

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 Mehraban¹, Mohammad Reza Edalatian Dovom^{1*}, Mohammad Hossein Haddad Khodaparast¹,
Masoumeh Mehraban Sang Atash²**

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

²Food 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

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.

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 سمیت شده است. در این مطالعه اثرات مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* (*Salvia chorasanaica*) علیه لیستریا مونوسیترژنر، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی و *شرشیاکلی* O157 بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه از آزمون انتشار دیسک به روش کربی - بوئر جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی استفاده گردید. در این روش، باکتری در محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی از روش میکرودايلوشن با Elisa و افزودن معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید استفاده گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن (Duncan) در سطح $p < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: بیشترین قطر هاله بازداري در روش انتشار در آگار مربوط به عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی *سالویا خراسانیکا* علیه باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس بود. میزان MIC محاسبه شده در مورد عصاره‌های هیدروالکلی بر باکتری‌های گرم مثبت، معادل ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد که این میزان در میان دیگر MIC‌های اندازه گیری شده، کمترین مقدار بود.

نتیجه گیری: 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، به طوری که باکتری *سالمونلا تیفی* به عنوان مقاوم‌ترین باکتری در میان باکتری‌های مورد آزمون شناخته شده است.

کلید واژه‌ها: عامل ضد باکتریایی؛ آزمون ضد میکروبی انتشار در دیسک؛ آزمون انتشار در دیسک کربی - بائور؛ اندام هوایی *سالویا خراسانیکا*؛ عصاره *سالویا*؛ میکرودايلوشن.

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

^۲گروه 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 به صورت 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 chorasanaica* against some gram-negative and gram-positive bacteria in vitro. Qom Univ Med Sci J 2016;10(2):2-11.

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 ضد میکروبی مؤثرتر و بدون سمیت می‌شود. در سالهای اخیر با بررسی متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از نظر اثرات ضد میکروبی، مشخص شده است اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج‌شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد میکروبی 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 ۱۵ جنس 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 ضد عفونی‌کننده هستند. برخی گونه‌های این جنس نیز به‌عنوان ضد باکتری، ضد میکروب، ضد دیابت 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 ضد توموری، ضد میکروبی، سیتوتوکسیک و ضد التهاب در این گیاه می‌شود (۵).

اگرچه مطالعات زیادی بر روی ترکیبات و خصوصیات ضد باکتریایی 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 ضد باکتریایی آنها تأثیر می‌گذارد (۶).

Sivropoulou و همکاران (سال ۱۹۹۷)، فعالیت ضد میکروبی و ضد ویروسی اسانس مریم‌گلی (*Salvia fruticosa*) را بررسی کردند. در این تحقیق اسانس این گیاه به‌وسیله کروماتوگرافی گازی یا اسپکترومتري 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 ضد میکروبی در برابر گونه‌های باکتریایی مورد بررسی (*E. coli*، *Salmonella typhimurium*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Rhizobium leguminosarium*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*) بودند، همچنین با توجه به اینکه کامفور تقریباً در برابر همه این باکتری‌ها غیرفعال بود، اما در رقت ۲۵۰ ppm، اثر باکتروسیدی داشت و در رقت ۱۰۰۰ ppm نیز موجب کاهش تعداد میکروارگانیسم‌ها شده بود (۷).

باکتری لیستریا مونوسیژنوز، 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 بخار دادن و حرارت کم مقاوم بوده و هنگامی که 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) قابل انتقال 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 ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام هوایی سالویا خراسانیکا علیه

باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز (ATCC 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 خشک 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 آسیاب (مدل Waring) پودر شدند. در ادامه، برای عصاره‌گیری، به‌طور جداگانه در ارلن‌های حاوی ۵۰ گرم از اندام‌های هوایی پودر شده، 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 برابر شدن کدورت محلول

با کدورت ۰/۵ استاندارد مک‌فارلند ($10^8 \times 1/5$) واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر)، توسط محلول رینگر رقیق شد (۱۳). اثر ضد میکروبی 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 بر میلی‌لیتر 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 برات با غلظت مضاعف اضافه شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از اولین و بالاترین غلظت عصاره (غلظتی برابر با ۹۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تهیه‌شده با استفاده از دی‌متیل سولفوکساید ۵٪ و فیلتر میکروبی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر استریل) به چاهک اول اضافه گردید {در این حالت غلظت عصاره در خانه اول به نصف (۴۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) 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 صورت که 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

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 $10^5 \times 1/5$ مک‌فارلند (با غلظت واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر) 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 به وسیله دستگاه Elisa قرائت و مقایسه شد.

کمترین غلظت عصاره که مانع رشد باکتری شده بود، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد. تیمارها در ۳ تکرار انجام شدند (۱۶، ۱۵، ۱۳). برای تعیین MIC، ۵۰ میکرولیتر محلول ۵ میلی گرم بر میلی لیتر و تری‌فنیل تترازولیوم کلراید به تمامی چاهک‌های پلیت اضافه و پلیت در درمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. یک غلظت بالاتر از آخرین غلظتی که رنگ قرمز تترازولیوم را نشان داد، به عنوان MIC باکتری در نظر گرفته شد (۱۷). به منظور 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، به عنوان حداقل غلظت کشندگی یا MBC عصاره برای باکتری موردنظر در نظر گرفته 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 $p < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه میانگین وزن خشک عصاره آبی، 12 ± 0.08 ؛ اتانولی، 10 ± 0.11 و هیدروالکلی 14 ± 0.21 بود. عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی در غلظت ۹۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر، 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 میلی گرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی بر باکتری باسیلوس سرئوس بود. همچنین غلظت‌های ۴۸۰ و ۲۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره‌های اتانولی و هیدروالکلی، هیچ گونه 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 بر حسب 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	$17/18 \pm 0.45^a$	$15/12 \pm 0.79^b$	$13/21 \pm 0.34^c$	$12/10 \pm 0.91^d$
	۴۸۰	$15/62 \pm 0.34^b$	$12/13 \pm 0.51^c$	$10/0 \pm 0.43^d$	$8/52 \pm 0.73^e$
	۲۴۰	$11/51 \pm 0.44^c$	$10/14 \pm 1.23^d$	$0/0 \pm 0.0^e$	$0/0 \pm 0.0^d$
اتانولی اندام‌های هوایی	۹۶۰	$11/23 \pm 0.54^d$	$12/58 \pm 1.17^e$	$9/41 \pm 0.56^e$	$9/81 \pm 0.85^c$
	۴۸۰	$8/73 \pm 0.15^f$	$8/19 \pm 0.97^g$	$0/0 \pm 0.0^c$	$0/0 \pm 0.0^e$
	۲۴۰	$0/0 \pm 0.0^g$	$2/42 \pm 0.96^h$	$0/0 \pm 0.0^c$	$0/0 \pm 0.0^e$
هیدروالکلی اندام‌های هوایی	۹۶۰	$18/81 \pm 0.50^a$	$20/81 \pm 1.52^b$	$10/84 \pm 0.42^c$	$9/74 \pm 0.65^d$
	۴۸۰	$15/12 \pm 0.76^b$	$16/18 \pm 1.29^d$	$0/0 \pm 0.0^c$	$0/0 \pm 0.0^e$
	۲۴۰	$12/71 \pm 0.15^e$	$13/0 \pm 1.15^f$	$0/0 \pm 0.0^c$	$0/0 \pm 0.0^e$

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

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

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

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

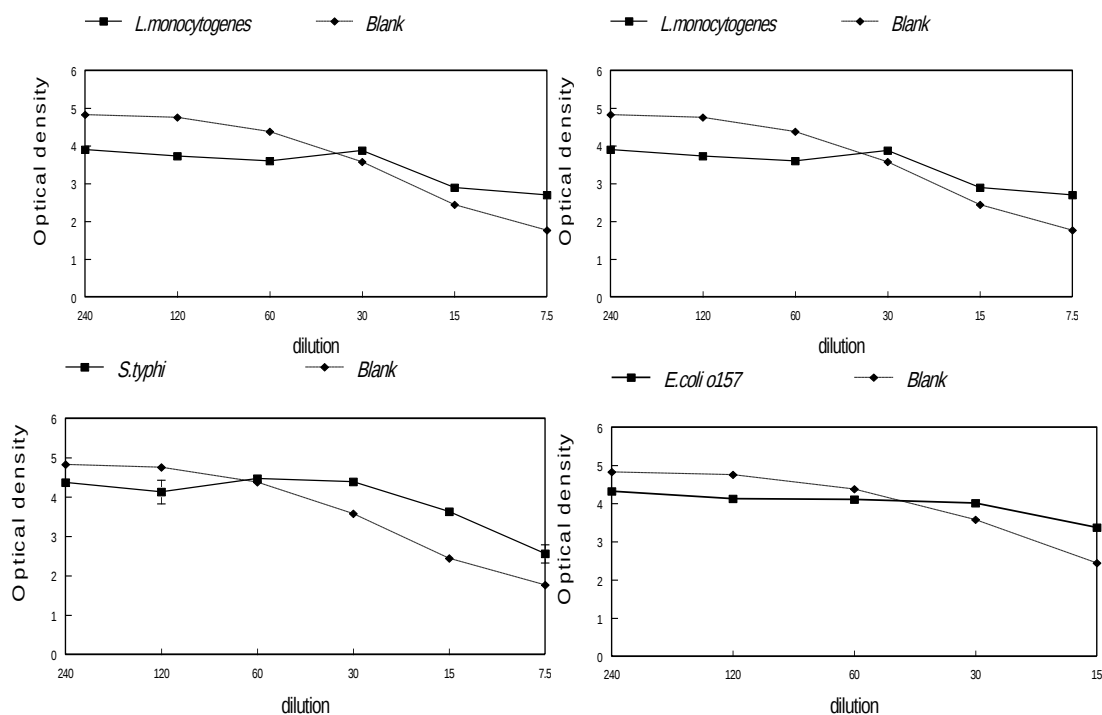
(بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر)

نوع عصاره	لیستریا مونوسیژنز	باسیلوس سرئوس	سالمونلا تیفی	اشرشیاکلی (O157)
آبی	60 ± 0.6	60 ± 0.8	60 ± 0.11	60 ± 0.6
اتانولی	60 ± 0.1	60 ± 0.1	120 ± 0.7	120 ± 0.4
هیدروالکلی	30 ± 0.3	30 ± 0.6	120 ± 0.3	60 ± 0.6

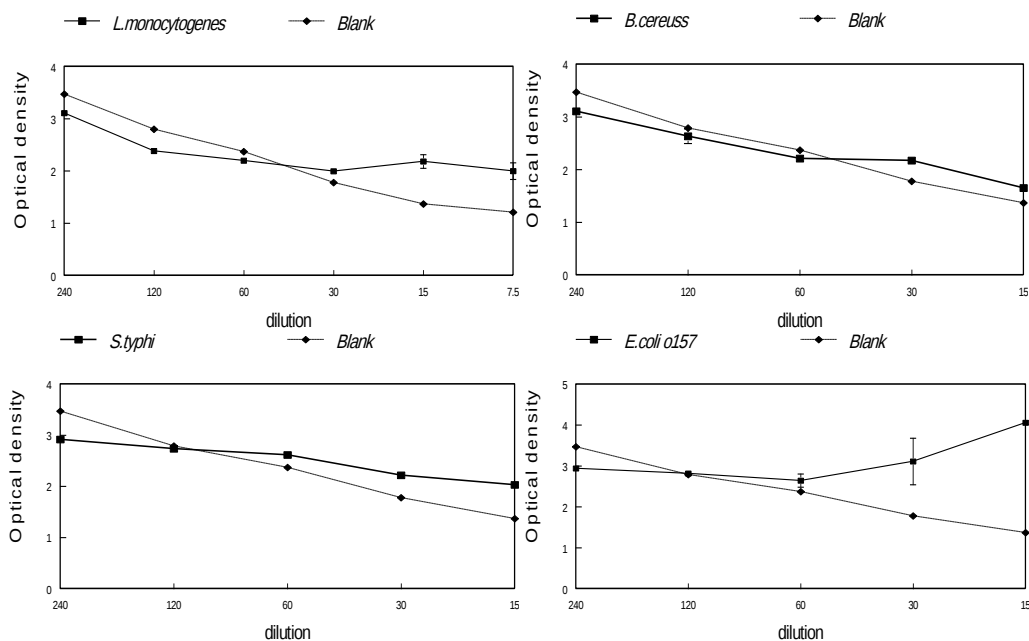
حروف غیرمشابه در یک ستون، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار (در سطح ۵٪) میان اثر ضد میکروبی عصاره‌های مختلف می‌باشد.

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.

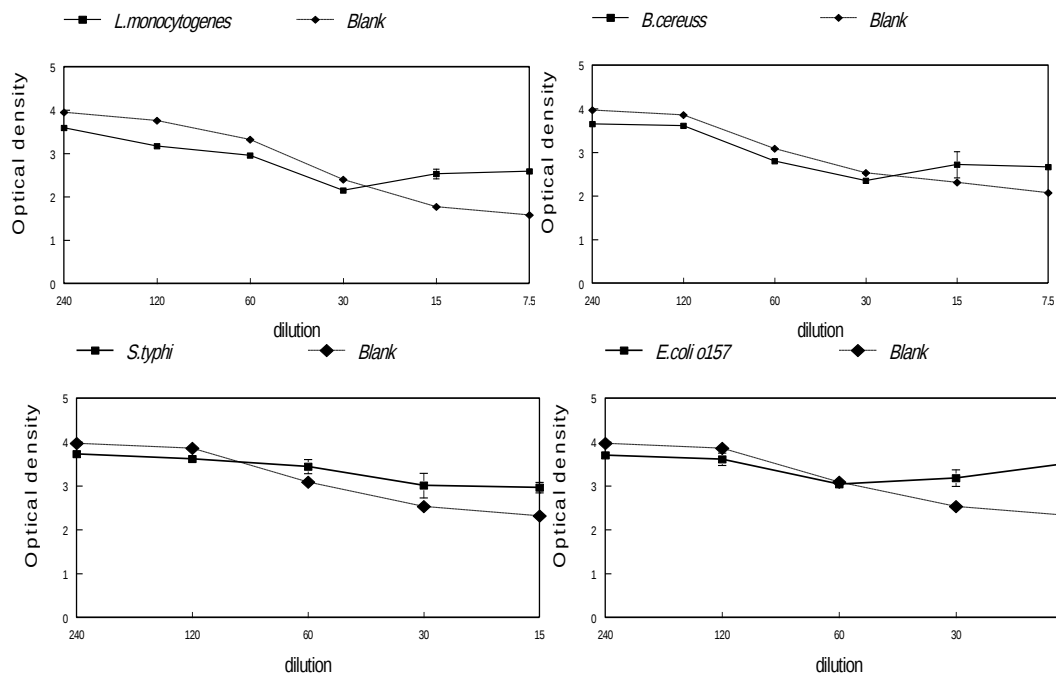
جهت تعیین محدوده MIC عصاره‌ها از رسم نمودار به وسیله نرم‌افزار اسلاید رایت (Slide Write Plus) استفاده شد. (نمودارهای شماره ۱-۳). محدوده اثر ضدباکتریایی عصاره‌های مورد نظر در این نمودارها براساس محل تلاقی نمودار کدورت مربوط به تیمار (میکروارگانیزم، عصاره و محیط کشت) با نمودار



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



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 میلی گرم بر میلی لیتر می‌باشد.

درمقابل، کمترین این مقدار برای باکتری‌های گرم مثبت مورد بررسی در برابر عصاره هیدروالکلی اندازه‌گیری شد (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۴: نتایج حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی *گیاه سالویا خراسانیکا* (بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر)

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

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 هیدروالکلی 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 ضد میکروبی بوده و رشد آنها را مهار می‌کند (۲۱). به‌طور کلی 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. به‌طور کلی 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 میکرودايلوشن، 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 ضد میکروبی در محیط مایع نسبت به محیط جامد می‌باشد. به‌علاوه، عوامل خارجی مختلفی از قبیل ارتفاع محیط کشت و مقدار ماده ضد میکروبی 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 ضد میکروبی 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 ضد میکروبی، این نتیجه قابل توجیه است.

همچنین درصد استحصال بیشتر این عصاره آبی نسبت به عصاره اتانولی اندام‌های هوایی می‌تواند توجهی 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 ضد میکروبی به‌طور قابل توجهی با یکدیگر متفاوت بوده و گروه اول حساسیت بیشتری از خود نشان می‌دهند. مقاومت نسبی ارگانیزم‌های گرم منفی نسبت به بسیاری از مواد ضد میکروبی 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 لیپولی ساکارید 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. به‌طور کلی، 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 مونوسیژنز*، 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 مونوسیژنز* 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 مونوسیژنز* و کمترین قطر هاله عدم رشد، مربوط به عصاره هیدروالکلی بر روی باکتری *اشرشیاکلی* O:157 می‌باشد.

References:

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

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 potentona 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 fruticosa* 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 *Cnidoscolum 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 clinopodioides*. 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. Esfahan: 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.

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, Ghorri I. Antibacterial activity of aqueous 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.