مقالهٔ پژوهشی

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ یازدهم، شمارهٔ ۲، ص ۱۱۸-۱۰۹، ۱۳۸۳

بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی بر شش سوش میکروبی گرم مثبت و گرم منفی

دکتر محمدحسن مصحفی[۱]، دکتر میترا مهربانی[۲] و دکتر حکیمه ذوالحسب[۳]

خلاصه

در این تحقیق اثرات ضدمیکروبی اسانس مریم گلی ایرانی و مریم گلی آذربایجانی بر روی شش سوش میکروبی استاندارد گرم مثبت و گرم منفی به روش‌های بیواتوگرافی تعلیقی، سیلندر- پلیت و رقت - لوله مورد بررسی قرار گرفت. در روش بیواتوگرافی تعلیقی اسانس مریم گلی ایرانی و آذربایجانی به طریقه تقطیر با آب تهیه شد و اجزاء متشکله آنها توسط سیستم حلال تولوئن - اتیل استات (۷- ۹۳) بر روی پلیت‌های آماده سیلیکاژل به روش TLC مجزا گردید .در روش سیلندر- پلیت و رقت- لوله، عصاره آبی و متانولی گیاهان فوق را به روش خیساندن تهیه نموده و پس از تبخیر حلال، عصاره‌ها با غلظت‌های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵ و ۱/۵۶۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با کمک حلال آب مقطر تهیه شد. آنگاه اثرات ضد میکروبی بررسی شد. با استفاده از روش بیواتوگرافی، اسانس مریم‌گلی ایرانی روی اشرشیاکلی، استافیلوکوک طلایی، کلبسیلا پنومونیه، پسودوموناآئروژینوزا، باسیلوس سابتیلیس و اسانس مریم‌گلی آذربایجانی روی اشرشیاکولی، استافیلوکوک طلایی، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و باسیلوس سابتیلیس اثرات ضدمیکروبی نشان دادند. MICهای به دست آمده بر حسب mg/ml عصاره در مورد اشرشیاکولی، استافیلوکوکوس آرئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، کلبسیلاپنومونیه، پسودوموناآئروژینوزا و باسیلوس سابتیلیس به ترتیب در عصاره آبی مریم‌گلی ایرانی عبارت بود از ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۲۵، ۶/۲۵، ۵۰، ۶/۲۵ و در مورد عصاره متانولی آن به ترتیب ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۳/۱۲۵ بود. در مورد عصاره آبی مریم‌گلی آذربایجانی ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵ بی‌اثر، بی‌اثر، ۳/۱۲۵ و در مورد عصاره متانولی آن به ترتیب ۳/۱۲۵، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵ بی‌اثر، بی‌اثر و ۳/۱۲۵ بود. انواع عصاره و اسانس مریم‌گلی آذربایجانی هیچ اثر ضدمیکروبی روی کلبسیلاپنومونیه و پسودوموناآئروژینوزا از خود نشان ندادند. در حالی که مریم‌گلی ایرانی روی پسودوموناآئروژینوزا اثر ضدمیکروبی داشت.

واژه‌های کلیدی: مریم‌گلی ایرانی، مریم‌گلی آذربایجانی، اثرضدمیکروبی، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، بیواتوگرافی تعلیقی، سیلندر- پلیت، رقت - لوله

۱- استادیار میکروبیولوژی، ۲- استادیار فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان، ۳- دکتر داروساز

دریافت مقاله: ۱۳۸۱/۹/۱۷ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۸۲/۹/۱۲ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۲/۱۱/۱

مقدمه

گیاهان قسمت اعظم طبیعت اطراف آدمی را تشکیل می‌دهند. بنابراین به عنوان اولین انتخاب برای حل مشکلات زندگی از آنها کمک گرفته شده است. تا چند دهه گذشته آنچه که به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گرفت، از منابع طبیعی و بطور عمده از گیاهان به دست می‌آمد. پیشرفت علم از یک سو و مسائل اقتصادی از سوی دیگر باعث کاهش مصرف گیاهان دارویی شده است و داروهای صناعی در بسیاری از موارد جایگزین داروهای گیاهی شده‌اند (۳). مصرف روزافزون داروهای شیمیایی روز به روز مشکلات حادتری از قبیل پدیده خودایمنی بر اثر مصرف مداوم و بی رویه و بدون توجه به طریقه خاص مصرف دارو و عوارض جانبی که برخی از خود بیماری خطرناک‌تر هستند را به وجود می‌آورند. به دلیل مشکل مقاومت میکروارگانیسم‌ها به داروهای شیمیایی و عوارض جانبی و ناخواسته آنها، استفاده از عصاره‌های گیاهی و گیاهانی که فعالیت ضدمیکروبی از خود نشان می‌دهند در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. از ۳۵۰ هزار گونه گیاهی که در روی کره زمین‌شناسایی شده، حدود ۱۰ هزارگونه از نظر مواد متشکله بررسی گردیده‌اند که برخی دارای اثرات دارویی هستند و هنوز زمان زیادی مانده تا منابع جدید و با ارزش گیاهی کشف گردند (۵).

کشور ایران به واسطه سابقه تمدن چند هزار ساله که حدود ۱۴۰۰ سال آن با فرهنگ غنی اسلام درآمیخته و نیز به دلیل موقعیت خاص جغرافیایی و شرایط اقلیمی و آب و هوایی متنوع که سبب رشد انواع گوناگونی از گیاهان گردیده و باعث اطلاق نام طلای سبز به فلور طبیعی ایران شده است، از جهت طب سنتی و گیاه درمانی غنی می‌باشد (۲).

مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی دو گیاه اسانس‌دار از خانواده نعناع و بومی ایران می‌باشند که در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

مریم‌گلی ایرانی *(Saliva mirzayanii)*: گیاهی گلدار، نهاندانه، دولپه ای، پیوسته گلبرگ، از راسته توبی فلورال، راسته فرعی شاه‌پسند، تیره نعناع و جنس سالویا است (۴،۶،۱۹). این نوع مریم‌گلی در محل جمع‌آوری به نام مورپرزو *(Mour porzoo)* نامیده می‌شود.

مریم‌گلی ایرانی دارای فلاونوئیدهای آپی‌ژنین، اسکوتلارئین ۶ و ۷- دی‌متیل‌اتر، اسکوتلارئین ۶ و ۷ و ۴′- تری‌متیل‌اتر، لوتئولین ۳- متیل‌اتر، ۶ و ۷ و ۳′ و ۴′ تترامتیل‌اترهای هیدروگزایلوتئولین و تانن می‌باشد (۷).

یک ترپنوئید جدید از دسته سس‌ترپن‌ها به نام سالویا میرزاکولید نیز از قسمت‌های هوایی گیاه به دست آمده است (۱۴). گیاه دارای ۲-۱/۵ درصد اسانس بوده که پس از آنالیز توسط دستگاه طیف سنجی جرمی ـ گاز کروماتوگرافی (GC-MS) مشخص گردیده درصد عمده مواد متشکله آن ۱ و ۸- سینئول (۱۷/۴٪) و آلفاترپینیل استات (۲۱/۲۵٪) می‌باشند (۷).

مریم‌گلی آذربایجانی *(Saliva atropatana)*: گیاهی است گلدار، نهاندانه، دولپه‌ای، از راسته توبی فلورال، راسته فرعی شاه‌پسند، تیره نعناع، جنس سالویا (۴،۶،۱۹).

این گیاه دارای نام‌های عمومی مریمی، مریمیه و شالبیه بوده و *Garden sage* نیز خوانده می‌شود (۶). گیاه دارای ۰/۱٪ اسانس زردرنگ سبک‌تر از آب بوده، مواد عمده اسانس آن با آنالیز توسط دستگاه طیف‌سنجی جرمی ـ گاز کروماتوگرافی، بتا ـکاریوفیلین (۱۶/۳٪)، اسکلارئول (۱۳/۳٪)، هگزیل اکتانوآت (۱۲/۲٪) گزارش شده‌اند (۱۵). هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات ضدمیکروبی دو گیاه مذکور به طریقه *In vitro* بوده است.

مواد و روش‌ها

۱-گیاهان مورد استفاده

مریم‌گلی ایرانی از منطقه غرب اسفندقه واقع در استان کرمان در خرداد ماه جمع‌آوری گردید و پس از خشک کردن پودر شد.

مریم‌گلی آذربایجانی از اطراف اصفهان در اردیبهشت ماه جمع‌آوری گردید و پس از خشک کردن پودر شد.

۲- تهیه عصاره‌های گیاهی به روش خیساندن

دلیل استفاده از روش خیساندن، عدم آسیب به تمام مواد موجود در عصاره تهیه شده از گیاهان می‌باشد (۴).

جهت تهیه عصاره آبی و متانولی هر گیاه به طور جداگانه، به حدود ۳۰ گرم پودر گیاه ۱/۵ برابر حجم آن آب مقطر و یا متانول ۸۰ درجه افزوده شده و به مدت ۴۸ ساعت مرتباً تکان داده شد و پس از صاف شدن توسط

دستگاه تقطیر در خلأ چرخان در حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کاملا خشک گردید (۹،۲۰).

۳- تهیه اسانس به روش تقطیر با آب

۱۰۰ گرم از پودر هر گیاه توسط دستگاه اسانس‌گیری تقطیر با آب (Clevenger apparatus) به طور جداگانه اسانس‌گیری شد. اسانس‌ها بعد از آب‌گیری توسط سولفات سدیم انیدر، تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری گردید.

٤- میکروارگانیسم‌های مورد استفاده

در این بررسی از میکروارگانیسم‌های زیر که از مرکز پژوهش‌های علمی ـ صنعتی ایران خریداری شد، استفاده گردید:

استافیلوکوک طلایی (PTCC = ۱۱۱۲)، استافیلوکوک اپیدرمیدیس(PTCC=۱۱۱۴)، اشرشیاکولی (PTCC=۱۳۳۰)، کلبسیلاپنومونیه (PTCC=۱۰۵۳)، پسودومونا آئروژینوزا (PTCC=۱۰۷۴) و باسیلوس سابتیلیس (PTCC=۱۰۲۳).

۱-٤- تهیه سوسپانسیون میکروبی

برای کشت میکروارگانیسم‌ها، پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی با استفاده از محیط کشت مایع سوی‌بین کازئین هضم شده (Soybean caseine digest borth) و انتقال به آگار مغذی (Nutrient Agar)، محیط کشت حاصل به مدت یک شب در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت رشد میکروب قرار داده شد (۸).

۵- روش آزمایش

۱-۵- روش بیواتوگرافی تعلیقی

به منظور جداسازی عوامل ضدمیکروبی موجود در اسانس مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی از روش بیواتوگرافی تعلیقی استفاده گردید (۱۱).

مراحل مختلف و متوالی آن عبارتند از:

اسانس مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی با ۹ برابر حجم خودشان با حلال پنتان مخلوط گردیدند.

- جداسازی ترکیبات موجود در اسانس مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی با سیستم حلال تولوئن ـ اتیل‌استات (۷-۹۳) با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) به کمک صفحات کروماتوگرافی Silicagel GF254 پشت آلومینیومی ساخت شرکت MERCK (۲×۷/۵cm) انجام شد (۲۳).

- خارج کردن کروماتوگرام از تانک کروماتوگرافی و صرف زمان لازم برای تبخیر حلال از سطح TLC و همزمان تابانیدن پرتو فرابنفش جهت از بین رفتن آلودگی سطحی احتمالی.

- انتقال صفحات کروماتوگرافی به درون پلیت‌هایی که از قبل اندکی محیط کشت مولرهینتون آگار (حدود ۵ میلی لیتر) کف آنها ریخته شده بود، در این حال صفحات کروماتوگرافی به کف پتری دیش‌ها چسبیده‌اند. باید توجه داشت که هیچ‌گونه حبابی از هوا در زیر TLC قرار نگیرد.

- افزودن حدود ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار مذاب در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد روی سطح صفحات کروماتوگرافی درون پلیت‌ها به صورتی که لایه‌ای نازک و یکنواخت روی آنها را پوشانیده و منعقد گردد. محیط کشت مذکور قبل از آن با سوسپانسیون میکروب‌ها تلقیح شده بود. برای این منظور حدود ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروب (با کدورت مطابق با استاندارد نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$cfu/ml) به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت (۵۰ درجه سانتی‌گراد) افزوده و سپس به آرامی تکان داده شد.

- انکوباسیون پلیت‌ها حاوی کروماتوگرام و محیط کشت تلقیح شده در شرایط مناسب برای باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت.

- پس از طی زمان انکوباسیون معرف دهیدروژناز (محلول آبکی ۲ درصد ماده ۳- (۴- یدوفنیل) — ۲- (۴- نیتروفنیل) —۵- فنیل ۲H تترازولیوم کلراید خریداری شده از شرکت MERCK به سطح داخل پلیت‌ها اسپری گردیده و آنگاه پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت داخل انکوباتور گذاشته شدند. در خاتمه حضور ترکیب ضدمیکروبی به صورت لکه‌های بی‌رنگ در زمینه قرمز ارغوانی مشخص شد.

پس از مقایسه کروماتوگرام‌های تلقیح شده که با معرف دهیدروژناز اسپری شدند با کروماتوگرام شاهد که معرف وانیلین ـ اسیدسولفوریک (وانیلین ۱٪ الکلی ـ اسیدسولفوریک ۵٪ الکلی) به سطح آنها پاشیده شده بود و تطابق با Rf (relative factor) لکه مربوطه به ترکیب

ضدمیکروبی با Rf ترکیب مشابه در کروماتوگرام‌های شاهد انجام شد (۱،۲).

$$Rf = \frac{\text{فاصله خط بستر تا جایی که حلال بالا رفته}}{\text{فاصله خط بستر تا جایی که لکه قرار گرفته است}}$$

مکانیسم عمل معرف‌های دهیدروژناز: میکروب‌های زنده آنزیم دهیدروژناز را در محیط تولید می‌کنند که این آنزیم در صورت وجود معرف دهیدروژناز در محیط، یک باند دوگانه به فرمول معرف اضافه می‌کند که این باند به طول سیستم گنژوگه ملکول می‌افزاید و رنگ محیط را ارغوانی می‌کند. در واقع یک واکنش اکسیداسیون صورت می‌گیرد.

۲-۵- روش سیلندر ـ پلیت

با قرار دادن ۶ سیلندر در اطراف و یک سیلندر در مرکز به عنوان شاهد منفی (در مورد عصاره‌های آبی، از حلال آب مقطر و در مورد عصاره‌های متانولی از حلال متانول ۸۰ درجه) و در سیلندرهای محیطی، به ترتیب شش غلظت از عصاره‌های مورد نظر (۵۰ mg/ml، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶۲) افزوده و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرار داده شد.

بعد از طی مدت انکوباسیون، منطقه عدم رشد (Inhibition zone) در محیط اطراف سیلندرها با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. قابل ذکر است که اثر ضدمیکروبی هر عصاره بر روی هر سوش به روش فوق سه بار مورد آزمایش قرار گرفت. در این روش از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به عنوان شاهد مثبت در غلظت‌های مختلف استفاده شد (۱۸).

۳-۵- روش رقت - لوله

در این روش با استفاده از هشت رقت متوالی عصاره گیاه در محیط کشت مایع و افزودن سوسپانسیون میکروبی برای شش میکروب به طور جداگانه و قرار دادن شاهد مثبت و منفی اثرات ضدمیکروبی مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظت ماده ضدمیکروبی که از رشد باکتری جلوگیری کرده و در مقایسه با کنترل منفی به طور ظاهری کدورتی نداشت به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد MIC (Minimun Inhibition Concentration) تعیین گردید (۱۰،۱۲).

نتایج

در این قسمت به بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی به روش بیواتوگرافی تعلیقی، عصاره‌های آبی و متانولی گیاهان فوق در غلظت‌های مختلف بر روی میکروارگانیسم‌های مورد نظر به روش سیلندر ـ پلیت و رقت - لوله می‌پردازیم.

روش بیواتوگرافی تعلیقی

۱- اسانس مریم‌گلی ایرانی

پس از انجام آزمایشات مربوطه اثر ضدمیکروبی در Rf=۰/۸۵-۱/۰ روی اشرشیاکولی و در Rf=۰-۰/۴۰ روی استافیلوکوک طلایی و در Rf=۰/۲۰-۰/۳۰ روی کلبسیلاپنومونیه و در Rf=۰/۶۵-۰/۶۹ روی باسیلوس سابتیلیس و در Rf=۰-۰/۱۰ روی پسودوموناس آئروژینوزا مشاهده گردید (جدول ۱).

۲- اسانس مریم گلی آذربایجانی

اثر ضدمیکروبی در Rf=۰-۰/۲۲ روی اشرشیاکولی و در Rf=۰-۰/۱۳ و Rf=۰/۶۶-۰/۷۷ روی استافیلوکوک طلایی و در Rf=۰-۰/۱۰ و Rf=۰/۴۴-۰/۵۵ روی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و Rf=۰/۴۸-۰/۵۵ روی باسیلوس سابتیلیس آشکار شد. این اسانس روی کلبسیلاپنومونیه و پسودومونا آئروژینوزا اثر ضدمیکروبی نشان نداد (جدول ۱).

روش سیلندر ـ پلیت

۱- عصاره آبی مریم‌گلی ایرانی

پس از انجام آزمایش در غلظت ۱/۵۶۲mg/ml اثر ضدمیکروبی روی هیچ میکروبی دیده نشد.

در مورد این عصاره در غلظت ۳/۱۲۵mg/ml قطر هاله عدم رشد فقط روی استافیلوکوک طلایی به میزان ۱۰ میلی‌متر به دست آمد. قطر هاله عدم رشد در غلظت ۶/۲۵ روی اشرشیاکولی ۷/۵ میلی‌متر و روی کلبسیل اپنومونیه ۸/۲ میلی‌متر و روی باسیلوس سابتیلیس ۱۰ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در غلظت ۲۵mg/ml قطر هاله عدم رشد

روی استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۸/۴ میلی‌متر مشاهده شد. پسودوموناآئروژینوزا فقط در غلظت ۵۰mg/ml هاله‌ای به میزان ۸/۵ میلی‌متر را نشان داد و در این غلظت بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد بر روی استافیلوکوک طلایی به اندازه ۱۷/۱ میلی‌متر بود (جدول ۲).

جدول ۱: بررسی *Rf* ترکیبات ضدمیکروبی موجود در گیاهان موردنظر به روش بیواتوگرافی تعلیقی

سوش / گیاه	اشرشیاکولی	استافیلوکوک طلایی	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	کلبسیلا پنومونیه	پسودوموناآئروژینوزا	باسیلوس سابتیلیس
اسانس مریم گلی ایرانی	۰/۸۵–۱/۰	۰–۰/۴۰	—	–۰/۲۰–۰/۳۰	۰–۰/۱۰	۰/۶۵–۰/۶۹
اسانس مریم گلی آذربایجانی	۰–۰/۲۲	۰–۰/۱۳ ۰/۶۶–۰/۷۷	۰–۰/۱۰ ۰/۴۴–۰/۵۵	—	—	۰/۴۸–۰/۵۵

جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی متر) عصاره آبی گیاهان موردنظر روی میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش به روش سیلندر ـ پلیت پس از سه بار آزمایش

نام گیاه	سوش / غلظت mg/ml	اشرشیا کولی	استافیلوکوک طلایی	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	کلبسیلا پنومونیه	پسودوموناآئروژینوزا	باسیلوس سابتیلیس
مریم گلی ایرانی	۱/۵۶۲	—	—	—	—	—	—
	۳/۱۲۵	—	۱۰/۰±۰/۶۳	—	—	—	—
	۶/۲۵	۷/۵±۰/۵۷	۱۱/۸±۰/۵۰	—	۸/۲ ±۰/۶۶	—	۱۰/۰ ±۰/۶۵
	۱۲/۵	۸/۵±۰/۴۴	۱۳/۵±۰/۴۳	—	۹/۴±۰/۶۲	—	۱۱/۹±۰/۴۴
	۲۵	۹/۶±۰/۵۵	۱۵/۳±۰/۷۴	۸/۴±۰/۵۷	۱۱/۰±۰/۵۲	—	۱۳/۸±۰/۷۰
	۵۰	۱۰/۷±۰/۵۶	۱۷/۱±۰/۶۶	۱۰/۱±۰/۶۸	۱۲/۵±۰/۷۰	۸/۵±۰/۷۳	۱۵/۸±۰/۷۲
مریم گلی آذربایجانی	۱/۵۶۲	—	—	—	—	—	—
	۳/۱۲۵	—	۹/۴±۰/۵۲	—	—	—	۸/۸±۰/۸۳
	۶/۲۵	۷/۷±۰/۵۶	۱۱/۲±۰/۵۴	۹/۱±۰/۵۱	—	—	۱۰/۴±۰/۷۲
	۱۲/۵	۹/۳±۰/۵۹	۱۳/۰±۰/۷۲	۱۰/۹±۰/۸۳	—	—	۱۱/۹±۰/۵۵
	۲۵	۱۱/۰±۰/۶۰	۱۴/۷±۰/۵۷	۱۲/۶±۰/۴۸	—	—	۱۳/۴±۰/۶۶
	۵۰	۱۲/۷±۰/۶۷	۱۶/۵±۰/۴۰	۱۴/۳±۰/۴۰	—	—	۱۴/۹±۰/۷۰
جنتامایسین ۱/۲۵µg/ml		۲۷/۶±۰/۵۸	۲۶/۲±۰/۴۱	۲۲/۳±۰/۵۹	۲۷/۸±۰/۴۸	۱۷/۲±۰/۶۳	۳۴/۰±۰/۶۹

جدول ۳: میانگین قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی متر) عصاره متانولی گیاهان موردنظر و مقایسه با جنتامایسین روی میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش به روش سیلندر ـ پلیت پس از سه بار آزمایش

نام گیاه	سوش / غلظت mg/ml	اشرشیاکولی	استافیلوکوک طلایی	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	کلبسیلا پنومونیه	پسودوموناآئروژینوزا	باسیلوس سابتیلیس
مریم گلی ایرانی	۱/۵۶۲	—	—	—	—	—	—
	۳/۱۲۵	—	۱۲/۰±۰/۴۸	—	—	—	۷/۵±۰/۷۰
	۶/۲۵	۷/۸±۰/۷۳	۱۴/۶±۰/۷۵	۷/۰±۰/۶۲	۱۱/۰±۰/۸۱	—	۹/۶±۰/۴۶
	۱۲/۵	۱۰/۸±۰/۴۰	۱۷/۱±۰/۶۳	۹/۴±۰/۶۶	۱۲/۲±۰/۸۳	۷/۱±۰/۸۱	۱۱/۷±۰/۷۱
	۲۵	۱۳/۰±۰/۵۵	۱۹/۶±۰/۵۷	۱۱/۸±۰/۵۵	۱۳/۵±۰/۷۸	۷/۸±۰/۵۴	۱۳/۸±۰/۴۷
	۵۰	۱۵/۱±۰/۵۸	۲۲/۱±۰/۷۰	۱۴/۲±۰/۷	۱۴/۸±۰/۵۸	۸/۶±۰/۴۰	۱۵/۹±۰/۴۳
مریم گلی آذربایجانی	۱/۵۶۲	—	—	—	—	—	—
	۳/۱۲۵	۷/۲±۰/۶	۱۲/۵±۰/۷۱	—	—	—	۱۰/۱±۰/۵۱
	۶/۲۵	۹/۷±۰/۷۳	۱۴/۸±۰/۵۳	۱۱/۵±۰/۵۹	—	—	۱۲/۴±۰/۴۴
	۱۲/۵	۱۲/۲±۰/۴۰	۱۷/۰ ±۰/۵۳	۱۴/۷±۰/۴۰	—	—	۱۴/۶±۰/۵۹
	۲۵	۱۴/۶±۰/۸۳	۱۹/۱±۰/۷۴	۱۷/۶±۰/۷۵	—	—	۱۶/۹±۰/۸۳
	۵۰	۱۷/۱±۰/۴۴	۲۱/۲±۰/۷۰	۲۰/۷±۰/۸۰	—	—	۱۹/۱±۰/۴۰
جنتامایسین ۱/۲۵µg/ml		۲۷/۶±۰/۵۸	۲۶/۲±۰/۴۱	۲۲/۳±۰/۵۹	۲۷/۸±۰/۴۸	۱۷/۲±۰/۶۳	۳۴/۰±۰/۶۹

۲- عصاره متانولی مریم‌گلی ایرانی

پس از انجام آزمایش در غلظت ۱/۵۶۲mg/ml هاله عدم رشد مشاهده نشد. در غلظت ۳/۱۲۵mg/ml قطر هاله عدم رشد روی استافیلوکوک طلایی و باسیلوس سابتیلیس به ترتیب ۱۲/۰ و ۷/۵ میلی‌متر به دست آمد. قطر هاله عدم رشد در غلظت ۶/۲۵mg/ml روی اشرشیاکولی ۷/۸ میلی‌متر و روی کلبسیلاپنومونیه ۱۱/۰ میلی‌متر و روی استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۷/۰ میلی‌متر و در غلظت ۱۲/۵mg/ml روی پسودوموناس آئروژینوزا ۷/۱ میلی‌متر بدست آمد. در غلظت ۵۰mg/ml بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد بر روی استافیلوکوک طلایی ۲۲/۱ میلی‌متر مشاهده شد (جدول ۳).

۳- عصاره آبی مریم‌گلی آذربایجانی

در غلظت ۱/۵۶۲mg/ml روی میکروارگانیسم‌ها اثر ضدمیکروبی پدیدار نشد. میزان قطر هاله عدم رشد در غلظت ۳/۱۲۵ mg/ml روی استافیلوکوک طلایی ۹/۴ میلی‌متر و باسیلوس سابتیلیس ۸/۸ میلی‌متر و در غلظت ۶/۲۵mg/ml روی اشرشیاکولی ۷/۷ میلی‌متر و استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۹/۱ میلی‌متر بود. این عصاره بر روی دو سوش میکروبی کلبسیلاپنومونیه و پسودوموناآئروژینوزا تأثیر نداشت. در غلظت ۵۰ mg/ml روی استافیلوکوک طلایی بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد مشاهده شد که ۱۶/۵ میلی‌متر بود (جدول ۲).

٤- عصاره متانولی مریم گلی آذربایجانی

در غلظت ۱/۵۶۲ mg/ml روی هیچ کدام از میکروارگانیسم‌ها اثر ضدمیکروبی مشاهده نشد. این عصاره در غلظت۳/۱۲۵ mg/ml اثر ضدمیکروبی خود را با بروز هاله عدم رشد روی سه میکروب اشرشیاکولی به قطر ۷/۲ میلی‌متر، استافیلوکوک طلایی به قطر ۱۲/۵ میلی‌متر و باسیلوس سابتیلیس به قطر ۱۰/۱ میلی‌متر

جدول ٤: حداقل غلظت عصاره‌های آبی و متانولی دو گیاه مریم‌گلی ایرانی و آذربایجانی برای ممانعت از رشد ٦ میکروارگانیسم مورد آزمایش به روش رقت _لوله

گیاه	سوش / عصاره	اشرشیاکولی	استافیلوکوک طلایی	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	کلبسیلا پنومونیه	پسودوموناآئروژینوزا	باسیلوس سابتیلیس
مریم گلی ایرانی	عصاره آبی	۶/۲۵	۶/۲۵	۲۵	۶/۲۵	۵۰	۶/۲۵
	عصاره متانولی	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۳/۱۲۵
مریم گلی آذربایجانی	عصاره آبی	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۳/۱۲۵	>۵۰	>۵۰	۶/۲۵
	عصاره متانولی	۳/۱۲۵	۳/۱۲۵	۶/۱۲۵	>۵۰	>۵۰	۳/۱۲۵

تمامی غلظت‌ها بر حسب mg/ml می‌باشند.

آشکار کرد. در غلظت ۶/۲۵mg/ml هاله عدم رشد روی استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۱۱/۵ میلی‌متر بود. این عصاره بر روی کلبسیلاپنومونیه و پسودوموناآئروژینوزا اثر ضدمیکروبی نداشت. در غلظت mg/ml ۵۰ بزرگترین قطر هاله عدم رشد روی استافیلوکوک طلایی مشاهده گردید و ۲۱/۲ میلی‌متر بود. (جدول ۳).

روش رقت - لوله

۱- عصاره آبی مریم گلی ایرانی

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود MIC این عصاره بر روی اشرشیاکولی، استافیلوکوک طلایی، کلبسیلاپنومونیه و باسیلوس سابتیلیس برابر mg/ml ۶/۲۵ و روی استافیلوکوک اپیدرمیدیس برابر mg/ml ۲۵ بود در حالی که روی پسودوموناآئروژینوزا برابر mg/ml ۵۰ بوده است.

۲- عصاره متانولی مریم‌گلی ایرانی

MIC عصاره متانولی گیاه مریم‌گلی ایرانی بر روی شش سوش میکروبی در جدول ۴ آمده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود MIC این عصاره روی اشرشیاکولی، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و کلبسیلاپنومونیه برابر mg/ml ۶/۲۵ بوده است. در حالی که روی استافیلوکوک طلایی و باسیلوس سابتیلیس ۳/۱۲۵mg/ml و روی پسودوموناآئروژینوزا برابر ۱۲/۵mg/ml بود.

۳- عصاره آبی مریم‌گلی آذربایجانی

با توجه به جدول ۴، MIC عصاره آبی این گیاه روی اشرشیاکولی و استافیلوکوک اپیدرمیدیس برابر ۶/۲۵mg/ml و روی استافیلوکوک طلایی و باسیلوس سابتیلیس mg/ml ۳/۱۲۵ و روی کلبسیلاپنومونیه و پسودوموناآئروژینوزا اثر ضدمیکروبی ظاهر نساخت.

٤- عصاره متانولی مریم‌گلی آذربایجانی

با توجه به جدول ۴، MIC عصاره متانولی این گیاه روی اشرشیاکولی، استافیلوکوک طلایی و باسیلوس سابتیلیس برابر mg/ml ۳/۱۲۵ و روی استافیلوکوک اپیدرمیس ۶/۲۵mg/ml بود، در حالی که روی کلبسیلاپنومونیه و پسودوموناآئروژینوزا هیچگونه اثر ضدمیکروبی نشان نداد.

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، ۸۰٪ از مردمی که در کشورهای توسعه یافته زندگی می‌کنند کم و بیش برای درمان از گیاهان دارویی نیز استفاده می‌نمایند. این مسئله سبب می‌گردد تا بررسی دقیق‌تری در مورد اثرات درمانی و بی‌خطر بودن مصرف گیاهان دارویی، انجام شود. در این میان ایجاد مقاومت میکروبی روزافزون نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موجود سبب می‌گردد در جهت یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید، گیاهان نیز مورد بررسی قرار گیرند.

گیاهان دارای اثرات ضدمیکروبی با مکانیسم‌های مختلف و حتی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها رشد باکتری‌ها را

مهار می‌کنند و این امر لزوم تحقیقات جامع‌تر در حیطه گیاهان دارویی را گوشزد می‌نماید. این مسئله افزایش روزافزون مقالات انتشار یافته در زمینه خصوصیات ضدمیکروبی گیاهان را توجیه می‌کند (۱۱).

گیاهان خانواده نعناع و علی‌الخصوص جنس *Saliva* (مریم‌گلی) به سبب وجود ترکیبات ترپنوئیدی گوناگون، اسانس و ترکیبات فنلی به خصوص فلاونوئیدها از لحاظ اثرات ضدمیکروبی بسیار مورد توجه می‌باشند. برای مثال در بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره فلاونوئیدی گیاه *S.palaestina* فلاونوئید *Cirsimaritin* آن، اثرات ضدمیکروبی بالایی روی استافیلوکوک آرئوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، اشرشیاکولی، کلبسیلاپنومونیه، پروتئوس ولگاریس و پسودوموناآئروژینوزا داشته است (۱۶). اسانس *S.ringens* که درصد بالایی از ۱ و ۸ ـ سینئول و آلفاپی‌نن دارد روی ۶ سوش میکروبی معمول و ۳ سوش قارچ بیماری‌زا اثرات ضدمیکروبی قابل توجهی نشان داده (۲۱) و اسانس *S.tomentosa* با دارابودن درصد بالایی از ۱ و ۸- سینئول (۱۷٪)، روی باکتری‌های معمول گرم مثبت و گرم منفی غیر از پسودوموناآئروژینوزا اثرات مهار رشد قابل ملاحظه‌ای ظاهر ساخته (۱۳) و اسانس *S.desoleana* و *S.slarea* که به ترتیب دارای بالاترین درصد مونوترپن‌های استری و مونوترپن‌های الکلی می‌باشند به شکل فرآورده موضعی، در حیوانات آزمایشگاهی اثر ضدمیکروبی بهتری روی عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک طلایی، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و کاندیداآلبیکنس نشان داده‌اند (۱۷).

ترکیبات مختلف موجود در عصاره استونی گیاه *S.sclarea* شامل اسانس و دی‌ترپن‌ها روی استافیلوکوک طلایی، کاندیدا آلبیکنس و پروتئوس میرابلیس،اثر ضدمیکروبی داشته‌اند (۲۲)،در حالیکه عصاره آبی *S.triloba* به روش دیسک دیفوزیون، هیچ اثر ضدمیکروبی روی میکروارگانیسم‌های معمول نداشته است (۲۴).

دو گیاه بررسی شده یعنی *S.mirzayanii* و *S.atropatana* از لحاظ اثرات ضدمیکروبی اسانس به روش بیواتوگرافی تعلیقی و عصاره آبی که حاوی ترکیبات قطبی گیاه و عصاره متانولی که حاوی تمام مواد موجود در گیاه است، به روش سیلندر ـ پلیت و سپس جهت تعیین MIC، به روش رقت ـ لوله روی باکتری‌های استاندارد که عمدتاً مسئول بیماری‌های عفونی در انسان محسوب می‌شوند (استافیلوکوک طلایی، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، کلبسیلاپنومونیه، پسودوموناآئروژینوزا، باسیلوس سابتیلیس و اشرشیاکولی) مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج حاصله از بررسی اسانس این دو گیاه در مقایسه با سایر گیاهان جنس *Salvia* حاکی از این است که اکثر اسانس‌های گیاهان مذکور روی پسودوموناآئروژینوزا اثر قابل ملاحظه‌ای ندارند. در عین حال اثر اسانس مریم گلی ایرانی روی کلبسیلاپنومونیه و پسودوموناآئروژینوزا برخلاف سایر گونه‌ها قابل ملاحظه است، هرچند که اثری روی استافیلوکوک اپیدرمیدیس ندارد.

بنابراین با توجه به Rf ترکیبات مؤثر بر هر یک از میکروارگانیسم‌های مربوطه، با شناسایی ساختمان این ترکیبات به راحتی می‌توان ترکیب با اثر ضدمیکروبی مورد نظر را تحت بررسی قرار داد.

نتایج روش سیلندر ـ پلیت عصاره‌های آبی و متانولی دو گیاه مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی نشان می‌دهد که بر اساس روش آماری T-test با فرض احتمال خطای ۵٪ ($P<0/05$) قطر هاله‌های عدم رشد عصاره‌های متانولی بیش از قطر هاله‌های عدم رشد عصاره‌های آبی است و این اختلاف معنی‌دار می‌باشد. بر طبق نتیجه حاصله، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که مواد با اثرات ضدمیکروبی در هر گیاه وابسته به ساختمان خود می‌توانند قطبی یا غیرقطبی باشند و قطبیت حلال مورد استفاده برای استخراج مواد مؤثره گیاه بسیار مهم است (۱۱).

بنابراین عمده ترکیبات با اثرات ضدمیکروبی این دو گیاه، قطبیت بسیار بالایی ندارند که بتوانند توسط حلالی مثل آب کاملا استخراج شوند و به احتمال قوی چون ترکیبات اسانسی نیز توسط متانول استخراج می‌شوند اثرات ضدمیکروبی مذکور، عمدتاً مربوط به ترکیبات اسانسی این دو گیاه بوده و این مسئله توسط روش بیواتوگرافی تعلیقی اسانس این دو گیاه نیز تأیید شده است.

جهت تأیید نتایج حاصل از روش سیلندر - پلیت و همچنین تعیین MIC عصاره های مذکور از روش رقت - لوله در مورد عصاره آبی و متانولی هر دو گیاه استفاده شد و مشخص گردید عصاره متانولی مریم گلی ایرانی با حداقل غلظت ۳/۱۲۵mg/ml روی باسیلوس سابتیلیس و عصاره متانولی مریم‌گلی آذربایجانی با حداقل غلظت

۳/۱۲۵mg/ml روی اشرشیاکولی و باسیلوس سابتیلیس و استافیلوکوک طلایی مؤثر است. در همین غلظت عصاره آبی مریم‌گلی آذربایجانی نیز روی این دو میکروارگانیسم و باسیلوس سابتیلیس مؤثر می‌باشد که این اثر علاوه بر اینکه می‌تواند مربوط به ترکیبات اسانسی با حلالیت بیشتر در آب (لکه‌های ذکرشده با Rf بالاتر در سیستم حلال غیرقطبی اسانس در روش بیواتوگرافی، یعنی Rf محدود ۰/۶۶-۰/۷۷ و ۰/۴۴-۰/۵۵) باشد می‌توان آن را مربوط به ترکیبات فنلی قطبی موجود در عصاره آبی این گیاه نیز دانست.

اثرات ضدمیکروبی در هر سه روش همدیگر را تأیید نموده‌اند. با این تفاوت که در روش بیواتوگرافی علاوه بر سرعت کار، تا حدودی می‌توان با جداسازی و استخراج ماده در Rf موردنظر کار را اختصاصی‌تر نمود. مقایسه هاله‌های عدم رشد غلظت ۱/۲۵µg/ml جنتامایسین با عصاره‌های هر دو گیاه به وضوح نشان می‌دهد که اثر این دو گیاه به صورت عصاره تام که مخلوط بی‌شماری از مواد است بسیار کمتر از جنتامایسین است و اگر ترکیب با اثر ضدمیکروبی موجود در این عصاره‌ها جداسازی و خالص گردد، اثر قابل مقایسه‌تری با جنتامایسین خواهد داشت.

Summary

Antibacterial Activity Studies of *Salvia Mirzayanii and Salvia Atropatana* against Six Standard Gram Positive and Gram Negative Bacteria

Moshafi M.H., PhD[1], Mehrabani M., PhD.[2] and Zolhasab H., Pharm D[3].

1. Assistant Professor of Microbiology, 2. Assistant Professor of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences & Health Services, Kerman, Iran 3. Pharmacist

*In this study antimicrobial effects of **Salivia mirzayanii and Saliva atropatana** were evaluated against six gram-positive and gram-negative bacteria by immersion bioautography, cylinder plate and tube dilution methods separately. In bioautography method, essential oils of **Salvia mirzayanii and Salvia atropatana** were separated on silicagel TLC plates by toluene-ethyl acetate (93-7). In cylander plate and tube dilution method, methanolic (80%) and aqua extracts were taken by maceration method. After concentrating the extracts, they were dried, then the 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 and 1.562 mg/ml distilled water solution of the dried were used for searching antimicrobial effects. Essential oil and extract of **Salvia mirzayanii** against E.coli, S. aureus, K. pneumonia, B. subtilis and P. aeroginosa in different dilutions were effective and essential oil and extract of **Salvia atropatana** against E.coli, S. aureus, S. epidermidis and B. subtilis were effective too.*

***Key Words:** **Salvia mirzayanii, Salvia atropatana,** Imersion Bioautography, Cylinder plate, Dilution tube*

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2004; 11(2): 109-118

منابع

۱. اصیلی، جواد: بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس گیاه Platycladus orientali به روش بیواتوگرافی تعلیقی و رقت آگار. مقاله سمینار داروسازی مشهد، ۱۳۷۹.

۲. امامی، سیداحمد و اصیلی، جواد: بررسی فیتوشیمیایی مخروطیان بومی ایران و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس آنها. پایان نامه شماره ۶۴۴، دانشکده داروسازی مشهد، ۱۳۷۶.

۳. امین، غلامرضا: گیاهان دارویی سنتی ایران. نشر معاونت پژوهشی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، چاپ اول، جلد اول، ۱۳۷۰، ص ۳۱-۱.

۴. زرگری، علی: گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ چهارم، جلد سوم، ۱۳۶۹، ص ۵۳۸ و ۵۱۰.

۵. مجاب، فراز: چگونگی مطالعه و بررسی اثرات بیولوژیک گیاهان دارویی. ماهنامه دارویی رازی، ۱۳۷۲، شماره ۶، ص ۳۱-۲۴.

۶. مظفریان، ولی ا...: فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. فرهنگ معاصر، تهران، ۱۳۷۵، ص ۱۹۸.
۷. مهربانی، میترا: بررسی فیتوشیمیایی گیاه Salvia mirzayani. پایان‌نامه شماره ۲۴۱، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ۱۳۷۳.
۸. ناظم، محمد؛ راشد، طاهره و نادری نسب، محبوبه: باکتری‌شناسی آزمایشگاهی. مؤسسه چاپ و انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد، ۱۳۷۱.

9. Ali-Shytayeh MS, Yaghmour RM, Faidi YR, Salem K and Al-Nuri MA. Anitmicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J Ethnopharmacol* 1998; 60(3): 265-271.
10. Baran EJ and Finegold SM: Baily & Scott's diagnostic microbiology. 11th ed., St Louis, The CV mosby Company, 2002; PP 230-256.
11. Eloff JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants *J Ethnopharmacol* 1998; 60(1): 1-8.
12. Fabry W, Okemo PO, Ansorg R. Antibacterial activity of East African medicinal plats. *J Ethnopharmacol* 1998; 60(1): 79-84.
13. Haznedaroglu MZ, Karabay NU and Zeybek U. Antibacterial activity of Salvia tomentosa essential oil. Fitoterapia 2001; 72(7): 829-831.
14. Moghaddam FM, Amiri R, Alam M, Hossain MB and Vander Helm D. Structure and absolute stereochemistry of salvimirzacolide, a new sesterterpene from Salvia mirzayanii. *J Nat Prod* 1998; 61(2): 279-281.
15. Mirza M and Ahmadi L. Composition of the essential oil of Salvia atropatana Bunge. *J Essent OilRes* 2000; 12: 575-576.
16. Miski M, Ulubelen A, Johansson C and Mabry TJ. Antibacterial activity studies of flavonoids from Salvia palaestina. *J Nat Prod* 1983; 46(6): 874-875.
17. Peana AT, Moretti MD and Juliano C. Chemical composition and antimicrobial action of the essential oils of Salvia desoleana and S. sclerea. *Planta Med* 1999; 65(8): 752-754 .
18. Perumal-Samy R, Ignacimuthu S and Sen A. Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. *J Ethnopharmacol* 1998; 62(2): 173-182.
19. Rechinger KH: Flora Iranica. Austria, Akademishe Druck – U, Verlag Sanstalt, 1987; P150
20. Rios JL, Recio MC and Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 1988; 23(2-3): 127-149.
21. Tzakou O, Pitarokili D, Chinou IB and Harvala C. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Salvia ringens. *Planta Med* 2001; 67(1): 81-83.
22. Ulubelen A, Topcu G, Eris C, *et al*. Terpenoids from Salvia sclarea. Phytochemistry 1994; 36(4): 971-974.
23. Wagner H and Bladt S: Plant drug analysis. Berlin, Springer, 1996; P166.
24. Yildirim A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur OF and Bilaloglu V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (Tilia argentea Desf ex Dc), sage (Salvia trilobal) and black tea (Camelia sinensis). *J Agric Food Chem* 2000; 48(10): 5030-5034.