

Investigation of antibacterial properties of ethanolic extracts of four native medicinal plants of Ardebil province by two methods of disk and well diffusion

Rasoul Narimani, Mohammad Moghaddam*

Department of Horticultural Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: 2016/05/17

Accept: 2016/11/14)

Abstract

Background: The main problems in antibiotic treatment are resistance to antibiotic and also the side effects of drug consumption. Therefore, after doing researches on the plants properties, humankind has attempted to use them in different industries. In this investigation the antimicrobial effects of ethanolic extracts of four therapeutic plants from Ardebil province include *Nepeta nuda*, *Salvia verticillata*, *Nepeta crassifolia* and *Teocrium chamaedry* subsp. *sypsiense*, on three species of gram negative bacteria (*Salmonella enteric*, *Escherichia coli*, *Pectobacterium carotovorum*) were evaluated.

Material and Methods: An experimental study was conducted at in vitro conditions. After preparing ethanolic extract of mentioned plants by maceration method, the antimicrobial effect of outcome extracts from their aerial parts were investigated by two different methods: disk diffusion and well diffusion.

Results: The highest growth inhibition zone in *E. coli*, *P. carotovorum*, *S. enterica* bacteria at 800 mL/mg concentration in disk diffusion method (12, 12, 12 mm) at *N. crassifolia*, *N. nuda*, and *N. crassifolia* extracts and in well diffusion method (10, 12 and 11 mm) at *S. verticillata*, *N. nuda* and *N. crassifolia* extracts were seen respectively.

Conclusion: It seems the different concentrations of extract and also bacterium type are influenced on growth inhibition zone. With increasing concentration, the inhibition zone is increased. In comparing to Gentamicin the extracts of mentioned plants had low effect on gram negative bacteria.

Keywords: Antibacterial property, Extract, Disk diffusion, Well diffusion, Medicinal plant

* Corresponding Author: Mohammad Moghaddam*

Email: m.moghadam@um.ac.ir; moghaddam75@yahoo.com

بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره اتانولی چهار گیاه دارویی بومی استان اردبیل به دو روش انتشار دیسکی و چاهک

رسول نریمانی، محمد مقدم*

گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۸/۲۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۲/۲۸

چکیده:

سابقه و هدف: مسئله اصلی در درمان آنتی‌بیوتیکی، مقاومت به آن و همچنین عوارض جانبی مصرف دارو است. بنابراین، پس از انجام تحقیق‌ها روی خواص گیاهان، بشر اقدام به استفاده از آن‌ها در صنایع مختلف کرده است. در این پژوهش آثار ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی چهار گیاه دارویی از استان اردبیل شامل *Salmonella enterica*، *Nepeta crassifolia*، *Salvia verticillata*، *Nepeta nuda* بر روی سه گونه باکتری گرم منفی *Escherichia coli*، *Pectobacterium carotovorum* و *S. enterica* مورد ارزیابی شده است.

مواد و روش کار: تحقیق به روش تجربی و *in vitro* انجام شد. متغیرهای آزمایش شامل نوع عصاره، غلظت‌های مختلف عصاره و سویه باکتری است. پس از تهیه عصاره اتانولی گیاهان مذکور به روش مسراسیون، اثر ضد میکروبی عصاره‌های حاصل از اندام هوایی آن‌ها به دو روش انتشار دیسکی (*Disk diffusion*) و چاهک (*Well diffusion*) بررسی شد.

یافته‌ها: بالاترین هاله بازدارنده رشد در باکتری‌های *E. coli*، *P. carotovorum*، *S. enterica* در غلظت 800 mg/mL به ترتیب در روش دیسک ۱۲، ۱۲، ۱۲ میلی‌متر در عصاره‌های *N. crassifolia* و *N. crassifolia*، *N. nuda* و *N. crassifolia* و روش چاهک ۱۰، ۱۲ و ۱۱ میلی‌متر در عصاره‌های *N. nuda*، *N. crassifolia* و *S. verticillata* مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد غلظت‌های مختلف عصاره و همچنین نوع باکتری در تشکیل هاله‌ی بازدارنده رشد تأثیرگذار باشند. با افزایش غلظت، قطر هاله افزایش می‌یابد. عصاره‌ی گیاهان مورد نظر در مقایسه با جنتامایسین تأثیر اندکی روی باکتری‌های گرم منفی داشتند.

واژگان کلیدی: خاصیت ضد باکتری، عصاره، انتشار دیسکی، انتشار چاهک، گیاه دارویی

مقدمه:

میکروبی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود معطوف کرده است. اگرچه تاکنون تعداد زیادی از گیاهان عالی برای یافتن مواد ضد میکروب بررسی شده‌اند، اما هیچ‌یک از ترکیبات ضد میکروب حاصل از آن‌ها قادر به رقابت با آنتی‌بیوتیک‌های رایج نبوده و جست‌وجو برای یافتن عوامل گیاهی ضد میکروب همچنان ادامه دارد [۳]. برای رسیدن به چنین اهدافی در این پژوهش آثار ضد میکروبی عصاره‌های مختلف گیاهان *Nepeta nuda* (پونه‌سای بی‌کرک)، *Salvia verticillata* (مریم‌گلی بنفش)، *Nepeta crassifolia* (پونه‌سای) و *Teocrium chamaedry subsp.*

مسئله و دغدغه در درمان آنتی‌بیوتیکی، مقاومت و پس از آن عوارض جانبی دارو است. بر این اساس، پس از انجام تحقیق‌ها روی آثار گیاهان، بشر اقدام به بهره‌گیری از آن‌ها در صنایع مختلف کرده است [۱]. اکثر داروهای شیمیایی با تقلید از داروهای گیاهی، اما به صورت مصنوعی، در آزمایشگاه‌های داروسازی تهیه می‌شوند. تخمین زده می‌شود دست‌کم یک سوم از تمامی فرآورده‌های مورد مصرف، منشأ گیاهی دارند [۲]. امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی برای درمان کمکی عفونت‌های

نویسنده مسئول: محمد مقدم

پست الکترونیک: moghaddam75@yahoo.com; m.moghaddam@um.ac.ir

زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی و بایگانی شدند. بعد از خشک کردن در سایه از آن‌ها برای آزمایش‌ها استفاده شد. روی گیاه آسیاب شده عملیات عصاره‌گیری به روش خیساندن، با حلال اتانول ۷۰ درصد انجام شد. به این ترتیب که ابتدا پودر اندام هوایی گیاهان به مدت ۲۴ ساعت در اتانول خیسانده و شیک شدند. عصاره‌های حاصل با دستگاه روتاری اواپراتور تغلیظ شدند. همه عصاره‌ها تا زمان انجام آزمون در ظروف استریل غیرقابل نفوذ به هوا و نور، در یخچال نگهداری شد.

در این مطالعه سه گونه باکتری گرم منفی سالمونلا انتریکا (PTCC۱۷۰۹)، اشریشیاکلی (PTCC۱۳۹۹) و پکتوباکتریوم از گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند و در ۲۴ ساعت قبل از تست، به طور تازه در محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA) کشت داده شدند. برای سنجش خاصیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف از روش‌های انتشار دیسک کربی-بائر و روش چاهک استفاده شد. برای سنجش اثر ضد میکروبی از روش‌های دیسک گذاری و چاهک گذاری استفاده شد [۱۸]. در روش انتشار دیسکی، از کلنی ۲۴ ساعته هر کدام از باکتری‌های کشت شده مورد آزمایش در محیط کشت به کمک لوپ برداشته و در لوله آزمایش استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به طور کامل مخلوط شد. سپس سوسپانسیون یکنواختی از باکتری‌های مورد آزمایش مشابه کدورت لوله استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد. توسط سوآپ روی محیط‌های مولر هینتون آگار به صورت چینی کشت داده شد. برای تهیه دیسک‌های حاوی عصاره ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ها را که در DMSO حل شده‌اند، روی دیسک‌های بلانک استریل اضافه و به مدت ۲ ساعت زمان داده شد تا عصاره‌ها به طور کامل جذب دیسک‌های کاغذی شوند. سپس دیسک‌ها روی پلیت به فواصل مناسب قرار داده شد و نمونه‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند [۱۹]. در روش چاهک هم از پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار که آغشته به میکروارگانیزم بودند، استفاده شد. توسط یک پیپت پاستور استریل که مخصوص ایجاد چاهک است، یک گودی در محیط کشت ایجاد کرده و داخل هر چاهک با سمپلر ۵۰ لانداز عصاره‌ها به طور جداگانه قرار داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. عملیات مذکور در مورد هر نمونه دوبار تکرار شد، پس از آن میزان مناطق مهارزی ارزیابی شد و بر اساس میلی‌متر محاسبه و سپس میانگین آن‌ها ثبت شد [۲۰]. از جنتامایسین ۵ میلی‌گرم به عنوان کنترل مثبت و از DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شد. قدرت فعالیت به صورت مقابل تفسیر شده است: (+++) برای قطر هاله عدم رشد بیشتر از ۱۱ میلی‌متر، (++) متوسط برای قطرهای ۱۰-۸ میلی‌متر، (+) برای قطرهای ۵-۷ میلی‌متر و (-) عدم مهار کنندگی.

یافته‌ها:

در آزمایش‌های فوق از غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره استفاده شد. طبق یافته‌های به دست آمده در تیمار باکتری در روش انتشار چاهک، بیشترین قطر مهار رشد برای باکتری اشریشیاکلی در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توسط عصاره اتانولی *N. crassifolia* و *S. verticilata* به وجود آمد که به ترتیب ۱۱

sypspirensis (مریم نخودی) جمع آوری شده از استان اردبیل ارزیابی شده‌اند. جنس *Nepeta* spp. L. (نیپتا) با نام فارسی پونه‌سا یا قطرم در ایران علاوه بر دو گونه مورد نظر در این مطالعه یعنی *N. nuda* و *N. crassifolia*، تعداد ۶۷ گونه گیاه علفی یک ساله و چندساله دارد که اغلب آن‌ها انحصاری ایران هستند. دیگر گونه‌های آن علاوه بر تالش در ایران، آسیای جنوب غربی، عراق، آناتولی، ماورای قفقاز، افغانستان، آسیای مرکزی، ترکمنستان، سوریه و پاکستان نیز می‌رویند [۴]. با مرور تحقیق‌هایی که تاکنون روی جنس پونه‌سا (نیپتا) انجام شده است، ملاحظه می‌شود این جنس بیشتر حاوی ترکیب‌های فلاونوئیدی (از زیرگروه فلاون‌ها) است [۵]. از ترکیب‌های دیگر این جنس می‌توان به ایریدوئیدها، فنل‌ها و دیتیرین‌ها اشاره کرد [۶، ۷].

مریم‌گلی بنفش (*Salvia verticilata* L.) از تیره نعنائیان، گیاهی پایا، سبز و پوشیده از کرک کم پرز است [۸]. ترکیب‌های بسیاری از این گیاه جداسازی شده است که از آن جمله می‌توان ترپنوئیدها و مشتقات فنلی را نام برد. مقادیر فراوانی توکوفرول، اسید رزمارینیک و اسید آسکوربیک از این گیاه به دست آمده است [۹، ۱۰]. میوه و سبزی‌های آلوده، وسیله‌ای برای انتقال باکتری‌ها، انگل‌ها و ویروس‌های بیماری‌زا هستند و باعث ایجاد بیماری در انسان و نیز افزایش شیوع بیماری‌های قابل انتقال از غذا می‌شوند [۱۱، ۱۲]. سالمونلا *S. enterica* [۱۳] و اشریشیاکلی *E. coli* از جمله پاتوژن‌هایی هستند که از روی سبزی‌ها جدا شده‌اند. باکتری‌ها می‌توانند بر کیفیت سبزی‌های برداشت شده تأثیر نامطلوب داشته باشند و این تأثیرگذاری از سه طریق کلی انجام می‌شود که عبارتند از: آلودگی، آسیب دیدگی شدید و پوسیدگی. بسیاری از افراد محصولات مصرفی را می‌شویند. رطوبت همراه با محصول برداشت شده در گسترش بیماری‌های باکتریایی سبزی‌ها اهمیت زیادی دارد [۱۴]. یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای سبب‌زمینی، باکتری‌های وابسته به جنس *Pectobacterium* (*P. carotovorum*) است. از ویژگی‌های مهم این گروه از باکتری‌ها، قدرت لهانیدن و تخریب فراوان بافت‌های نرم و پر آب است و بیماری پوسیدگی نرم و ساق سیاه را در گیاهان به وجود می‌آورد [۱۵]. بسیاری از متابولیت‌های ثانوی و عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت زیستی متفاوت از جمله خواص ضد میکروبی هستند [۱۶] که باعث شده موضوع جایگزینی سموم شیمیایی با مواد طبیعی امن و دوستدار محیط زیست در مجامع علمی دنیا مطرح شود [۱۷]. بنابراین، این مطالعه با هدف تعیین کارایی بالقوه عصاره اندام هوایی گیاهان ذکر شده برای مهار این باکتری‌های بیماری‌زا در سال ۱۳۹۴ انجام شد.

روش کار:

تحقیق به روش تجربی و *in vitro* انجام شد. متغیرهای آزمایش شامل ۴ نوع عصاره با ۳ غلظت (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و ۳ سوبه باکتری است. حلال اتانول و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) از شرکت مرک آلمان تهیه و سوبه‌های میکروبی مورد نظر نیز از گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. اندام هوایی گیاهان *Nepeta crassifolia*، *Salvia verticilata*، *Nepeta nuda* و *Teocrium chamaedry* subsp. *sypspirensis* از رویشگاه‌های طبیعی آن واقع در استان اردبیل در مرحله گل‌دهی جمع‌آوری شد. گیاهان مذکور در هرباریوم گروه

مشخصات هرباریومی نمونه‌های جمع‌آوری شده

استان	نام علمی	کد هر باریومی	محل نمونه برداری	ارتفاع از سطح دریا (متر)	عرض جغرافیایی (شمالی)	طول جغرافیایی (شرقی)
اردبیل	<i>Nepeta crassifolia</i>	۶۳۰۱	نمین	۱۴۲۳	۳۸ درجه ۲۸ دقیقه	۴۸ درجه ۳۴ دقیقه
اردبیل	<i>Teocrium chamaedry</i>	۶۳۰۴	گردنه حیران	۲۳۷۴	۳۴ درجه ۳۸ دقیقه	۳۷ درجه ۴۸ دقیقه
اردبیل	<i>Salvia verticilata</i>	۶۳۰۳	مشکین	۱۳۰۰	۳۸ درجه ۱۲ دقیقه	۴۶ درجه ۱۷ دقیقه
اردبیل	<i>Nepeta nuda</i> L.	۶۳۰۲	مشکین	۳۱۵	۳۸ درجه ۲۳ دقیقه	۴۷ درجه ۱ دقیقه

قطر هاله مهار رشد باکتری‌ها توسط عصاره‌های اتانولی اندام هوایی گیاهان جمع‌آوری شده به روش انتشار چاهک در غلظت ۲۰۰ mg/L، ۴۰۰ mg/L و ۸۰۰ mg/L.

عصاره	۲۰۰ mg/mL		
	S. enterica	P. carotovorum	E. coli
N. nuda	–	۷ ⁺	۵ ⁺
S. verticilata	۶ ⁺	–	۸ ⁺⁺
N. crassifolia	۸ ⁺⁺	۷ ⁺	۸ ⁺⁺
T. chmaedrys	–	۹ ⁺⁺	–
	۴۰۰ mg/mL		
	S. enterica	P. carotovorum	E. coli
N. nuda	۸ ⁺⁺	۹ ⁺⁺	۷ ⁺
S. verticilata	۷ ⁺	۶ ⁺	۹ ⁺⁺
N. crassifolia	۸ ⁺⁺	۷ ⁺	۹ ⁺⁺
T. chmaedrys	+	۷ ⁺	–
	۸۰۰ mg/mL		
	S. enterica	P. carotovorum	E. coli
N. nuda	۹ ⁺⁺	۱۲ ⁺⁺⁺	۹ ⁺⁺
S. verticilata	۱۰ ⁺⁺	۹ ⁺⁺	۱۱ ⁺⁺⁺
N. crassifolia	۱۲ ⁺⁺⁺	۱۱ ⁺⁺⁺	۱۲ ⁺⁺⁺
T. chmaedrys	۸ ⁺⁺	۸ ⁺⁺	–

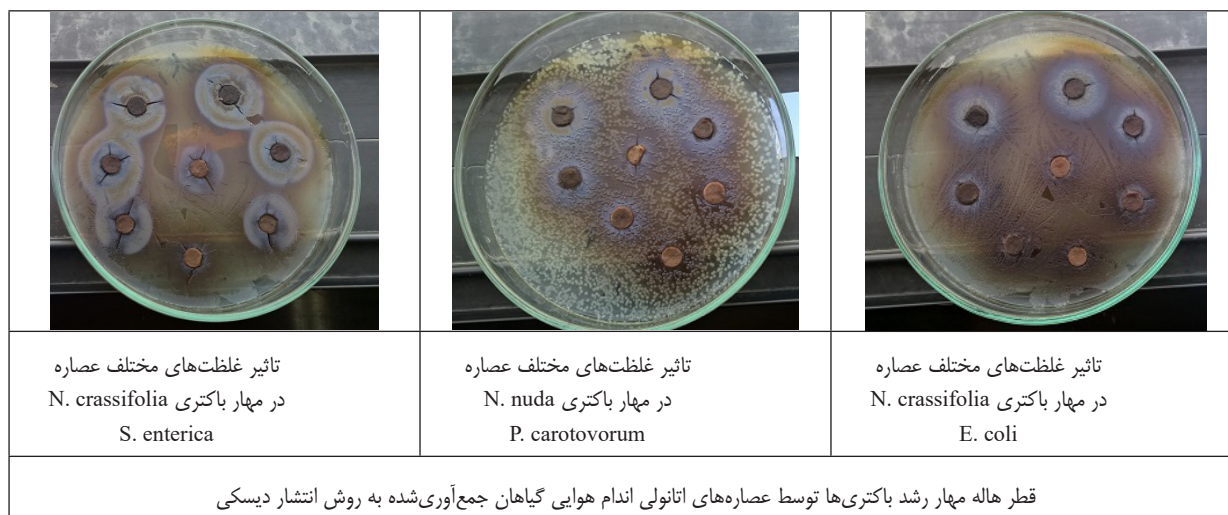
قطر هاله مهار رشد باکتری‌ها توسط عصاره‌های اتانولی اندام هوایی گیاهان جمع‌آوری شده به روش انتشار دیسکی در غلظت ۲۰۰ mg/L، ۴۰۰ mg/L و ۸۰۰ mg/L.

عصاره	۲۰۰ mg/mL		
	S. enterica	P. carotovorum	E. coli
N. nuda	–	۸ ⁺⁺	۶ ⁺
S. verticilata	۸ ⁺⁺	–	۹ ⁺⁺
N. crassifolia	۹ ⁺⁺	۹ ⁺⁺	۷ ⁺
T. chmaedrys	–	۱۰ ⁺⁺	–
	۴۰۰ mg/mL		
	S. enterica	P. carotovorum	E. coli
N. nuda	۷ ⁺	۹ ⁺⁺	۹ ⁺⁺
S. verticilata	۸ ⁺⁺	–	۸ ⁺⁺
N. crassifolia	–	۱۰ ⁺⁺	۷ ⁺
T. chmaedrys	–	۸ ⁺⁺	–
	۸۰۰ mg/mL		
	S. enterica	P. carotovorum	E. coli
N. nuda	۸ ⁺⁺	۱۲ ⁺⁺⁺	۸ ⁺⁺
S. verticilata	۱۰ ⁺⁺	۸ ⁺⁺	۱۰ ⁺⁺
N. crassifolia	۱۱ ⁺⁺⁺	۱۰ ⁺⁺	۸ ⁺⁺
T. chmaedrys	۸ ⁺⁺	۸ ⁺⁺	–

قطر هاله مهار رشد باکتری‌ها توسط جنتامایسین

چاهک			
	S. enterica	P. carotovorum	E. coli
جنتامایسین	۲۸ ^{***}	۲۵ ^{***}	۲۷ ^{***}
دیسک			
جنتامایسین	۲۳ ^{***}	۲۱ ^{***}	۲۲ ^{***}

* قطر هاله عدم رشد: ۱۱ میلی‌متر > (+++)



کرده است [۲۴، ۱۹]. بنابراین با کاهش غلظت عصاره، اغلب از قطر هاله عدم رشد باکتری نیز کاسته می‌شود. کاظم‌زاده و همکاران اظهار داشتند که خواص ضد باکتریایی گونه‌های جنس *Salvia* L روی باکتری‌های گرم مثبت آثار بهتری نشان می‌دهد [۲۵]، که به احتمال پایین بودن قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم منفی در عصاره مریم‌گلی همسو با نظر این محققان است. در تحقیقی، عصاره اتانولی مریم‌گلی هیچ اثر مهارکنندگی روی باکتری *Bacillus subtilis* نداشت، در صورتی که اثر مهارکنندگی ضعیفی روی باکتری‌های *P. aeruginosa* و *E. coli* داشت [۲۶]. مطالعه ما همسو با نتایج این محققان بوده و آثار مهارکنندگی ضعیف تا متوسطی روی باکتری‌های اشرشیاکلی و سالمونلا مشاهده می‌کنیم.

در تحقیقی که از سوی گلشن و همکاران در سال ۱۳۹۱ انجام شد، آثار ضدباکتریایی اسانس مریم‌نخودی طناز (*T. chmaedrys*) که به‌وسیله روش انتشار دیسکی روی دو باکتری گرم مثبت، *کلستریدیوم پرفریژنس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و دو باکتری گرم منفی *سالمونلا* و *اشریشیاکلی* بررسی شد نشان داد، اسانس گیاه *S. chlorolouca* اثر ضد میکروبی خوبی به‌ویژه روی باکتری‌های گرم مثبت دارد و از رشد باکتری‌های *Staphylococcus* و *perfringens Clostridium aureus* جلوگیری می‌کند؛ اما تأثیری بر باکتری‌های گرم منفی ندارد که این امر بی‌ارتباط با وجود لیپید در غشای سلولی این دسته از باکتری‌ها نیست [۲۷] که به نتایج ما نیز مشهود بود و مریم‌نخودی تأثیر بسزایی بر عدم رشد باکتری‌ها نداشت. در تحقیقی دیگر که از سوی علیشاهی و همکاران در سال ۱۳۸۴ انجام شد مشخص شد که مریم‌گلی *Salvia chloroleuca* نسبت به پونه‌سا *Nepeta fissa* دارای قدرت مهارکنندگی بالایی در برابر باکتری اشرشیاکلی بود [۲۸] که با نتیجه ما در روش انتشار دیسکی همخوانی دارد.

نتیجه‌گیری:

به نظر می‌رسد غلظت‌های مختلف عصاره و همچنین نوع باکتری در تشکیل هاله عدم رشد تأثیرگذار هستند. با افزایش غلظت قطر هاله افزایش می‌یابد و عصاره گیاهان موردنظر تأثیر اندکی روی باکتری‌های گرم منفی نسبت به کنترل مثبت (جنتامایسین) دارد. با توجه به این که شرایط اقلیمی و نوع عصاره بر نتیجه آزمایش تأثیرگذار است بنابراین جمع‌آوری سایر اکوتیپ‌های گیاهان مذکور و عصاره‌گیری به روش‌های مختلف امری ضروری و کارآمد به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از زحمات مهندس ظاهر بافکر که در شناسایی و جمع‌آوری گونه‌های گیاهی مرا یاری کردند کمال تشکر را دارم.

و ۱۲ میلی‌متر هستند. به‌طوری که برای باکتری پکتوباکتریوم بالاترین قطر مهار رشد مربوط به گیاه *N. nuda* در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برابر با ۱۲ میلی‌متر بود. همچنین در مورد باکتری سالمونلا انتریکا، عصاره به دست آمده از گیاه *N. crassifolia* دارای بیشترین قدرت مهارکنندگی در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با قطر ۱۲ میلی‌متر بود.

تمامی عصاره اتانولی با روش انتشار دیسکی نیز روی باکتری‌ها اثر داده شد. به‌طوری که بیشترین هاله عدم رشد برای باکتری اشرشیاکلی برابر با ۱۰ میلی‌متر مربوط به عصاره به دست آمده از گیاهان *N. nuda* و *S. verticilata* بود که به ترتیب در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به وجود آمد. همچنین در پکتوباکتریوم این هاله برابر با ۱۲ میلی‌متر مربوط به عصاره *N. nuda* در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری سالمونلا انتریکا ۱۱ میلی‌متر و در غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره *N. crassifolia* به دست آمد.

بحث:

افزایش بیماری‌ها و مسمومیت‌های ناشی از غذا به همراه مشکلات اقتصادی و اجتماعی حاصل از آن سبب گسترش مطالعه‌ها در زمینه تولید غذای سالم و به‌کارگیری ترکیب‌های ضد میکروبی جدید شده است. عطرمایه‌ها و عصاره‌های حاصل از گیاهان دارای آثار ضد میکروبی شناخته‌شده‌ای هستند که می‌توانند برای کنترل و جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد منتقله از مواد غذایی به‌جای نگاه‌دارنده‌های شیمیایی و ساختگی استفاده شوند [۲۱]. متغیرهایی مانند اقلیم، دما، شرایط جغرافیایی و توپوگرافی محل رشد می‌توانند بر نتایج این تحقیق تأثیرگذار باشند. در پژوهشی تأثیر شرایط جغرافیایی و ارتفاع محل کشت بر میزان و نوع ترکیب‌های گیاه، متفاوت گزارش شده است و تأثیر عوامل موجود بر میزان ترکیب‌های فنی تأیید شده است [۲۲].

بر اساس مطالعه Cimanga و همکارانش در صورتی که قطر هاله عدم رشد برابر یا بیشتر از ۱۵ میلی‌متر باشد فعالیت بسیار، قطر هاله عدم رشد بین ۱۰ تا ۱۵ میلی‌متر نشان‌دهنده فعالیت متوسط و قطر هاله عدم رشد کمتر از ۱۰ میلی‌متر نشان‌دهنده غیرفعال بودن عصاره است [۲۳]. از مجموع عصاره‌های مورد مطالعه علیه باکتری‌ها، عصاره *N. nuda* با فعالیت متوسط روی باکتری پکتوباکتریوم، عصاره *S. verticilata* نیز با فعالیت متوسط روی باکتری اشرشیاکلی، عصاره *N. crassifolia* با فعالیت متوسط روی هر سه نوع باکتری و *T. chmaedrys* به‌عنوان یک عصاره غیرفعال ارزیابی شد.

غلظت‌های متفاوت عصاره نیز در تأثیر اثر ضد میکروبی مؤثر است و در مطالعه‌های متعددی با تغییر میزان غلظت عصاره، آثار ضد میکروبی گیاه تغییر

منابع:

1. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. Integrative medicine communications. Herbal medicines, Austin. 2000; 419-23.
2. Zargari A. Medicinal plants. 4th edition. Tehran: Tehran University Publications; 1988. p.188-91. [In Persian]
3. Hamburger M, Hošettmann K. 7. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Phytochemistry. 1991; 30(12): 3864-3874.
4. Mozaffarian, V.A. Dictionary of Iranian plant names: Latin - English - Persian. 4th Ed. Farhang Moaser 2006; Tehran. P: 360.
5. Jamzad Z, Grayer RJ, Kite GC, Simmonds MS, Ingrouille M, Jalili A. Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta* (Lamiaceae) and some related genera. Biochem. Sys. Ecol. 2003; 31(6): 587-600.
6. Takeda Y, Matsumoto T, Oiso Y, Honda G, Tabata M, Fujita T, Otsuka H, Sezick E, Yesilada E. Nepetacilicoside, A new iridoid glucoside from *Nepeta cilicia*. J. Nat. Prod. 1996; 59(5): 518-519.
7. Takeda Y, Oiso Y, Masuda T, Honda G, Otsuka H, Sezick E, Yesilada E. Iridoid and eugenol glycosides from *Nepeta cadmea*. Phytochemistry. 1998; 31; 49(3): 787-791.
8. Özcan M, Tzakou O, Couladis M. Essential oil composition of Turkish herbal tea (*Salvia aucheri* Benth var. *canescens* Boiss. & Heldr.). Flavour and Fragrance J. 2003; 18(4): 325-327.
9. Nagy G, Günther G, Máthé I, Blunden G, Yang MH, Crabb TA. Diterpenoids from *Salvia glutinosa*, *S. austriaca*, *S. tomentosa* and *S. verticillata* roots. Phytochemistry. 1999; 52(6):1105-1109.
10. Orhan I, Kartal M, Naz Q, Ejaz A, Yilmaz G, Kan Y, Konuklugil B, Şener B, Choudhary MI. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. Food Chem. 2007; 103(4):1247-54.
11. Nguyen-the C, Carlin F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1994; 34(4): 371-401.
12. Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Vinas I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. Int. J. Food Microbiol. 2008; 123(1-2): 121-9.
13. Johannessen GS, Loncarevic S, Kruse H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. Int. J. Food Microbiol. 2002; 77(3): 199-204.
14. Fallahi M. Postharvest physiology of vegetables. University-industry relationship: V 2, page 434-510.
15. Hayward AC. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 1991; 29(1):65-87.
16. De Rodriguez DJ, Hernández-Castillo D, Rodríguez-García R, Angulo-Sánchez JL. Antifungal activity in vitro of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. Ind. Crops Prod. 2005; 21(1):81-7.
17. Hassanzadeh N. Technology of natural plant materials, emphasizing on fire blight disease. Agri. Sci. 2005; 11: 58-53.
18. Hashim I, Pharma S, eds. Microbiological culture media in pharmaceutical industry. Foster city, USA: OMICS Group eBooks; 2013.
19. Baydar H, Sagdic O, Ozkan G, Karadogan T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. Food Control. 2004; 15(3):169-172.
20. Saeidnia S, Yassa N, Rezaeipoor R, Shafiee A. Comparative investigation of the essential oils of *Achillea talagonica* Boiss. and *A. millefolium*, chemical composition and immunological studies. J. Essen. Oil Res. 2004; 16(3): 262-265.
21. Singh A, Singh RK, Bhunia AK, Simmon JE. Use of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. In Program listing. The 2001 IFT Annual Meeting. New Orleans, LO 2001.
22. Azizi M, Davarenejad 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.
23. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totté J, Pieters L, Vlietinck AJ. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. J. Ethnopharmacol. 2002; 79(2):213-20.
24. Kartal M, Yildiz S, Kaya S, Kurucu S, Topcu G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. J. Ethnopharmacol. 2003; 86: 69-73.
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 West Azerbaijan. J. Med. Plants. 2010; 1: 75-81.
26. Bahtiti NH. "Teucrium polium" Extracts Jordanian Ja'adeh. Asian J. Agr. Sci. 2012; 4(6):379-82.
27. Golshan A, Khakshour A, Nematollahi A, Yadollahi A. Chemical composition and antibacterial properties of the essential oil of *Tucreum chamaedrys* L. grown in north Khorasan province. J. North Khorasan Uni. of Med. Sci. 2013; 4(5):79-85.
28. Alishahi F, Sfidkon F, Yosefzadi M, Nemat S, Khajepiri M. To investigate the chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Salvia chloroleuca* Rech. f. & Aell. And *Nepeta fissa* C. A. Mey. Medicine and Arom. Plants. 2005; 21(4): 453-464.