

In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Properties of Essential Oils and Methanolic Extracts of Four Species of *Salvia L.*

Maryam Iravani, Roya Mahinpour, Zohreh Zahraei *, Zeinab Toluei

Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, Iran

(Received:2018/12/15

Accept: 2019/05/18)

Abstract

Background: Today, due to increased use of chemical drugs and spread of microbial resistance to antibiotics as well as the side effects of drug consumption, the identification and introduction of plant species with medicinal and antimicrobial properties have widely been regarded important. Different species of *Salvia L.* have been used in traditional and modern medicine for therapeutic purposes. In the current study, the antimicrobial activity of the essential oils and methanolic extracts of aerial parts of four species of *Salvia* contains *S. syriaca L.* and *S. ceratophylla L.* and two populations of *S. reuterana Boiss.*, and two populations of *S. limbata C.A. Mey.* from Kashan region, were investigated.

Materials and Methods: An experimental research was conducted in in vitro conditions. Methanolic extract of samples was prepared using soxhlet apparatus. The essential oils were extracted using hydrodistillation using Clevenger method. Antimicrobial activity of this species was investigated using the Agar well diffusion technique and MIC and MBC tests.

Findings: The essential oils and methanolic extracts of these sample plants showed antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* in 30 mg/ml. In addition, extract of *S. reuterana* and essential oil of *S. limbata* from Dorreh inhibit the growth of *Candida albicans*.

Conclusion: It seems that considering the antimicrobial properties of some of the extracts and essential oils observed in the current study, they can be used as substitutions for the current antibiotics after more extensive graduate studies are performed.

Keywords: *Salvia*; Antimicrobial properties; Methanolic extracts; Well diffusion; Essential oils

* Corresponding Author: Zohreh Zahraei / Roya Mahinpour
Email: zahraei@kashanu.ac.ir

بررسی خواص ضد میکروبی اسانس و عصاره متانلی چهار گونه مریم گلی *Salvia L.* در شرایط آزمایشگاهی

مریم ایروانی^۱، رویا مهین پور^۱، زهره زهرایی^{۱*}، زینب طلوعی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۲۸

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۹/۲۴

چکیده:

سابقه و هدف: امروزه به دلیل افزایش استفاده از داروهای شیمیایی و گسترش مقاومت میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک (صناعی)، همچنین عوارض جانبی مصرف داروها، شناسایی و معرفی گونه‌های گیاهی با خواص دارویی و ضد میکروبی اهمیت زیادی دارد. انواع گونه‌های مریم گلی نیز در طب سنتی و مدرن برای اهداف درمانی استفاده شده‌اند. در این مطالعه خواص ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های متانلی چهار گونه از جنس *Salvia* شامل گونه‌های *S. ceratophylla L.*، دو جمعیت از گونه *S. reuterana Boiss.*، دو جمعیت از گونه *S. limbata C.A. Mey.* و *S. syriaca L.* از منطقه کاشان (اصفهان، ایران) ارزیابی شد.

مواد و روش‌های بررسی: در این مطالعه که به روش تجربی - آزمایشگاهی انجام شد، عصاره‌های متانلی گونه‌های مطالعه شده با روش سوکسله تهیه شدند. اسانس‌ها با استفاده از روش تقطیر با آب به وسیله دستگاه کلونجر اسانس گیری شد. خواص ضد میکروبی این گونه‌ها با روش انتشار در آگار و تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (*MIC*) و حداقل غلظت کشنده باکتری (*MBC*) بررسی شد.

یافته‌ها: اسانس‌ها و عصاره‌های متانلی این نمونه‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus epidermidis* و *Bacillus subtilis* در غلظت 30 mg/ml اثر ضد میکروبی نشان دادند. در ضمن عصاره *S. reuterana* و اسانس *S. limbata* از دره نیز سبب مهار رشد *Candida albicans* شدند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد با توجه به خواص ضد میکروبی برخی از عصاره‌ها و اسانس‌هایی که در این مطالعه مشاهده شد، می‌توان از آن‌ها پس از مطالعه‌های تکمیلی گسترده‌تر به عنوان جایگزین داروهای ضد میکروبی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: مریم گلی، خواص ضد میکروبی، انتشار چاهک، عصاره متانلی، اسانس

مقدمه:

در نیمه دوم قرن بیستم، طب سنتی در مراقبت‌های بهداشتی به دلیل توسعه مقاومت میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی و پتانسیل درمانی بالای گیاهان در درمان بیماری‌های عفونی و عوارض جانبی کمتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک (صناعی)، از سوی پژوهشگران پذیرش شد (۳).

امروزه اکثر داروهایی که به صورت شیمیایی در دسترس هستند، با الهام گرفتن از داروهای گیاهی اما به صورت مصنوعی در آزمایشگاه‌های داروسازی تهیه شده‌اند. طبق گزارش‌های انجام شده حدود نیم تا یک سوم از تمامی فرآورده‌های مصرف شده منشأ گیاهی دارند (۴).

علاوه بر موضوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی که استفاده از گیاهان را به عنوان راهی برای دستیابی به آنتی‌بیوتیک‌های جدید مطرح کرده است، در صنایع غذایی

طب سنتی از مدت‌ها پیش در درمان بیماری‌ها جایگاه ویژه‌ای داشته است. امروزه نیز استفاده از گیاهان به دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه و ترکیب‌های طبیعی مؤثر در آن‌ها برای تولید فرآورده‌های دارویی رو به افزایش است. یکی از کارهای مهمی که در زمینه گیاهان دارویی انجام می‌شود، بررسی فعالیت‌های ضد میکروبی گیاهان است (۱).

در ۴۰ سال اخیر تلاش‌های گسترده‌ای برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید شده است. همچنین عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی از نظر فعالیت ضد میکروبی بررسی شده‌اند. پژوهش‌ها در این زمینه نشان داده‌اند که اغلب اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان خواص ضد باکتری، ضد قارچی و ضد ویروسی دارند (۲).

نویسنده مسئول: زهره زهرایی / رویا مهین پور
پست الکترونیک: zahraei@kashanu.ac.ir

آب(مرک) خشک شدند. اسانس‌های حاصل تا زمان انجام آزمایش ضد میکروبی در ظروف تیره رنگ، به دور از نور، درون فریزر نگهداری شدند.

مشخصات هر باربومی نمونه‌های جمع‌آوری شده

نمونه گیاهی	مکان جمع آوری	ارتفاع	شماره هر باربومی	زمان جمع‌آوری
<i>Salvia syriaca L.</i>	کاشان- ازناوه	۲۶۹۰ متر	UKH*247	اردیبهشت ۱۳۹۳
<i>Salvia ceratophylla L.</i>	کاشان- ازناوه	۲۶۹۰ متر	UKH246	اردیبهشت ۱۳۹۳
<i>Salvia limbata C. A. Mey.</i>	کاشان- قزآن	۲۳۱۶ متر	UKH215	اردیبهشت ۱۳۹۳
<i>Salvia limbata C. A. Mey.</i>	کاشان- دره	۱۶۳۰ متر	UKH454	اردیبهشت ۱۳۹۳
<i>Salvia reuterana Boiss.</i>	کاشان- دره	۱۵۷۰ متر	UKH453	اردیبهشت ۱۳۹۳
<i>Salvia reuterana Boiss.</i>	کاشان- مرق	۲۰۵۶ متر	UKH700	خرداد ۱۳۹۳

*University of Kashan Herbarium

باکتری‌های بررسی شده:

انواع سویه‌های استفاده شده در این پژوهش، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و روی محیط نوترینت آگار کشت شدند. میکروارگانیسم‌های استفاده شده در این پژوهش سه نوع باکتری گرم مثبت شامل

Bacillus subtilis ATCC 6633

Staphylococcus aureus ATCC 29737

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

و پنج نوع باکتری گرم منفی شامل:

Shigella dysenteriae PTCC 1188

Klebsiella pneumonia ATCC 10031

Proteus vulgaris PTCC 1182

Salmonella paratyphi-A serotype ATCC 5702

Escherichia coli ATCC 10536

یک سویه مخمر به نام

Candida albicans ATCC 10231

و یک گونه قارچ به نام

Aspergillus niger ATCC 16404

تعیین قطر هاله عدم رشد با استفاده از روش چاهک‌گذاری:

در این پژوهش، اثر ضد میکروبی عصاره متانلی بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد آزمایشگاهی CLSI برای تعیین حساسیت میکروبی به روش انتشار در آگار از نوع چاهک‌گذاری بررسی شد. به این ترتیب که به وسیله پیپت پاستور چاهک‌هایی

نیز به دلیل استفاده از نگه‌دارنده‌های شیمیایی و گرایش منفی به استفاده از این نگه‌دارنده‌ها، استفاده از گیاهان به عنوان طعم‌دهنده و عوامل ضد میکروبی برای نگه‌داری مواد غذایی مطرح شده است (۵).

فلفل‌ها و فلاونوئیدها از جمله متابولیت‌های ثانویه و ترکیب‌های مهم گیاهی هستند که فعالیت ضد اکسیدانی و برخی از ویژگی‌های درمانی گیاهان به وجود آن‌ها بستگی دارد. ترکیب‌های فنلی اثرهای ضد میکروبی قابل توجهی نیز دارند (۲۶).

اسانس‌های گیاهی اثر مهارتی قابل توجهی بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا دارند. ترکیب‌های ضد میکروبی گیاهی اثرهای کشندگی و بازدارندگی قابل ملاحظه‌ای در برابر عوامل بیماری‌زا از خود نشان داده‌اند (۷، ۸). از جمله مواد طبیعی دارای خاصیت ضد میکروبی شامل ترکیب‌های فنلی، تانن، ۱،۸ سینئول، توچون، کامفر، تری ترپنوئید، کومارین و ... هستند که در قسمت‌های مختلف گیاهان نظیر ریشه، برگ، جوانه‌ها، نهال و پوست وجود دارند (۹، ۱۰).

تیره نعناع از بین گیاهان دارویی اهمیت فراوانی دارد. گونه‌های مفید این تیره برای درمان برخی از بیماری‌ها استفاده می‌شوند. مریم‌گلی گیاهی است علفی متعلق به تیره نعناعیان که اغلب در مناطق گرم و معتدل می‌روید. بیش از هزار سال پیش از مریم‌گلی به عنوان گیاه دارویی استفاده شده است. از جنس مریم‌گلی ۹۰۰ گونه در جهان وجود دارد. این گیاهان علفی، یک‌ساله یا چندساله بوده و برخی علف هرز مزارع هستند. ۱۷ گونه از این جنس، بومی ایران است. کلمه *Salvia* از واژه یونانی *Salvere* به معنای بهبود بخشیدن یا شفادهنده مشتق شده است که نشان‌دهنده کاربرد دارویی فراوان گونه‌های مختلف این جنس است (۱۱، ۱۲). مریم‌گلی در گذشته برای تقویت روان، بدن و افزایش طول عمر استفاده می‌شد. همچنین این گیاه در طب سنتی به عنوان ضدسم، ضد میکروب، ضدتومور، ضد اکسیدان، ضد ماتیسم و آسم، ضد التهاب، ضد درد، کاهش‌دهنده فشارخون و قندخون، مسکن دردهای گوارشی و ... استفاده می‌شود (۱۳، ۱۴).

از آنجا که در گیاهان دارویی و معطر رشد و بیوسنتز متابولیت‌های فعال گیاه به شدت تحت تاثیر شرایط اکولوژیکی و محیطی است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین و مقایسه خواص ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های متانلی شش نمونه گیاه دارویی از جنس مریم‌گلی از مناطق مختلف کاشان انجام شد. گونه‌های ذکر شده در این مناطق از نظر خواص ضد میکروبی برای اولین بار بررسی شده‌اند.

روش بررسی:

با توجه به اهمیت جنس مریم‌گلی از نظر گیاهان دارویی و آثار زیستی متعدد و پراکنش خوبی که این جنس در شهرستان کاشان دارد و تنوع گونه‌های موجود و نبود مطالعه‌ای برای بررسی مقایسه‌ای آثار زیستی این گونه‌ها در این منطقه، این مطالعه ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه چهارگونه از جنس مریم‌گلی از مناطق اطراف کاشان (اصفهان، ایران) در اردیبهشت و خرداد ۱۳۹۳ جمع‌آوری شد (جدول ۱). پس از تهیه و شناسایی گیاهان با استفاده از فلور ایران و فلور ایرانیکا (۱۵، ۱۶)، نمونه‌ها در هر باربومی دانشگاه کاشان نگهداری و تایید شدند.

استخراج عصاره متانلی:

اندام‌های هوایی شامل برگ، سرشاخه‌های گل و ساقه‌های آن‌ها در شرایط مناسب در مجاورت هوا و در سایه خشک و پس از تمیز کردن گونه‌ها از هر گونه آلودگی، نمونه‌ها آسیاب شدند. استخراج عصاره با استفاده از ۲۰ گرم از پودر بخش‌های هوایی گیاه و ۳۰۰ میلی‌لیتر حلال متانل (مرک) به مدت هشت ساعت با دستگاه سوکسله (schott/duran/Germany) انجام شد (۱۷). سپس با هدف تغلیظ عصاره حاصل، از دستگاه تبخیرکننده دوار (Buchi/Germany) در شرایط خلأ و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. عصاره تغلیظ‌شده برای خشک شدن کامل به مدت ۴۸ ساعت در آون قرار داده شد. سپس از عصاره حاصل برای انجام آزمایش‌های میکروبی استفاده شد.

استخراج اسانس:

در این پژوهش، نمونه‌ها پس از پودر شدن اندام‌های هوایی گیاه، به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شدند. به این ترتیب که مقدار ۱۰۰ گرم از بخش‌های پودر شده در دستگاه کلونجر (ISOLAB/Germany) و بر اساس فارماکوپه بریتانیا به مدت چهار تا پنج ساعت اسانس‌گیری شد (۱۸). اسانس‌های حاصل به کمک سدیم سولفات بدون

جدول ۲. نتایج قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) عصاره‌های متانلی (میانگین \pm انحراف معیار)

عصاره	سوش میکروبی			
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>S. limbata</i> 454	-	۱۰/۳ \pm ۰/۵	۱۴ \pm ۰/۵	۱۲ \pm ۲
<i>S. reuterana</i> 453	۱۰/۳ \pm ۰/۵	۱۰ \pm ۱	۱۲/۶۶ \pm ۱/۵	۱۱ \pm ۱
<i>S. reuterana</i> 700	-	۱۲/۶ \pm ۱/۱۵	۱۲ \pm ۱	۱۳ \pm ۱
<i>S. ceratophylla</i> 246	-	۱۷/۶۶ \pm ۰/۵	۲۲/۳۳ \pm ۱/۵۲	۱۲/۶۶ \pm ۱/۵
<i>S. syriaca</i> 247	-	۱۱/۳ \pm ۱/۵	۱۰/۳ \pm ۰/۵	۲ \pm ۱۲

منظم از هم و فاصله مناسب از دیواره پلیت به قطر تقریبی شش میلی‌متر ایجاد شد و سپس از سوسپانسیون میکروبی استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند هر سویه به طور جداگانه روی محیط مولر هینتون آگار و دکستروز آگار، به روش کشت چمنی، کشت داده شد. اسانس‌ها و عصاره‌های متانلی هر نمونه گیاهی با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و از هر کدام از محلول‌های آماده شده حدود ۱۰ میکرولیتر در چاهک‌ها تلقیح شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری و به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای *C. albicans* و *A. niger* قرار گرفت. از دی‌متیل‌سولفوکسید (مرک) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و ریفامپین برای باکتری‌ها و نیستاتین برای قارچ‌ها برای مقایسه قدرت مهارکنندگی آن‌ها با عصاره متانلی استفاده شد. در نهایت فعالیت ضد میکروبی عصاره با اندازه‌گیری دقیق هاله عدم رشد تعیین شد. برای هر سویه این آزمایش سه بار تکرار و نتایج به

جدول ۳. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های متانلی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

عصاره	<i>B. subtilis</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC*	MIC**
<i>S. limbata</i> 454	۱۰۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۱۲۵	<۲۰۰۰	۲۵۰	-	-
<i>S. reuterana</i> 453	۲۵۰	۱۲۵	۱۰۰۰	۲۵۰	۱۰۰۰	۱۲۵	<۲۰۰۰	۵۰۰
<i>S. reuterana</i> 700	۱۰۰۰	۱۲۵	-	-	۲۰۰۰	۲۵۰	-	-
<i>S. ceratophylla</i> 246	۱۰۰۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۲۰۰۰	۱۲۵	-	-
<i>S. syriaca</i> 247	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	<۲۰۰۰	۱۲۵	-	-

صورت میانگین \pm انحراف معیار محاسبه شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد:

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای میکروارگانیسم‌های حساس به عصاره‌ها و اسانس‌ها با روش رقیق‌سازی میکرو محاسبه شد (۱۹). غلظت اولیه دو میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انتخاب شد. سپس رقت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از غلظت اولیه تهیه شد. سپس میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استریل تهیه شد. به هر یک از چاهک‌های این میکروپلیت، ۹۵ میکرولیتر محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB)، ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی با رقت ۰/۵ مک‌فارلند و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های گوناگون عصاره افزوده شد. در ردیف شاهد نیز ۱۹۵ میکرولیتر محیط کشت TSB و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی با رقت ۰/۵ مک‌فارلند افزوده شد. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. با توجه به کدورت ایجاد شده در اثر رشد باکتری در چاهک‌های میکروپلیت، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) تعیین شد.

تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتریایی:

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتریایی، پنج میکرولیتر از محتویات چاهک‌هایی که باکتری در آن‌ها رشد نکرده بود (غلظت اولیه تا MIC)، به محیط نوترینت آگار تلقیح شد و به

* حداقل غلظت کشندگی

** حداقل غلظت مهارکنندگی رشد

در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک) و سابوراد دکستروز آگار (مرک) با فاصله

جدول ۴. نتایج قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) اسانس‌ها (میانگین \pm انحراف معیار)

اسانس	سوش میکروبی			
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>S. limbata</i> 215	-	-	-	۱۲ \pm ۰/۵۷
<i>S. limbata</i> 454	۱۴/۳ \pm ۰/۵	۱۰/۶ \pm ۰/۵	-	-
<i>S. reuterana</i> 453	-	-	۱۱ \pm ۱	۱۲ \pm ۰/۵۷
<i>S. reuterana</i> 700	-	۱۰/۶ \pm ۰/۵۷	-	۱۱ \pm ۱
<i>S. ceratophylla</i> 246	-	-	۱۰/۶ \pm ۰/۵۷	-
<i>S. syriaca</i> 247	-	۱۱ \pm ۰/۵	۱۲ \pm ۱	-

جدول ۵. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌ها (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>B. subtilis</i>		سوش میکروبی
MBC*	MIC**	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	اسانس
-	-	-	-	-	-	۵۰۰	۶۲/۵	<i>S.limbata</i> 215
<۲۰۰۰	۲۵۰	۱۰۰۰	۲۵۰	-	-	-	-	<i>S.limbata</i> 454
-	-	-	-	۱۰۰۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	<i>S.reuterana</i> 453
-	-	۱۲۵	۱۲۵	-	-	۱۲۵	۱۲۵	<i>S.reuterana</i> 700
-	-	-	-	۱۰۰۰	۵۰۰	-	-	<i>S.ceratophylla</i> 246
-	-	۲۰۰۰	۲۵۰	-	-	۲۰۰۰	۱۲۵	<i>S.syrriaca</i> 247

*حداقل غلظت کشندگی
**حداقل غلظت مهارکنندگی رشد

عصاره *S. reuterana* و اسانس *S. limbata* از دره نیز به ترتیب باعث مهار رشد *C. albicans* شدند. نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره‌ها و اسانس‌ها در این مطالعه هیچ‌گونه فعالیت ضد میکروبی در این غلظت به

جدول ۶ نتایج آنتی‌بیوگرام شاهد‌های آنتی‌بیوتیکی روی سوش‌های میکروبی *هاله عدم رشد

باکتری‌های گرم منفی نشان ندادند.

به نظر می‌رسد عصاره‌ها اثر ضد میکروبی بیشتری در مقایسه با اسانس‌ها دارند. در ضمن با توجه به نتایج به‌دست آمده از آنتی‌بیوتیک‌ها (جدول ۶) فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها و اسانس‌ها متوسط تا خوب ارزیابی می‌شود. اثر ضد میکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های مختلف گیاهان دارویی بر میکروارگانیسم‌های متفاوت در مناطق مختلف گزارش شده است. در بررسی

سوش میکروبی	<i>C. albicans</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>B. subtilis</i>		آنتی‌بیوتیک
	IZ*	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	IZ	MIC	
جنتامایسین	-	-	۲۰/۳ ± ۰/۵	۵۰۰	۳۴/۳ ± ۰/۵	۵۰۰	۲۳/۶ ± ۲/۳	۵۰۰	
ریفامپین	-	-	۳۰ ± ۱	۲۵۰	۴۱/۶ ± ۰/۵	۲۵۰	۱۲/۳ ± ۰/۵	۱۵/۶	
نیستاتین	۳۳ ± ۰/۵	۱۲۵	-	-	-	-	-	-	

مدت ۲۴ ساعت در آنکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در معرض گرما قرار داده شد.

یافته‌ها:

نتایج ارزیابی خواص ضد میکروبی گونه‌های حاضر در مطالعه نشان داد که اسانس و عصاره متانلی اندام هوایی این گونه‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت (*B. subtilis*، *S. epidermidis*، *S. aureus*) اثر ضد میکروبی دارند. در این بررسی هاله عدم رشد برای عصاره‌های متانلی بین ۱۰ تا ۲۲/۳۳ میلی‌متر و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد بین ۱۲۵ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (جدول ۲) و (جدول ۳). در همین شرایط برای اسانس‌ها نیز هاله عدم رشد بین ۱۰ تا ۱۲ میلی‌متر و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد بین ۶۲/۵ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشخص شد (جدول ۴ و ۵). در ضمن عصاره *S. reuterana* و اسانس *S. limbata* از دره بر *C. albicans* نیز اثر داشته و هاله عدم رشد به ترتیب ۱۰ و ۱۵ میلی‌متر و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را ایجاد کردند. عصاره *S. ceratophylla* بیشترین حساسیت ضد میکروبی را نسبت به سایر گونه‌ها از نظر هاله عدم رشد نشان داد. در حالی که اسانس این گونه فعالیت ضد میکروبی کمتری داشت.

بحث:

اسانس‌ها و عصاره‌های متانلی این نمونه‌های گیاهی بر باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus*، *S. epidermidis* و *B. subtilis* اثر ضد میکروبی نشان دادند. در ضمن

منابع این اثر ضد میکروبی را به فنلیک اسید، پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدهای گیاهان مختلف نسبت داده‌اند. تعداد گروه‌های هیدروکسیل و محل آن‌ها روی حلقه فنلی از دلایل ایجاد اثر ضد میکروبی است که ارتباط مستقیمی بین تعداد گروه هیدروکسیل و سمیت آن روی میکروارگانیسم‌ها دارد. فلاونوئیدها و فلاونول‌ها نیز با ساختار فنلی خود اثر ضد میکروبی دارند. اثر ضد میکروبی آن‌ها به‌نظر می‌رسد به دلیل ترکیب پروتئین خارج سلولی، تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی و ایجاد اختلال در غشای سلول میکروارگانیسم‌ها باشد (۲۰، ۶).

اسماعیلی و همکاران در سال ۲۰۰۸ فعالیت ضد باکتریایی اسانس برگ، ساقه و گل گیاه *S. reuterana* را روی هفت سویه میکروبی بررسی کردند. بر اساس نتایج به دست آمده، اسانس اندام یاد شده روی تمام باکتری‌های مطالعه شده، اثر مثبت دارد که به ترتیب هاله عدم رشد برابر ۱۶ تا ۴۷، ۱۳ تا ۲۸ و ۱۳ تا ۲۲ میلی‌متر ایجاد کردند (۲۱) در حالی که در پژوهش ما اسانس و عصاره اندام هوایی *S. reuterana* تنها بر باکتری‌های گرم مثبت اثر داشته و هاله عدم رشد برابر ۱۰ تا ۱۳ ایجاد کردند. در پژوهشی دیگر که سال ۲۰۱۰ در ترکیه انجام شد، اسانس *S. syriaca* بر تمام میکروارگانیسم‌های مطالعه شده، اثر ضد باکتری و ضد قارچی داشته و هاله عدم رشد بین ۱۰ تا ۱۲ میلی‌متر ایجاد کرده است. همچنین گیاه *S. ceratophylla* بر سه سویه باکتری *S. aureus*، *E. coli* و *B. subtilis* اثر داشته و هاله عدم رشد برابر ۱۲ تا ۱۶ میلی‌متر ایجاد کرده است (۲۲) در پژوهش حاضر نیز

گونه گیاه مریم‌گلی را بررسی کردند. در این مطالعه سه گونه *S. macrosiphon*، *S. ceratophylla* و *S. chloroleuca* بیشترین فعالیت ضد میکروبی را روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی نشان دادند. در ضمن در این مطالعه عصاره متانلی این گونه‌ها روی باکتری‌های گرم مثبت اثر بهتری را نشان داد که از این نظر همسو با مطالعه حاضر است (۲۶). بر اساس مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۹ تاثیر شرایط جغرافیایی و ارتفاع محل کشت می‌تواند بر نوع ترکیب‌های موجود در گیاه و میزان آن‌ها تاثیرگذار باشند که با توجه به تنوع اثر ضد میکروبی گونه‌های مختلف در این پژوهش، مطالعه ما همسو با نتایج این محققان بوده است (۲۷).

با توجه به مطالعه‌های گذشته و یافته‌های این پژوهش مشخص شد که اسانس‌ها و عصاره‌های گونه‌های مطالعه شده که در برخی نقاط متفاوت دیگر بررسی شده، می‌تواند بر باکتری‌های گرم مثبت و برخی از باکتری‌های گرم منفی و *C. albicans* اثر ضد میکروبی نشان دهد و هاله عدم رشد ایجاد کند. در حالی که نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره‌ها و اسانس‌ها در این مطالعه بر باکتری‌های گرم مثبت و *C. albicans* اثر دارند و هیچ‌گونه فعالیت ضد میکروبی در این غلظت به باکتری‌های گرم منفی نشان ندادند. این تفاوت می‌تواند به دلیل روش‌های مختلف در نوع استخراج، عوامل ژنتیکی، عوامل فصلی و محیطی در هنگام برداشت نمونه ... باشد. به نظر می‌رسد با توجه به خواص ضد میکروبی برخی از عصاره‌ها و اسانس‌ها که در این مطالعه مشاهده شد، می‌توان از آن‌ها پس از مطالعه‌های تکمیلی گسترده‌تر به عنوان جایگزین داروهای ضد میکروبی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی:

از تمامی همکارانی که در این پژوهش ما را یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع:

1. Semnani KM, Saeedi M, Mahdavi MR, Rahimi F. Study and comparison of the antimicrobial activity of methanolic extracts of several species of *Stachys* and *Phlomis*. *J.MUMS* 2007; 57: 57-66.
2. Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculoides* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculoides*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *J. Agric Food Chem.* 2005; 53(24): 9452-9458.
3. Sadeghi-Nejad B, Azizi M. In vitro antibacterial and antifungal effect of some medicinal plants. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2013; 7(29): 3802-3806.
4. Clark AM. Natural products as a resource for new drugs. *Pharm Res.* 1996; 13:1133-44.
5. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *Int. J. Food. Microbiol.* 2004; 94: 223-253.
6. Sharafati-chaleshtori R, Sharafati-chaleshtori F, Sharafati-chaleshtori A, Ashrafi K. Antimicrobial effects and evaluation of total phenols, flavonoids and flavonols contents of ethanolic extracts of *Scrophularia striata*. *JSKUMS* 2010; 11(4): 32-37. (Full Text in Persian)

اسانس و عصاره *S. syriaca* بر دو سویه باکتری *S. aureus* و *B. subtilis* اثر ضد میکروبی نشان داد و همچنین عصاره *S. ceratophylla* بر این دو سویه ذکر شده اثر داشته و هاله عدم رشد برابر ۱۲ تا ۱۷ ایجاد کرده است، در حالی که اسانس این گونه هیچ اثری روی این دو سویه ایجاد نکرده است. در مطالعه امید فیروزی و همکاران، فعالیت ضد باکتری عصاره متانلی چند گونه از جنس مریم‌گلی روی شش سویه باکتری گرم مثبت و منفی بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تمام باکتری‌های آزمایش شده به گونه *S. limbata* حساس بودند و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد بین ۱/۲۵-۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را نشان دادند. همچنین در همین پژوهش *S. syriaca* نیز بر سه سوش باکتری اثر داشته و حداقل غلظت مهارکنندگی رشد بین ۱/۲۵ تا ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را نشان داده است (۲۳). در پژوهشی در سال ۲۰۰۸ صالحی و همکاران اثر ضد میکروبی *S. limbata* از دو منطقه تکاب و مشهد اردهال را بررسی کردند. این گونه بر باکتری‌های گرم مثبت و برخی از باکتری‌های گرم منفی و *C. albicans* فعالیت ضد میکروبی نشان داد و هاله عدم رشد در نمونه تکاب بین ۸ تا ۱۵ و در نمونه مشهد اردهال بین ۸ تا ۱۳ میلی‌متر ایجاد کردند. همچنین در این پژوهش برخی از ترکیب‌های اسانس *S. limbata* شامل α سینئول، آلفا و بتا پینن را بررسی کردند، بر اساس نتایج به دست آمده، هاله عدم رشد بین ۸ تا ۲۵ میلی‌متر ایجاد شد که از این میان ترکیب α سینئول اثر ضد میکروبی بالاتری را نسبت به دو ترکیب دیگر نشان داد در حالی که عصاره‌ها و اسانس‌ها در پژوهش ما هیچ‌گونه فعالیت ضد میکروبی به باکتری‌های گرم منفی نشان ندادند (۲۴). بر اساس پژوهشی در سال ۲۰۱۰، اسانس یک گونه از جنس *Salvia L.* روی باکتری‌های گرم مثبت آثار بهتری نشان داد که به نظر می‌رسد به دلیل وجود ترکیب α سینئول در اسانس این گونه باشد. در مطالعه ما نیز عصاره و اسانس مریم‌گلی بر باکتری‌های گرم منفی اثر نداشته و روی باکتری‌های گرم مثبت اثر بهتری نشان داد (۲۵). شهلا نجفی و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر ضد میکروبی عصاره بخش‌های هوایی شش

7. Polatoglu K, Demirci F, Demirci B, Husnu Can Baser k. Antibacterial Activity and the Variation of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. Essential Oils from Turkey. *J Oleo Sci.* 2010; 59(4): 177-184.
8. Marilena C, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int J Food Microbiol.* 2001; 67(3): 187-195.
9. Alkan FU, Gursel FE, Ates A, Ozyurek M, Guclu K. Protective effects of *Salvia officinalis* extract against cyclophosphamide-induced genotoxicity and oxidative stress in rats. *Turk J Veterin Anis Sci.* 2012; 36(6): 646-654.
10. Abd-Almageed MA, Hussein BA. Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Salvia officinalis* L. flowers. *Sudan JMS.* 2008; 3(2): 127-132.
11. Cardile V, Russo A, Formisano C, Rigano D, Senatore, F, Arnold N. A, et al. Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *J Ethnopharmacol.* 2009; 126(2): 265-272.
12. Ebrahimabadi AH, Mazoochi A, Kashi FJ, Djafari-Bidgoli Z, Batooli H. Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss. from Iran. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(5): 1371-1376.
13. Da H, Jie Gu X, Gen Xiao P. Phytochemical and biological research of *Salvia* medicinal resources. *Medicinal plants.* 2015; 14: 587-639.

14. Dentali S, Hoffmann J. Potential antiinfective agents from *Eriodictyon angustifolium* and *Salvia apiana*. *J Pharmacogn Nat Prod*. 1992; 30(3): 223-231.
15. Jamzad Z. *Lamaiceae*. In: Assadi M, Maassoumi A, Mozaffarian V, editors. *Flora of Iran*. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran: 2012. Vol. 76. (in Persian).
16. Rechinger KH, Hedge IC, Ietswaart JH, J alas J, Mennema, J, Seybold S, editors. *Labiatae*. In: Rechinger KH, (ed.). *Flora Iranica*. 1982. Vol. 150. Akademische Druck- u. Verlagsanstalt. Graz.
17. Sokmen A, Jones B. M, Erturk M, The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 1999; 67(1): 79-86.
18. Saeidnia S, Yassa N, Rezaeiipoor R, Shaftee A. Comparative investigation of the essential oils of *Achillea talagonica* Boiss. and *A. millefolium*, chemical composition and immunological Studies. *JEOR*. 2004;16(3): 262-265.
19. Gulluce M, Sokmen M, Sahin F, Sokmen A, Adiguzel A, Ozer H. Biological activities of the essential oil and methanolic extract of *Micromeria fruticosa* (L) Druce ssp *serpyllifolia* (Bieb) PH Davis plants from the eastern Anatolia region of Turkey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2004; 84(7): 735-741.
20. Jassbi AR, Zare S, Firuzi OR, Xiao J. Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. *Phytochemistry*. 2016; 15(5):829-867.
21. Esmaeili A, Rustaiyan A, Nadimi M, Larujani K, Nadjafi F, Tabrizi L, et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from leaves, stems, and flowers of *Salvia reuterana* grown in Iran. *Chem Nat Compd*. 2008; 44(3): 393-395.
22. Karataş H, Ertekin S. Antimicrobial activities of the essential oils of four *Salvia* species from Turkey *J Med Plant Res*. 2010; 4(12): 1238-1240.
23. Firuzi O, Miri R, Asadollahi M, Eslami S, Jassbi AR. Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Contents of Eleven *Salvia* Species from Iran. *IJPR*. 2013; 4: 801-810.
24. Salehi P, Sonboli A, Dayeni M and Yousefzadi FM. Chemical composition of essential oils of *salvia limbata* from two different regions in iran and their biological activites. *Chem Nat Compd*. 2008; 44(1):102-105.
25. Kazemizadeh Z, Yousefzadi M, Ashabi MA, HeidariRikan M. Chemical composition and antibacterial properties of the essential oils in *Salvia macrochlamys* Boiss. and *Kotschy* from Wes Azerbaijan. *J. Med. Plants*. 2010; 1: 75-81.
26. Najafi Sh, Mir N, Shafeghat M. Antioxidant and Antibacterial Activities of Six Medicinally Important Species of the Genus *Salvia* from North East of Iran. *J. Genet Resour*. 2016; 2(1):41-47.
27. Azizi M, Davareenejad G, Bos R, Woerdenbag HJ, Kayser O. Essential oil content and constituents of black zira (*Bunium persicum* [Boiss.] B. Fedtsch.) from Iran during field cultivation (domestication). *J. Essen. Oil Res*. 2009; 21(1):78-82.