Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره دوم، اردیبهشت ۹۵
صفحه ۲ الی ۱۱

مقاله پژوهشی
(Original Article)

ارزیابی اثرات مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* علیه برخی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت در شرایط آزمایشگاهی

اعظم مهربان[۱]، محمدرضا عدالتیان دوم[۱*]، محمدحسین حداد خداپرست[۱]، معصومه مهربان سنگ آتش[۲]

چکیده

زمینه و هدف: گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به افزایش تمایل به توسعه ترکیبات جدید آنتی‌میکروبی مؤثرتر و بدون سمّیت شده است. در این مطالعه اثرات مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا (Salvia chorasanica)* علیه *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی* و *اشرشیاکلی* O157 بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه از آزمون انتشار دیسک به روش کربی - بوئر جهت ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی استفاده گردید. در این روش، باکتری در محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت چمنی کشت داده شد. جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی از روش میکرودایلوشن با Elisa و افزودن معرف تری‌فنیل تترازولیوم کلراید استفاده گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن (Duncan) در سطح $p<۰/۰۵$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: بیشترین قطر هاله بازداری در روش انتشار در آگار مربوط به عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی *سالویا خراسانیکا* علیه باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* بود. میزان MIC محاسبه‌شده در مورد عصاره‌های هیدروالکلی بر باکتری‌های گرم مثبت، معادل ۳۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر تعیین شد که این میزان در میان دیگر MICهای اندازه‌گیری‌شده، کمترین مقدار بود.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه، باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت، مقاومت بیشتری در برابر عصاره‌های مختلف اندام هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* از خود نشان می‌دهند، به‌طوری‌که باکتری *سالمولا تیفی* به‌عنوان مقاوم‌ترین باکتری در میان باکتری‌های موردآزمون شناخته شده است.

کلید واژه‌ها: عامل ضدباکتریایی؛ آزمون ضدمیکروبی انتشار در دیسک؛ آزمون انتشار در دیسک کربی – بائور؛ اندام هوایی *سالویا خراسانیکا*؛ عصاره سالویا؛ میکرودایلوشن.

[۱]گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[۲]گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
محمدرضا عدالتیان دوم، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
edalatian@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱۲

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Mehraban A, Edalatian Dovom MR, Haddad Khodaparast MH, Mehraban Sang Atash M. Evaluation of inhibitory and lethal effects of aqueous, ethanolic and hydroalcoholic extracts of aerial parts of *Salvia chorassanica* against some gram-negative and gram-positive bacteria in vitro. Qom Univ Med Sci J 2016;10(2):2-11.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:15 IRDT on Monday June 13th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:15 IRDT on Monday June 13th 2016

مقدمه

با توجه به تأکید سازمان بهداشت جهانی بر حذف افزودنی‌های شیمیایی از صنایع غذایی، گیاهان دارویی گزینه‌های مناسبی برای استفاده در صنایع غذایی به‌عنوان نگهدارنده می‌باشند. همچنین افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و یا عدم رعایت دوز توصیه‌شده توسط بیماران منجر به گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها شده است که این امر خود موجب افزایش تمایل به توسعه ترکیبات جدید ضدمیکروبی مؤثرتر و بدون سمّیت می‌شود. در سالهای اخیر با بررسی متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از نظر اثرات ضدمیکروبی، مشخص شده است اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج‌شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضدمیکروبی هستند (۲،۱). از طرفی، ایمنی مواد غذایی و سلامت آن، یک نگرانی اساسی و مهم برای مصرف‌کننده و تولیدکننده در عرصه صنعت غذا می‌باشد، به‌ویژه اینکه آمار عفونت‌ها و مسمومیت‌های ناشی از مصرف مواد غذایی، روند رو به افزایشی را نشان می‌دهد (۳).

سالیان متمادی است که از گیاهان خانواده نعناع به‌عنوان دارو استفاده می‌شود. در استان خراسان، ۳۰ جنس و بیش از ۱۰۰ گونه از گیاهان خانواده نعناع موجود است که تاکنون از میان آنها حداقل ۱۵جنس به‌عنوان دارو شناخته شده‌اند. امروزه، با تحقیقات انجام‌شده مشخص شده است گیاه سالویا دارای خواص درمانی مهمی است. تعدادی از گونه‌های سالویا حاوی مونوترپن‌هایی با خاصیت ضدعفونی‌کننده هستند. برخی گونه‌های این جنس نیز به‌عنوان ضدباکتری، ضدمیکروب، ضددیابت و آنتی‌اکسیدان به کار می‌روند (۴). تحقیقات شیمیایی پیشین بر گونه‌های مختلف سالویا نشان داده‌اند حضور ترکیباتی مانند فلاونوئیدها، تری‌ترپنوئیدها و اسانس‌های روغنی باعث ایجاد فعالیت‌های ضدتوموری، ضدمیکروبی، سیتوتوکسیک و ضدالتهاب در این گیاه می‌شود (۵).

اگرچه مطالعات زیادی بر روی ترکیبات و خصوصیات ضدباکتریایی عصاره‌های گیاهی انجام شده، اما جزئیات مکانیسم عمل آنها به‌طور کامل بررسی نشده است. ساختمان شیمیایی هریک از ترکیبات عصاره‌ها بر طرز عمل و فعالیت ضدباکتریایی آنها تأثیر می‌گذارد (۶).

Sivropoulou و همکاران (سال ۱۹۹۷)، فعالیت ضدمیکروبی و ضدویروسی اسانس مریم‌گلی (*Salvia fructicosa*) را بررسی کردند. در این تحقیق اسانس این گیاه به‌وسیله کروماتوگرافی گازی یا اسپکترومتری جرمی تجزیه شد که ترکیبات عمده آن شامل: ۱ و ۸ سینئول، توجون (Thujone) و کامفور (Camphor) بود. در این مطالعه سینئول و توجون دارای خاصیت ضدمیکروبی در برابر گونه‌های باکتریایی مورد بررسی (*E. coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Salmonella typhimurium*، *Staphylococcus aureus*، *Rhizobium leguminosarium* و *Bacillus subtillis*) بودند، همچنین با توجه به اینکه کامفور تقریباً در برابر همه این باکتری‌ها غیرفعال بود، اما در رقت ۲۵۰ppm، اثر باکتریوسیدی داشت و در رقت ۱۰۰۰ppm نیز موجب کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها شده بود (۷).

باکتری لیستریا مونوسیتوژنز، عامل بیماری لیستریوز بوده که از بیماری‌های مشترک انسان و حیوان می‌باشد و مهم‌ترین عامل انتقال این گونه مواد غذایی است (۸). اسپورهای *باسیلوس سرئوس* موجود در مواد غذایی و دانه‌ها، به‌خصوص برنج در برابر بخاردادن و حرارت کم مقاوم بوده و هنگامی‌که برنج برای ساعات زیادی گرم نگه داشته شود (مانند گرم کردن مکرر برنج و نگه داشتن در گرمخانه آشپزخانه‌ها) جوانه می‌زند. راه ورود اسپور به بدن از راه گوارش است. این باکتری مولد انتروتوکسین‌های مولد اسهال و تهوع بوده و قادر به ایجاد سندرم اسهال و تهوع می‌باشد (۹). همچنین *سالمونلا تیفی* در روده انسان و حیوان زندگی می‌کند و از طریق غذا (مواد آلوده به فضولات حیوانی یا گوشتی که خوب پخته نشده باشد) قابل‌انتقال است، در نتیجه آلودگی به این باکتری فرد را مستعد ابتلا به اسهال، تب و گرفتگی عضلات می‌کند. سالمونلا می‌تواند کشنده نیز باشد. باکتری *اشرشیاکلی* به‌صورت عادی در دستگاه گوارش انسان زندگی کرده و معمولاً بیماری‌زا نیست، ولی سویه‌های خاصی از این باکتری تحت شرایط خاص می‌توانند بیماری‌های مختلفی ایجاد کنند. برخی از *اشرشیاکلی‌ها* باعث اسهال خونی، ناراحتی‌های کلیوی و عفونت مجاری ادراری می‌شوند (۱۰). این پژوهش با هدف بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام هوایی *سالویا خراسانیکا* علیه

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:15 IRDT on Monday June 13th 2016

باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* (ATTC 7644)، *باسیلوس سرئوس* (PTTC 1247)، *سالمونلا تیفی* (PTTC1609) و *اشرشیاکلی* O157، (ATCC 12900) انجام شد.

روش بررسی

گیاه *سالویا خراسانیکا* در بهار سال ۱۳۹۳ از ارتفاعات منطقه زشک شهرستان مشهد جمع‌آوری شد. سپس با همکاری هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، مورد شناسایی قرار گرفت. اندام‌های هوایی این گیاه پس از خشک‌شدن در شرایط مناسب جهت تهیه عصاره با آسیاب۰(مدل Waring) پودر شدند. در ادامه، برای عصاره‌گیری، به‌طور جداگانه در ارلن‌های حاوی ۵۰ گرم از اندام‌های هوایی پودرشده، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، اتانول ۹۶ درجه و مخلوط آب و اتانول (با نسبت ۸۰:۲۰) اضافه گردید. سپس ارلن‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق بر روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار گرفتند. مایع رویی پس از جمع‌آوری، با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و از صافی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. جهت حذف حلال نیز از دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) استفاده گردید که در نهایت، جهت جلوگیری از اثر نور و گرما، عصاره‌ها در ظروفی استریل با پوشش ورق آلومینیوم تا زمان آزمایش در دمای یخچال نگهداری شدند (۱۱). تمامی آزمایشها با ۳ تکرار انجام گرفت. در ادامه، جهت تعیین وزن خشک عصاره‌ها ابتدا وزن یک لوله آزمایش، تعیین و ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی در آن ریخته شد. سپس محتوی لوله در دمای اتاق خشک گردید. بعد از خشک شدن عصاره، وزن لوله آزمایش مجدداً تعیین گردید. (اختلاف وزن لوله، معادل ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ها است.) میانگین ۳ بار تکرار، به‌عنوان وزن خشک عصاره‌ها محاسبه شد (۱۲).

پس از رشد باکتری بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار شیب‌دار (Muller Hinton Agar Slant) (کشت ۲۴ ساعته)، سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر تهیه گردید. کدورت سوسپانسیون حاصل به‌وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری و تا برابرشدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ استاندارد مک‌فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر)، توسط محلول رینگر رقیق شد (۱۳). اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* با استفاده از روش انتشار در آگار به کمک دیسک (Disk Diffusion Antimicrobial Tests) مورد بررسی قرار گرفت. در این روش ابتدا ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده (معادل ۰/۵ مک‌فارلند) از هر باکتری روی سطح محیط آگار کشت داده شد و به‌وسیله اسپریدر شیشه‌ای استریل بر سطح آگار پخش شد. عصاره‌های آبی با آب مقطر و عصاره‌های اتانولی و هیدروالکلی با دی‌متیل سولفوکساید ۵٪ رقیق، از صافی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شدند. در ادامه، دیسک‌ها را در غلظت‌های ۲۴۰، ۴۸۰ و ۹۶۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر عصاره خیسانده و سپس به‌وسیله پنس استریل با کمی فشار بر سطح محیط کشت ثابت شدند. پتری‌ها نیز به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند، و در نهایت قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر با استفاده از خط‌کش میلی‌متری به‌طور دقیق اندازه‌گیری شد (۱۴). جهت تعیین حداقل غلظت مهارکننده از رشد (Minimum Inhibitory Concentration)، ابتدا غلظت مادر برای عصاره‌های آبی با آب مقطر و عصاره‌های اتانولی و هیدروالکلی تهیه و پس از آن غلظت‌های سریالی عصاره، به ترتیب زیر تهیه گردید. در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای، ابتدا درون همه چاهک‌ها ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث با غلظت مضاعف اضافه شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از اولین و بالاترین غلظت عصاره (غلظتی برابر با ۹۶۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر، تهیه‌شده با استفاده از دی‌متیل سولفوکساید ۵٪ و فیلتر میکروبی با قطر منافذ ۰/۴۵میکرومتر استریل) به چاهک اول اضافه گردید {در این حالت غلظت عصاره در خانه اول به نصف (۴۸۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) کاهش می‌یابد.} در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته شد و به چاهک دوم انتقال یافت. این کار برای همه چاهک‌ها به غیر از چاهک شماره ۱۲ که کنترل مثبت بود انجام گرفت؛ بدین صورت‌که ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک شماره ۱۰ برداشته شد و به چاهک شماره ۱۱ که شاهد و کنترل منفی بود، اضافه گردید. به‌منظور مخلوط شدن کامل عصاره

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:15 IRDT on Monday June 13th 2016

با محیط کشت، در هر مرحله چندین مرتبه سمپلر، پر و خالی شد. در نهایت، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک شماره ۱۱ دور ریخته شد. در مرحله بعد، به تمام چاهک‌ها به غیر از چاهک شماره ۱۱ (کنترل منفی)، ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل ۰/۵ مک‌فارلند (با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی برمیلی‌لیتر) اضافه شد. سپس میزان کدورت اولیه چاهک‌ها پس از اینکه میکروپلیت به مدت ۷ ثانیه در دستگاه Elisa تکان داده شد، در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید و میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از طی زمان لازم، مجدداً میزان جذب یا کدورت چاهک‌ها به‌وسیله دستگاه Elisa قرائت و مقایسه شد.

کمترین غلظت عصاره که مانع رشد باکتری شده بود، به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد. تیمارها در ۳ تکرار انجام شدند (۱۶،۱۵،۱۳). برای تعیین MIC، ۵۰ میکرولیتر محلول ۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر و تری‌فنیل تترازولیوم کلراید به تمامی چاهک‌های پلیت اضافه و پلیت در درمای ۳۷ درجه سانتیگراد به‌مدت ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. یک غلظت بالاتر از آخرین غلظتی که رنگ قرمز تترازولیوم را نشان داد، به‌عنوان MIC باکتری در نظر گرفته شد (۱۷). به‌منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)، ۱۰ میکرولیتر از محتویات خانه‌هایی از میکروپلیت که رنگ قرمز نگرفته بودند بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد.

سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، پلیت‌ها از گرمخانه خارج و نتایج آنها بررسی شد. غلظتی که در آن رشدی مشاهده نگردید، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی یا MBC عصاره برای باکتری موردنظر درنظرگرفته شد (۱۸).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (جهت مقایسه میانگین‌ها) و آزمون دانکن (جهت بررسی اختلاف بین میانگین‌ها) در سطح $p<۰/۰۵$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه میانگین وزن خشک عصاره آبی، ۰/۰۸±۱۲؛ اتانولی، ۰/۱۱±۱۰ و هیدروالکلی ۰/۲۱±۱۴ بود. عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی در غلظت ۹۶۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر، بیشترین اثر بازدارندگی را بر باکتری‌های گرم مثبت و عصاره آبی داشت و در این غلظت بیشترین هاله عدم رشد را علیه باکتری‌های گرم منفی نشان داد. بیشترین هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۹۶۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی بر باکتری *باسیلوس سرئوس بود*. همچنین غلظت‌های ۴۸۰ و ۲۴۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر عصاره‌های اتانولی و هیدروالکلی، هیچ‌گونه اثر ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم منفی مورد آزمون از خود نشان نداد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های مورد آزمون برحسب میلی‌متر در حضور عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* (انتشار در آگار)

نوع عصاره	غلظت	*لیستریا مونوسیتوژنز*	*باسیلوس سرئوس*	*سالمونلا تیفی*	*اشرشیاکلی* (O157)
آبی اندام‌های هوایی	۹۶۰	۱۷/۱۸±۰/۴۵^{a}	۱۵/۱۲±۰/۷۹^{b}	۱۳/۲۱±۰/۳۴^{c}	۱۲/۱۰±۰/۹۱^{d}
	۴۸۰	۱۵/۶۲±۰/۳۴^{b}	۱۲/۱۳±۱/۵۱^{c}	۱۰/۰±۰/۴۳^{d}	۸/۵۲±۰/۷۳^{e}
	۲۴۰	۱۱/۵۱±۰/۴۴^{c}	۱۰/۱۴±۱/۲۳^{d}	۰/۰±۰/۰^{e}	۰/۰±۰/۰^{d}
اتانولی اندام‌های هوایی	۹۶۰	۱۱/۲۳±۰/۵۴^{d}	۱۲/۵۸±۱/۱۷^{e}	۹/۴۱±۰/۵۶^{e}	۹/۸۱±۰/۸۵^{c}
	۴۸۰	۸/۷۳±۰/۱۵^{f}	۸/۱۹±۰/۹۷^{g}	۰/۰±۰/۰^{c}	۰/۰±۰/۰^{e}
	۲۴۰	۰/۰±۰/۰^{g}	۲/۴۲±۰/۹۶^{h}	۰/۰±۰/۰^{c}	۰/۰±۰/۰^{e}
هیدروالکلی اندام‌های هوایی	۹۶۰	۱۸/۸۱±۰/۵۰^{a}	۲۰/۸۱±۱/۵۲^{b}	۱۰/۸۴±۰/۴۲^{c}	۹/۷۴±۰/۶۵^{d}
	۴۸۰	۱۵/۱۲±۰/۷۶^{b}	۱۶/۱۸±۱/۲۹^{d}	۰/۰±۰/۰^{c}	۰/۰±۰/۰^{e}
	۲۴۰	۱۲/۷۱±۰/۱۵^{e}	۱۳/۰±۱/۱۵^{f}	۰/۰±۰/۰^{c}	۰/۰±۰/۰^{e}

*حروف غیرمشابه در یک ستون، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار (در سطح ۵٪) میان اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.

**حروف مشابه در یک ستون، نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار (در سطح ۵٪) میان اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:15 IRDT on Monday June 13th 2016

حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی اندام‌های هوایی *سالویا خراسانیکا* درخصوص تمامی باکتری‌های مورد آزمون، یکسان و معادل ۶۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود. MIC عصاره اتانولی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* درخصوص باکتری‌های گرم مثبت *لیستریا مونوسیتوژنز و باسیلوس سرئوس* با یکدیگر برابر و معادل ۶۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر و برای باکتری‌های گرم منفی *سالمونلا تیفی و اشرشیاکلی* O:157 معادل ۱۲۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر تعیین شد.

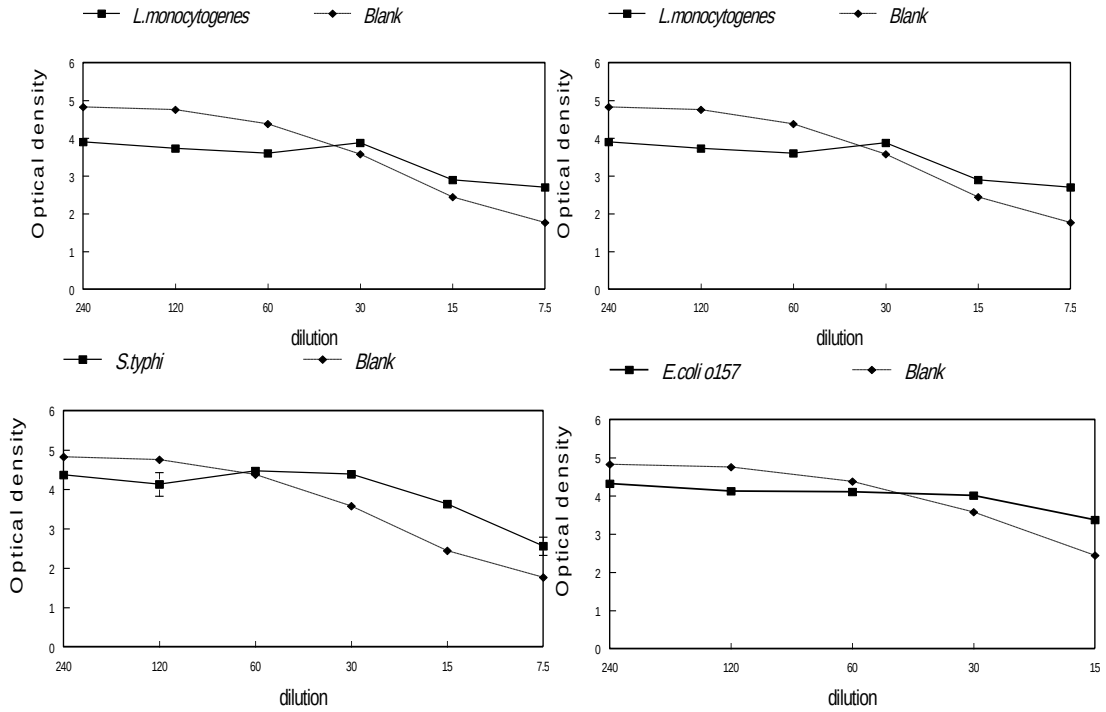
حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* در این روش برای *لیستریا مونوسیتوژنز و* باسیلوس سرئوس معادل ۳۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر، برای باکتری گرم منفی *سالمونلا تیفی* معادل ۱۲۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر و برای *اشرشیاکلی* O:157 معادل با ۶۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر اندازه‌گیری شد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۳: نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* به‌وسیله Elisa (برحسب میلی‌گرم برمیلی‌لیتر)

نوع عصاره	*لیستریا مونوسیتوژنز*	*باسیلوس سرئوس*	*سالمونلا تیفی*	*اشرشیاکلی* (O157)
آبی	^{a}۶۰±۰/۰۶	^{a}۶۰±۰/۰۸	^{a}۶۰±۰/۱۱	^{a}۶۰±۰/۰۶
اتانولی	^{a}۶۰±۰/۰۱	^{a}۶۰±۰/۰۱	^{c}۱۲۰±۰/۰۷	^{c}۱۲۰±۰/۰۴
هیدروالکلی	^{b}۳۰±۰/۰۳	^{b}۳۰±۰/۰۶	^{c}۱۲۰±۰/۰۳	^{a}۶۰±۰/۰۶

حروف غیرمشابه در یک ستون، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار (در سطح ۵٪) میان اثر ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف می‌باشد.

جهت تعیین محدوده MIC عصاره‌ها از رسم نمودار به‌وسیله نرم‌افزار اسلاید رایت (Slide Write Plus) استفاده شد. (نمودارهای شماره ۳-۱). محدوده اثر ضدباکتریایی عصاره‌های مورد نظر در این نمودارها براساس محل تلاقی نمودار کدورت مربوط به تیمار (میکروارگانیسم، عصاره و محیط کشت) با نمودار کدورت مربوط به شاهد (عصاره و محیط کشت) مشخص می‌شود. محدوده بین قرارگرفتن نمودار رشد باکتری زیر نمودار نمونه شاهد (نمونه بدون باکتری) تا نقطه تلاقی دو نمودار، محدوده MIC عصاره خواهد بود.

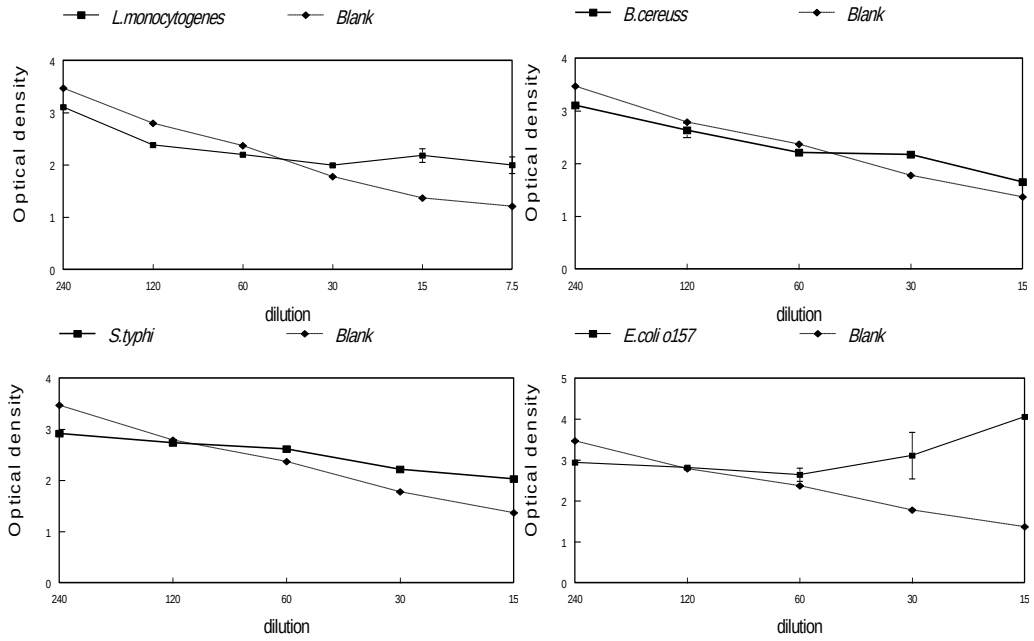


نمودار شماره ۱: محدوده اثر ضدباکتریایی عصاره آبی اندام‌های هوایی *سالویا خراسانیکا* بر باکتری‌های مورد آزمون.

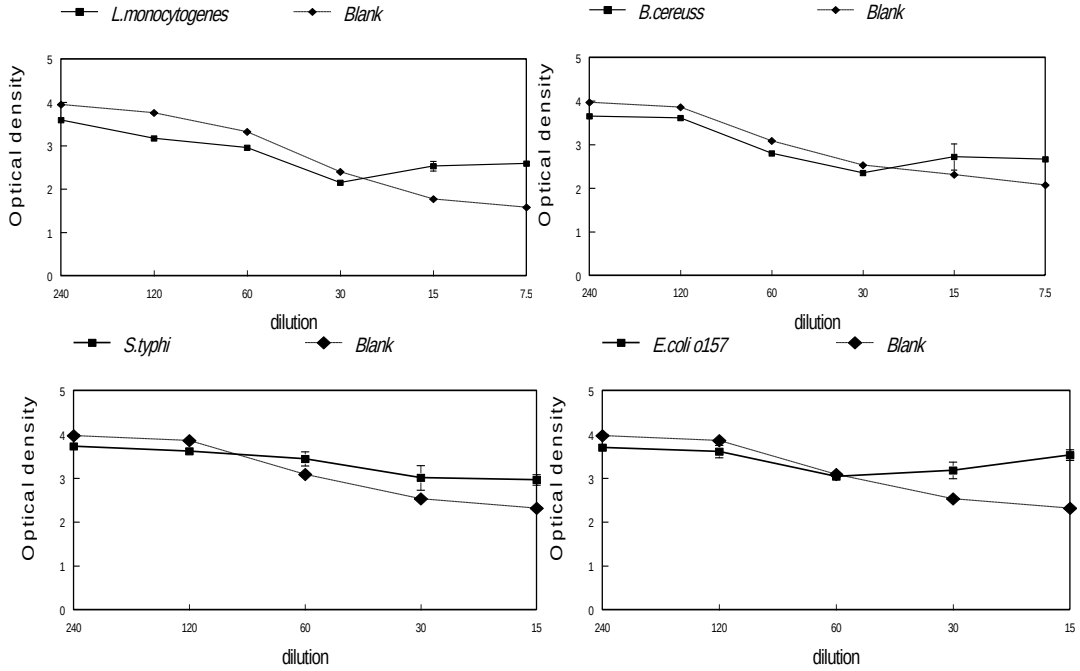
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:15 IRDT on Monday June 13th 2016



نمودار شماره ۲: محدوده اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی اندام‌های هوایی *سالویا خراسانیکا* بر باکتری‌های مورد آزمون.



نمودار شماره ۳: محدوده اثر ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی *سالویا خراسانیکا* بر باکتری‌های مورد آزمون.

نتایج بررسی حداقل غلظت کشندگی نشان داد بیشترین MBC، مربوط به عصاره اتانولی علیه باکتری *سالمونلا تیفی* و معادل ۴۸۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر می‌باشد. درمقابل، کمترین این مقدار برای باکتری‌های گرم مثبت مورد بررسی در برابر عصاره هیدروالکلی اندازه‌گیری شد (جدول شماره ۴).

جدول شماره ٤: نتایج حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا*
(برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

نوع عصاره	*لیستریا مونوسیتوژنز*	*باسیلوس سرئوس*	*سالمونلا تیفی*	*اشرشیاکلی (O157)*
آبی	۱۲۰	۱۲۰	۲۴۰	۲۴۰
اتانولی	۱۲۰	۱۲۰	۴۸۰	۲۴۰
هیدروالکلی	۶۰	۶۰	۲۴۰	۲۴۰

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:15 IRDT on Monday June 13th 2016

بحث

استفاده از گیاهان دارویی، به‌منظور درمان با تاریخ زندگی انسان همزمان بوده است. انسان در تمام دوران تاریخی چاره‌ای جز توسل به گیاهان نداشته است، اگرچه در نیم قرن گذشته، استفاده از داروهای شیمیایی و سنتزی به‌شدت رواج یافت، ولی به سرعت تأثیر زیانبار آنها بر زندگی انسان، سبب گرایش مجدد به گیاهان دارویی شد. بنابراین، به‌خوبی روشن است که توسل به گیاهان دارویی همواره در طول تاریخ یکی از روش‌های مؤثر درمان بوده است (۱۹).

نتایج حاصل از بررسی وزن خشک عصاره‌های مختلف اندام‌های هوایی گیاه *Salvia chorassanica* نشان داد در بین عصاره‌های اخذشده از اندام‌های هوایی گیاه *Salvia chorassanica*، عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی بیشترین درصد استحصال را به خود اختصاص داده است. اختصاص داشتن بیشترین درصد استحصال به عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* می‌تواند به میزان بیشتر استحصال عصاره توسط حلال هیدروالکلی ۸۰٪ اشاره کند. تحقیقات نشان داده است بهترین حلالی که با آن می‌توان عصاره خام یک گیاه را به دست آورد اتانل و یا متانول ۸۰ یا ۸۵٪ است؛ زیرا محققین به این نتیجه رسیده‌اند که این حلال‌ها می‌توانند ۸۰٪ مواد متشکله گیاه را در خود حل کنند. همچنین این حلال‌ها این مزیت را بر سایر حلال‌ها دارند که نشاسته موجود در گیاه به‌وسیله آنها استخراج نمی‌شود (۲۰).

تاران و همکاران (سال ۱۳۸۶)، اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره هیدورالکلی ۸۰٪ گیاه بلوط ایرانی را با استفاده از روش خیساندن مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد این عصاره بر تمامی سوش‌های میکروبی *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *ساکارومایسس سرویزیه* و *کاندیدا آلبیکنس* دارای اثرات ضدمیکروبی بوده و رشد آنها را مهار می‌کند (۲۱). به‌طورکلی با بررسی نتایج آنالیز یک‌طرفه مشخص می‌شود با افزایش غلظت عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا*، اثر ضدباکتریایی این عصاره‌ها نیز افزایش می‌یابد. در روش انتشار آگار، در دیسک با افزایش غلظت عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا*، هاله بازدارندگی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p<0/05$). نتایج مقایسه میانگین غلظت‌ها نیز نشان داد بین میانگین اکثر غلظت‌ها، تفاوت معنی‌داری وجود دارد که می‌توان وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار میانگین قطر عدم رشد غلظت‌های مختلف را به مقدار ماده مؤثر موجود در عصاره‌ها نسبت داد. به‌طورکلی می‌توان گفت تأثیر نوع عصاره، غلظت و اثر متقابل نوع عصاره و غلظت برای تمامی باکتری‌های مورد آزمون در این پژوهش از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($p<0/05$). همچنین با بررسی غلظت‌های اثرگذاری عصاره‌ها در روش انتشار در آگار در مقایسه با روش میکرودایلوشن، مشخص گردید در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، باکتری‌ها در غلظت‌های بالاتری از خود حساسیت نشان داده و در محیط آگاردار دارای هاله عدم رشد هستند که احتمالاً به دلیل تماس مستقیم باکتری‌ها با عوامل ضدمیکروبی در محیط مایع نسبت به محیط جامد می‌باشد. به‌علاوه، عوامل خارجی مختلفی از قبیل ارتفاع محیط کشت و مقدار ماده ضدمیکروبی موجود در دیسک، روشی است که طی آن محلول باکتری روی پلیت پخش شده و سن، شرایط نگهداری دیسک‌ها و بسیاری از عوامل دیگر نیز می‌تواند بر این تست تأثیرگذار باشد (۲۲). نتایج مطالعه Ekpo و Etim نشان داد فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه *Sida acuta* علیه میکروارگانیسم‌های جداشده از عفونت‌های پوستی (مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *آسپرژیلوس نایجر*) با افزایش غلظت عصاره‌ها افزایش می‌یابد (۲۳). محمدی سیچانی و همکاران (سال ۱۳۸۹) در بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی گلهای بومادران بر باکتری‌های بیماری‌زا نشان دادند با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد (۲۴)، که نتایج این بررسی‌ها با یافته‌های به‌دست‌آمده از این پژوهش همخوانی داشت.

در بررسی و مقایسه نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه مشاهده می‌شود که بیشترین میزان بازدارندگی مربوط به عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی بوده که با در نظر گرفتن ماهیت عصاره‌های هیدروالکلی ۸۵-۸۰٪ نسبت به استحصال ۸۰٪ ترکیبات ضدمیکروبی، این نتیجه قابل‌توجیه است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:15 IRDT on Monday June 13th 2016

همچنین درصد استحصال بیشتر این عصاره آبی نسبت به عصاره اتانولی اندام‌های هوایی می‌تواند توجیهی برای این امر باشد که عصاره آبی اندام‌های هوایی نسبت به عصاره اتانولی اندام‌های هوایی، اثر مهارکنندگی بیشتری داشته است. از طرف دیگر، آب جزء حلال‌هایی است که بیشترین قدرت استخراج را برای اغلب مواد طبیعی با وزن مولکولی پایین موجود در گیاهان دارویی، همچون آلکالوئیدها، ساپونین‌ها و فلاونوئیدها دارد (۲۵).

مطالعه Mukhtar و همکاران در مورد فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی سیر، دارچین و زردچوبه در برابر *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیاکلی* نشان از آن دارد که عصاره‌های آبی این گیاهان در مقایسه با عصاره اتانولی آنها، اثر ضدباکتریایی بیشتری دارد (۲۶)، که نتایج این مطالعه با داده‌های موجود در پژوهش حاضر همخوانی داشت.

حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به بسیاری از مواد ضدمیکروبی به‌طور قابل‌توجهی با یکدیگر متفاوت بوده و گروه اول حساسیت بیشتری از خود نشان می‌دهند. مقاومت نسبی ارگانیسم‌های گرم منفی نسبت به بسیاری از مواد ضدمیکروبی دیگر به دلیل طبیعت پیچیده موانع نفوذپذیری موجود در پوشش سلول می‌باشد. این پوشش شامل سه قسمت: یک غشای سیتوپلاسمی یا غشای داخلی محتوی لیپید و پروتئین، یک لایه نازک پپتید و گلیکان و یک ممبران خارجی شامل لیپوپلی‌ساکارید می‌باشد.

اگرچه باکتری‌های گرم مثبت نیز دارای یک لایه ممبران سیتوپلاسمی، پپتید و گلیکانی هستند، اما مابقی پوشش سلولی آنها به‌طور عمده از پلی ساکاریدهای آنیونی و در بعضی موارد از مقدار کمی پروتئین ساخته شده است.

غشای خارجی که فقط در باکتری‌های گرم منفی وجود دارد، با ایجاد سد در مقابل نفوذ مواد موجب می‌گردد قابلیت نفوذپذیری سلول‌های گرم منفی نسبت به بسیاری از انواع مولکول‌ها، کمتر از سلول‌های گرم مثبت باشد (۲۷). از طرف دیگر، می‌توان گفت تأثیر عصاره سالویا بر باکتری‌های گرم منفی ناشی از فلاونوئیدها و ترپن‌هایی است که در عصاره سالویا وجود دارد و می‌تواند بر دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی، نفوذپذیری بیشتری داشته باشد و از این طریق دیواره سلولی را تخریب و مانع از تکثیر باکتری‌های گرم منفی شود. به‌طورکلی، در این مطالعه نتایج حاصل از اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی و بررسی قطر هاله عدم رشد نشان داد باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز*، کمترین غلظت مهارکنندگی رشد را در برابر تمامی عصاره‌های مورد آزمون به خود اختصاص داده و بیشترین قطر هاله عدم رشد را در روش انتشار در دیسک داشته است.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد در روش‌های انتشار در آگار و میکرودایلوشن، باکتری‌های گرم مثبت *لیستریا مونوسیتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* حساسیت بیشتری نسبت به عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام هوایی *سالویا خراسانیکا* در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی *سالمونلا تیفی* و *اشرشیاکلی* O:157 دارند. همچنین بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره هیدروالکلی بر روی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و کمترین قطر هاله عدم رشد، مربوط به عصاره هیدروالکلی بر روی باکتری *اشرشیاکلی* O:157 می‌باشد.

References:

1. Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Int J Food Microbiol 2005;22(4):273-92.

2. Ayepola OO, Adeniyi BA. The antibacterial activity of leaf extracts of Eucalyptus camaldulensis (Myrtaceae). J Appl Sci Res 2008;4(11):1410-13.

3. Sokmen A, Gulluce M, Askin Akpulat H, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, et al. The "in vitro" antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic Thymus spathulifolius. J Food Cont 2004;15(8):627-34.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:15 IRDT on Monday June 13th 2016

4. Weiss R. Fintelmann R. Herbal Medicine, 2nd ed. Stuttgart: Thieme Pub; 2000. p. 36-7.

5. Tayarani-Najaran Z, Emami SA, Asili J, Mirzaei A, Mousavi SH. Analyzing cytotoxic and apoptogenic properties of Scutellaria litwinowii root extract on cancer cell lines. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;1-9.

6. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potentiona applications in foods, a review. Int J Food Microbiol 2004;94(3):223-53.

7. Sivropoulou A, Nikoloau C, Papanikolaou E, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities Salvia of fructicosa essential oil. J Agri Food Chem 1997;45(8):3197-201.

8. Aguado V, Vitas AL, Garcia-Jalon L. Characterization of Listeria monocytogenes and Listeria innocua from a vegetable processing plant by RAPD and REA. Int J Food Microbiol 2004;90(3):341-7.

9. Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections. J Microb Infect 2000;2(2):189–98.

10. Shimi A. Veterinary bacteriology and bacterial diseases. Tehran: Jahad Daneshgahi Press; 1996. p. 185-97. [Text in Persian]

11. Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. J Ethnopharmacol 2001;74(2):113-23.

12. Soltaninejad Sh, Sataei Mokhtari T, Soltaninejad M. Evaluation of antibacterial activity of methanolic extract of eucalyptus leaves against Staphylococcus aureus, Escherichiacoli and Streptococcus pyogenes in vitro. J Microbial Biotech Res Islamic Azad Univ 2010;2(4):21-8. [Full Text in Persian]

13. Valero M, Salmeron M. Antimicrobial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in Tyndallized carrot broth. Int J Food Microbiol 2003;85(2):73-81.

14. Awoyinka OA, Balogun IO, Ogunnowo AA. Phytochemical screening and in vitro bioactivity of Cnidoscolus aconitifolius (Euphorbiaceae). J Med Plant Res 2007;1(3):63-5.

15. Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil and methanol extract from Mentha Longifolia l. spp. longifolia. Food Chem 2007;103:1449-56.

16. Ozturk S, Ercisli S. Antibacterial activity and chemical constitutions of Ziziphora clinopodioide. Food Control 2007;18(5):535-40.

17. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extract for bacteria. Planta Med 1998;64:711-13.

18. Duffy CF, Power RF. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. Int J Antimicrob Agents 2001;17(6):527-9.

19. Ghasemi Pirbaluti A. Medicinal and aromatic plants recognize and assess their effects. Shahrekord: Islamic Azad University Press; 2009. p. 2020-218. [Text in Persian]

20. Samsam Shariat H. Extraction of effective components from medicinal plants and their diagnostic and evaluation methods. Esfehan: Mani Press; 1992. p. 8-20. [Text in Persian]

21. Taran M, Azizi A, Sharifi M. Antibacterial and antifungal activity of hydroacoholic and etheric extracts of Quercus brantii. J Microb Biotechnol 2010;2(4):7-12. [Full Text in Persian]

22. Cushine PT, Lamb AJ. International antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents 2005;26(5):343-56.

23. Ekpo MA, Etim PC. Antimicrobial activity of ethanolic and aqueous extracts of Sida acuta on microorganisms from skin infections. J Med Plant Res 2009;3(9):621-4.

www.SID.ir

Archive of SID

24. Mohammadi-Sichani M, Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M. Antibacterial activity of methanol extract and essential oil of Achillea wilhelmsii against pathogenic bacteria. Zahedan J Res Med Sci 2011;13(3):9-14. [Full Text in Persian]

25. Hatami S, Yavarmanesh M, Mohammadi Sani A. Study and comparison of aqueous extracts of seed of two varieties of castor on food index pathogens. The second national conference on the use of medicinal plants and traditional medicine in lifestyle and traditional medicine. Torbat Heydariye Torbat Heydariye University; 2013. p. 289-301. [Text in Persian]

26. Mukhtar S, Ghori I. Antibacterial activity of aqueos and ethanolic extracts of Garlic, Cinnamon and Turmeric against Escherichia coli ATCC 25922 and Basillus subtilis DSM 3256. Int J Appl Biol Pharm Technol 2012;3(2):131-6.

27. Irabor EI, Falodun A, Obasuyi O, Ofoegbu CO, Abiodun SO, Umujeyan K. Antimicrobial evaluation of methanolic extract of Colliandria surinamensis on some pathogenic organizams. Acta Pol Pharm-Drug Res 2007;64(5):449-51.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:15 IRDT on Monday June 13th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of Inhibitory and Lethal Effects of Aqueous, Ethanolic and Hydroalcoholic Extracts of Aerial Parts of Salvia chorassanica against Some Gram-negative and Gram-positive Bacteria in Vitro

Azam Mehraban[1], Mohammad Reza Edalatian Dovom[1*], Mohammad Hossein Haddad Khodaparast[1], Masoumeh Mehraban Sang Atash[2]

[1]Department of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

[2]Food Quality & Safety Research Group, Research Institute of Food Science & Technology, Jahad Daneshgahi of Mashhad, Mashhad, Iran.

[*]***Corresponding Author:*** **Mohammad Reza Edalatian Dovom,** Department of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Email: edalatian@um.ac.ir

Received: 1 Aug, 2015

Accepted: 3 Sep, 2015

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 12:15 IRDT on Monday June 13th 2016

Abstract

Background and Objectives: Development of bacterial resistance to antibiotics has led to an increased tendency to development of new more effective and non-toxic antimicrobial compounds. In this study, the inhibitory and lethal effects of aqueous, ethanolic, and hydroalcoholic extracts of aerial parts of *Salvia chorassanica* were evaluated against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi*, and *Escherichia coli O:157*.

Methods: In this study, Kirby–Bauer disk diffusion method was used to evaluate antimicrobial activity. In this method, bacteria were cultivated as grass culture in Mueller Hinton Agar (MHA) media. To determine the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration, micro-dilution method with ELISA and addition of phenyl tetrazolium chloride reagent, were used. Data were analyzed using one-way ANOVA and Duncan's test at the significance level of $p<0.05$.

Results: The highest diameter of inhibition in agar diffusion method was related to hydroalcoholic extract of aerial parts of *Salvia chorassanica* against Gram-positive bacteria *Bacillus cereus*. The amount of calculated MIC of hydro-alcoholic extract for Gram-positive bacteria was 30mg/ml. This amount was the lowest among other measured MIC.

Conclusion: Based on the results of this study, Gram-negative bacteria showed more resistance to different extracts of aerial parts of *Salvia chorassanica* as compared to Gram-positive bacteria, so that *Salmonella typhi* was found to be the most resistant bacterium among the tested bacteria.

Keywords: Anti-bacterial agent; Disk diffusion antimicrobial tests; Kirby-Bauer Disk-diffusion method; Aerial organs of *Salviachorassanica;* Salvia extract; Microdilution.

www.SID.ir