران – شیمی آلی، دانشگاه تهران، صفحه: ۲۵.

۳- جبارزاده، م.، ۱۳۷۸. بررسی خواص ضد میکروبی عصاره های ریشه و دانه‌ی گیاه نوروزک. پایان نامه برای دریافت دکترای داروسازی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، صفحه: ۵۶-۵۴.

۴- شکوهی زاده، ح.، ۱۳۷۵. مطالعهٔ اثرات پایین آورندگی قند خون برگ ودانهٔ نوروزک بر موش سفید کوچک. پایان نامه برای دریافت دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی, دانشگاه علوم پزشکی مشهدصفحه: ۶۷-۶۵.

۵- طباطبائی یزدی، ف.، ۱۳۷۴. بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس وعصاره برگ گیاه نوروزک و شناسایی فیتوشیمیایی آن. پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته شیمی، صفحه ۷۸ -۷۵.

۶- فرهوش، ر.، ۱۳۸۲. استخراج، تخلیص و شناسایی فراکسیون عمده آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه نوروزک و بررسی خصوصیات آن. پایان نامه دکتری(PhD)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.۱۷۲ صفحه.

۷- مدرس، م.، ۱۳۸۶. مطالعه رویداد شناسی (phenology) و برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نوروزک (*salvia leriifolia* Benth.). پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۷۵صفحه.

8- Anto, R.J., Sukumaran, K., Kutta, G., Rao, M.N.A., Subbaraju, V. and Kuttan, R., 1995. Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds. Cancer Letters, 9: 33-37.

9-Cappuccino G. J., Sherman N., 1996. Microbiology: a laboratory manual , 4th ed. The Benjamin/ Cumming publishing company. Inc:72-77.

10- Eakany E. L., Abdalla M., Abdel K. M., Abri N. N., Frank R. and Stermit Z. 1995. Lanigerola new antimicrobial icetexane diterpen from Salvia lanigera. Planta medicin. Vol. 61: 559-560.

11- Farhoosh, R., Purazrang, H., Haddad Khodaparast, M.H., Rahimizadeh, M., Seyedi, S.M., 2004. Extraction and separation of Antioxidative Compounds from *Salvia leriifolia* Leaves. Journal of Agricultural Scientist Technology, 6: 43-50.

12- Gulcin T., Uguz I., Oktay M. M., Beydemiv S. and Kufrevioglu O. I. 2004. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of alary sage (*Salvia sclarea* L.),Turkian Journal Agricalcheral. Vol. 28: 25-33.

13- Hadad Khodaparast, M.H., Haghdoost, A., Elhami-Rad, A.H., Movahhed, G. and Karazhiyan, H., 2006. Antioxidant activity and thermal Properties of *salvia leriifolia* (Norozak) root extract. Proceedings of the international conference on Innovations in Food and Bioprocess Technologies, 12-14 December 2006, AIT, Pathumthani, Thailand, Pages: 378-383.

14- Hosseinzadeh, H. and Yavary, M., 1999. Anti-inflammatory effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice and rat. Pharmaceutical and Pharmacological Letters, 9(2): 60-61.

15- Hosseinzadeh, H., Haddad Khodaparast, M.H. and Hosseini, E., 2000. Anti-ulcer effect of *Salvia leriifolia* Benth leaf extract in mice. Pharmaceutical and Pharmacological Letters, 10(2): 63-64.

16- Hosseinzadeh, H. and Lary, P., 2000. The effect of *Salvia leriifolia* Benth root extracts on morphine dependence in mice. Phytotherapy Research, 14(5): 384-387.

17- Inatani R., Nakatani N. and Fuwa H. 1983. Antioxidant effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. Agricalcheral Biology Chemistry. Vol. 47: 521-528.

18- James L., Luteyn Jeffrey B., Harborne C. and Williams A.1980. A Survey of the Flavonoids

www.SID.ir

Archive of SID

and Simple Phenols of Cavendishia. Brittonia. Vol. 32,: pp. 1-16

19- Jawetz E. and Melnick J. L. 1991. Medical microbiology. 19th ed. 145-155.

20- Keiichi S., Tetsuya T., Fumio H. and Yusuke S. 2005. *In vitro* propagation of sterile mutant strains in Japanese morning glory by sub-culturing embroils derived from an immature embryo. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. Vol. 74: 311-317.

21- Larson, L., 1998. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry, 27: 969-978.

22- Rechinger, K.H., 1982. Flora Iranica. N.150 Labiatae. Tab 582 (Tabulate). Graz-Austeria: Academische Druk-u.Verlagsantalt. 439 p.

23- Sadeghnia, H.R., Nassiri Asl, M., Haddad Khodaparast, M.H. and Hosseinzadeh, H., 2003. The effect of *Salvia leriifolia* Benth root extracts on lipid peroxidation during global ischemic-reperfusion in rats. Journal of Medicinal Plants, 7: 19-28.

24- Savelev S. U., Okeiio E. J. and Perry E. K. 2004. Butyryl and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. Phytotherapy Research. Vol. 18: 315-324.

25- Ulubelen A., Topcu G. and Johansson C. B. 1996. Anabietan diterpene and two phenolic from *Salvia forskablec*. Phytochemistry: 42,45. from chemistry. Abstract:124:312272.

26- Wu, J.W., Lee, M.H. , Ho, C.T. and Chang, S.S. 1982. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. Journal of American Oil Chemistries Society, 59: 339-345.

Antibacterial activity of *Salvia leriifolia* Benth. root extract in different stages of growth and development

Modarres M. and Abrishamchi P.

Biology Dept., Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of IRAN

Abstract

Salvia leriifolia (Lamiaceae) is an endemic plant of Khorasan and Semnan province with antinociceptive, anti-inflammatory, antidiabetic and antioxidant properties. In this research, antibacterial activity of S. leriifolia root was investigated at different stages of growth and development and finally the best of harvesting time maximum antibacterial activity was determined. For this purpose, plant roots were harvested at vegetative (mid March), flowering (mid April) and ripening seed phases (late May). Different concentrations of metanolic extract (5000, 10000, 15000 and 20000 ppm) of roots were applied on five different bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*) according to disk diffusion method. Inhibition zones were measured after 24 hours. Inhibitory effect of extracts at different stages were compared together and with compared certain antibiotics (Penicillin, Ampicilin and Tetracaiclin). Statistical analysis was performed according to the JMP software. The results showed that *S.aureus* and *P.aeruginosa* were the most sensitive and the most resistant bacteria, respectively. Maximum antibacterial activity of root was coincident with vegetative phase. In this phase, antibacterial activity of root was significantly higher than the flowering and ripening seed phases. Inhibitory effect of root extract at vegetative phase on *S.aureus* was higher than Penicillin and similar with tetracaiclin. Therefore, it seems that at vegetative phase (March) is the best time for obtaining the maximum antioxidant activity of root.

Keywords: *Salvia leriifolia*, antibacterial activity, root, growth and development.

www.SID.ir