



بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره اتانولی برخی گیاهان دارویی بردو سویه باکتری

لیلا بندیان^۱، محمد مقدم^{۲*}، معصومه بحرینی^۳

^{۱،۲} گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

^۳ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

*نویسنده مسئول: m.moghadam@um.ac.ir

چکیده

امروزه با افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز گسترش سویه‌های مقاوم، استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان جایگزین مواد سنتزی، با اثرات جانبی کمتر، اهمیت زیادی یافته است. از این رو هدف از مطالعه حاضر، بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی سه گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، مریم گلی بنفش (*Salvia verticillata*)، اناریجه (*subpinnata Froriepia*) بر روی ۲ سویه باکتری *P. aeruginosa* sp. *carotovorum* هست. تحقیق از نوع تجربی و به صورت *in vitro* انجام شد. عصاره‌های گیاهان مذکور به روش مسراسیون تهیه و اثر ضد میکروبی آنها با استفاده از تکنیک میکروداپلوشن و با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) بررسی شد. متغیرهای این پژوهش شامل نوع عصاره، غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و سویه‌های مختلف باکتری بود. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آویشن شیرازی علیه باکتری‌های مورد بررسی بین ۳/۱۲ تا ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، عصاره مریم گلی بنفش بین ۳/۱۲ تا ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، و برای عصاره اناریجه ۱۲/۵ تا ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. مقایسه نتایج اثرات بازدارندگی نشان می‌دهد که در مجموع عصاره آویشن شیرازی خاصیت ضد باکتریایی قوی تری نسبت به عصاره مریم گلی بنفش و اناریجه دارد و باکتری پکتوباکتریوم حساسیت بیشتری نسبت به سودوموناس دارد.

کلمات کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، عصاره، MIC، MBC، گیاهان دارویی.

مقدمه

با توجه به مصرف بی‌رویه داروهای شیمیایی و به دنبال آن افزایش سویه‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک، شناسایی و معرفی منابع آنتی‌بیوتیکی جدید حائز اهمیت فراوانی است. به همین دلیل محققان زیادی جهت شناسایی آنتی‌بیوتیک‌های جدید به مطالعه گیاهان دارویی روی آورده‌اند. عصاره‌های گیاهی به دلیل دارا بودن ترکیبات ضد میکروبی، ضد اکسایشی و عوامل حذف‌کننده رادیکال آزاد، توانایی بالایی برای به کارگیری به عنوان یک نگهدارنده طبیعی را دارا هستند، همچنین توانایی کنترل رشد پاتوژن‌ها و تولید سم توسط ریزسازواره‌ها را دارند (Tajkarimi et al., 2008).

گیاه اناریجه (*Froriepia subpinnata*) از خانواده چتریان، دارای گیاهان یک ساله بدون کرک، با ساقه‌ای استوانه‌ای با ارتفاع ۲۰-۱۱۰ سانتی‌متر و از سبزی‌های معطر است. از جمله گیاهانی است که حاوی اسانس با فعالیت ضد میکروبی بالا می‌باشد. پژوهش‌ها حاکی از آن است که گیاه اناریجه به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌تواند برای کنترل برخی از باکتری‌ها و قارچ‌ها مورد استفاده قرار گیرد (پلنگیان و همکاران، ۱۳۹۶).

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) از خانواده نعنائیان شامل گیاهانی بوته‌ای با ساقه‌های منشعب و شاخه‌های متعدد نازک و برگ‌های کوچک تقریباً دایره‌ای و با حاشیه صاف و بی‌دمبرگ است که در مناطق مختلف ایران می‌روید. آویشن از گیاهانی است که اسانس و عصاره آن دارای اثرات ضد میکروبی بسیار قوی است. در طب سنتی ایران، این گیاه دارویی بهترین درمان برای عفونت‌های تمام قسمت‌های بدن است. (Mancini et al., 2015).



مریم گلی بنفش (*Salvia verticillata*) گیاهی علفی چندساله، سبز، پوشیده از کرک از تیره نعناعیان است که از دیرباز خواص دارویی آن شناخته شده است. ترکیب‌های بسیاری از این گیاه جداسازی شده است که از آن جمله می‌توان ترپنوئیدها و مشتقات فنلی را نام برد (Kelen and Tepe, 2008).

Pseudomonas aeruginos از جمله پاتوژن‌هایی هست که از روی سبزی‌ها و میوه‌ها جدا شده است. این باکتری از عوامل مهم بیماری‌زای انسانی بشمار می‌رود. پکتوباکتریوم *Pectobacterium caratovorum* یک باکتری گرم منفی و میله‌ای شکل است که در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی باعث ایجاد بیماری و خسارات اقتصادی می‌شود. از ویژگی‌های مهم این باکتری‌ها تولید تعداد زیادی از آنزیم‌های خارج سلولی مانند سلولاز، گالاکتوروناز، پروتئاز، آمیلاز و... که از عوامل مهم بیماری‌زایی که منجر به فساد است تولید کنند. این آنزیم‌ها ممکن است از طریق بافت آسیب دیده و یا از طریق طبیعی در طول رشد محصول وارد سبزیجات شوند، و در طول برداشت، پس از برداشت، در طول ذخیره سازی و یا توزیع سبب آسیب به بافت سبزیجات شوند (Toth et al., 2003).

مواد و روش‌ها

این تحقیق از نوع مطالعات تجربی بوده و به صورت *in vitro* انجام شد. در این آزمایش نمونه‌های گیاهی شامل آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، مریم گلی بنفش (*Salvia verticillata*)، اناریچه (*subpinnata Froriepia*) می‌باشند. آویشن شیرازی و مریم گلی بنفش از منطقه خراسان رضوی (شهرستان درگز) و اناریچه از شمال کشور تهیه شده است. عصاره نمونه‌های خشک گیاهی به روش خیساندن با حلال اتانول ۷۳ درصد تهیه شد. بدین منظور پودر خشک اندام‌های ذکر شده به مدت ۲۴ ساعت در اتانول ۷۳ درصد خیسانده و شیک شدند. عصاره‌های حاصل با دستگاه روتاری اوپراتور تغلیظ شدند.

۲ نوع باکتری مورد استفاده شامل *Pseudomonas aeruginosa*، *Pectobacterium caratovorum* از دانشکده کشاورزی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و در محیط کشت نوترینت آگار کشت شدند. پتری‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. پس از اطمینان از خلوص، باکتری‌ها را در محیط کشت مولر هینتون براث کشت نموده و برای مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس از آن‌ها محلول نیم‌مک‌فارلند تهیه کردیم.

تعیین کمترین غلظت بازدارندگی (MIC)

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک (میکرو براث دایلوشن) مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا جهت تهیه استوک مادر برای عصاره‌ها غلظتی برابر با ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و با استفاده از فیلتر میکروبی ۰/۴۵ میکرون استریل گردیده. در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه مقادیر ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های عصاره تهیه شده و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک‌فارلند در هر میکروپلیت ریخته شد. غلظت‌های نهایی برای عصاره آویشن شیرازی، مریم گلی بنفش و اناریچه مقادیر ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲، ۵، ۲، ۱، ۰، ۶، ۳، ۱، ۰، ۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. پس از پر کردن چاهک‌های میکروپلیت، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار می‌گیرند و پس از این مدت جذب کدورت پلیت‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر خوانده می‌شود. اولین خانه‌ای که در آن کدورتی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی تعیین شد (NCCLS, 2001). آزمایشات در سه تکرار انجام شدند.

تعیین کمترین غلظت کشندگی (MBC)

از خانه‌هایی که در آنها کدورتی مشاهده نشد، ۵ میکرولیتر برداشته و روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت نقطه‌ای داده شد و در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. اولین غلظتی که در آن هیچ رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (NCCLS, 2001).

نتایج و بحث



نتایج حاصل از بررسی MIC و MBC بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر عصاره های آویشن شیرازی، مریم گلی بنفش و اناریجه علیه باکتری های مورد بررسی در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- فعالیت ضد باکتریایی (MIC و MBC) عصاره آویشن شیرازی، مریم گلی بنفش و اناریجه به روش میکروداپلوشن

| اناریجه | | مریم گلی بنفش | | آویشن شیرازی | | واکنش گرم | پاتوژن |
|-------------|-------------|---------------|-------------|--------------|-------------|-----------|-----------------------|
| MBC (mg/ml) | MIC (mg/ml) | MBC (mg/ml) | MIC (mg/ml) | MBC (mg/ml) | MIC (mg/ml) | | |
| 100 | 25 | 50 | 3.12 | 50 | 3.12 | - | <i>p. carotovorum</i> |
| 0 | 12.5 | 0 | 25 | 0 | 6.25 | - | <i>P. aeruginosa</i> |

MIC: حداقل غلظت بازدارندگی، MBC: حداقل غلظت کشندگی

خواص ضد باکتریایی عصاره آویشن شیرازی

همانگونه که از این جدول بر می آید عصاره آویشن شیرازی علیه باکتری های گرم منفی مورد بررسی شامل *p. carotovorum*، *P. aeruginosa* بین ۳،۱۲ تا ۶،۲۵ متغیر است. از میان این باکتری ها *p. carotovorum* حساسیت بیشتری نسبت به *P. aeruginosa* نشان داد. میزان MBC باکتری پکتوباکتریوم برابر ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود و درباره باکتری سودوموناس قادر به کشتن این باکتری نبود.

خواص ضد باکتریایی عصاره مریم گلی بنفش

مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی مابین ۳،۱۲ تا ۲۵ متغیر بود. عصاره مریم گلی هم مانند آویشن شیرازی خاصیت کنترل بیشتری روی باکتری پکتوباکتریوم داشت. میزان MBC باکتری پکتوباکتریوم برابر ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود و درباره باکتری سودوموناس قادر به کشتن این باکتری نبود.

خواص ضد باکتریایی عصاره اناریجه

مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی بین ۲۵ تا ۱۲،۵ متغیر بود. این عصاره برخلاف دو عصاره بالا خاصیت بازدارندگی بیشتری روی باکتری سودوموناس داشت. اما این عصاره نیز مانند دو عصاره قبلی قادر به کشتن باکتری سودوموناس نبود. حداقل غلظت کشندگی برای باکتری پکتوباکتریوم نیز ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. با توجه به یافته های بالا مقایسه نتایج اثرات بازدارندگی نشان می دهد که در مجموع عصاره آویشن شیرازی خاصیت ضد باکتریایی قوی تری نسبت به عصاره مریم گلی بنفش و اناریجه دارد و باکتری پکتوباکتریوم حساسیت بیشتری نسبت به سودوموناس دارد. از بین باکتری های مورد بررسی *P. aeruginosa* مقاومت بیشتری نشان داد، زیرا هیچ یک از عصاره ها قادر به کشتن سودوموناس نبودند.

گرچه بروز فعالیت ضد باکتریایی اغلب بسیار واضح است ولی مکانیزم عمل آن بطور کامل درک نشده است. شواهدی وجود دارد که نشان می دهند عصاره ها اثرات ضد باکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می کنند. بررسی های صورت گرفته در خصوص مکانیزم عمل عصاره ها اثبات نموده است که این ترکیبات نفوذپذیری غشاء را افزایش می دهند. اجزای عصاره با نفوذ در غشاء منجر به متورم شدن غشاء گردیده و فعالیت آنرا تحت تاثیر قرار می دهند در نهایت منجر به مرگ سلول خواهند شد (Holly and Patel, 2005). اجزای عصاره نیز اثرات ضد باکتریایی متفاوتی دارند، آلتز و همکاران (Ulte et al., 2002) اظهار نمودند که گروه هیدروکسیل موجود در عصاره مانند کارواکرول، تیمول، سایمن و منتول برای بروز خاصیت ضد باکتریایی آنها بسیار مهم است.



منابع

پلنگیان، سحر؛ فاطمه زابلی و اسماعیل فتاحی، ۱۳۹۶، بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس گیاه اناریچه بر روی برخی از میکروارگانیسم های مولد توکسین در مواد غذایی، اولین همایش ملی نقش گیاهان دارویی در اقتصاد مقاومتی، فریدونشهر.

Holly R. A., and Patel D. (2005). Improvement in shelf life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Chemistry*, 22, 273–292.

Kelen M, Tepe B, Chemical composition antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora, *J Bioresource Technol*, 2008 ;99: 96-104.

Mancini, E., Senatore, F., Del Monte, D., De Martino, L., Grulova, D., Scognamiglio, M. & De Feo, V. (2015). Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Molecules*, 20(7), 12016-12028.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eleventh Informational Supplement. Document M 100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA.

Tajkarimi, M., Ibrahim, S., & Cliver, D., 2010, Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 9: 21. 1199-1218.

Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., and Birch, P. R. J. (2003). Soft rot erwiniae: From genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, 4, 17 –30.

Ulte A., Bennik M. H. J., and Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1561–1568.

Investigation of antibacterial properties of ethanolic some medicinal plants extract on two bacteria strains

Leila Bandian¹, Mohammad Moghaddam², Masoumeh Bahreini³

^{1,2} Department of Horticultural, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad.

³ Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad.

*Corresponding Author: m.moghadam@um.ac.ir

Abstract

Today, due to the increased use of antibiotics and spread of resistant strains, using natural compounds as an alternative to synthetic compounds, with fewer side effects, has been widely importance. The aim of this study was to investigate the antimicrobial activity of ethanolic three plants extract include; *Zataria multiflora*, *Salvia verticillata*, *Froriepia subpinnata* on two gram negative bacteria *p. carotovorum* *P. aeruginosa*. An experimental study was conducted at in vitro condition. Ethanolic extracts of above plants prepared by maceration method. Antimicrobial activity were investigated Using the technique of dilution and By determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The minimum inhibitory concentration *Zataria multiflora* was between 3.12 to 6.25 mg/ml, the *Salvia verticillata* extract was between 12.3 and 25 mg/ml, and for the *Froriepia subpinnata* extract was 12.5 to 25 mg/ml. Variables were included extract types, different concentrations of extracts and bacterial strains. Comparison of the results of inhibitory effects is shown The total amount of *Zataria multiflora* extract is more potent than antibacterial To extract the *Salvia verticillata* and *Froriepia subpinnata*, Bacteria *p. carotovorum* sensitive more than to the bacteria *Pseudomonas*.

Keywords: Antibacterial property, Extract, MIC, MBC, Medicinal plant