علمی پژوهشی

تاثیر ضدمیکروبی عصاره سنبله نقره‌ای بر باکتری‌های بیماری‌زا با استفاده از روش‌های رقت آگار و سیلندر پلیت

محمد نوشاد[۱]، بهروز علیزاده بهبهانی[۱*]

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۹ /۰۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۱)

چکیده

گیاه سنبله نقره‌ای متعلق به خانواده نعنائیان است. با توجه به ترکیبات فعال بیولوژیکی و استفاده سنتی از گیاه سنبله نقره‌ایبرای درمان زخم‌ها و سرماخوردگی، به نظر می رسد که این گیاه اثرات ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای داشته باشد. هدف از اینپژوهش، بررسی اثرضدباکتریایی عصاره اتانولی گیاه سنبله نقره‌ای علیه باکتری‌های *انتروباکتر ائروژنز*، *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوساورئوس* بود. هاله بازدارندگی میکروبی عصاره سنبله نقره‌ای برای باکتری‌های *انتروباکتر ائروژنز*، *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش‌های سیلندر پلیت و کربی-بوئر تعیین شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (رقت در آگار و رقیق‌سازی در مایع) و حداقل غلظت کشندگی برای میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا تعیین شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون یک طرفه و چند دامنه‌ای دانکن تجزیه و تحلیل شدند. بیشترین و کم-ترین هاله بازدارندگی با قطر ۱۷/۹۰ و ۱۳/۱۰ میلی‌متر در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروباکتر ائروژنز* مشاهده شد (روش سیلندر پلیت). حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره گیاه سنبله نقره‌ایبرای باکتری‌های*انتروباکتر ائروژنز*، *اشرشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (روش رقت آگار). عصاره اتانولی گیاه سنبله نقره‌ای در شرایط برون‌تنی دارای اثر ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای بر *انتروباکتر ائروژنز* و *اشرشیا کلی* (باکتری‌های گرم منفی) و *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (باکتری‌های گرم مثبت) نشان داد.

کلید واژگان: سنبله نقره‌ای، روش سیلندر پلیت، رقت آگار، روش کربی-بوئر.

* مسئول مکاتبات: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

۱- مقدمه

استفاده از گیاهان برای مصارف گوناگون (خوراکی و دارویی) و حیاتی انسان‌ها از زمان‌های قدیم رایج بوده است. هر چند در گذشته‌های دور بشر به جنبه خوراکی گیاهان بیشتر از جنبه دارویی آن اهمیت داده است.استفاده از گیاهان با خاصیت درمانی و دارویی تنها مختص کشورهای در حال توسعه نیست. در جهان امروز رویکرد دوباره مردم به استفاده از گیاهان دارویی و گیاه درمانی یکی از جنبه‌های موج سبز به حساب می‌آید، به طوری که طبق آمار هم اکنونبیش از یک سوم تا نیمی از فراورده‌های دارویی مورد استفاده در ایالات متحده آمریکادارای منشاء گیاهی می‌باشد. علاوه بر ایالات متحده آمریکا، امروزه در انگلستان نیز تولیدات گیاهی و مکمل‌های فراوانی به شکل سالم و بی خطر در حال تولید می‌باشد[۱ و ۲].

پس از شناسایی پنی‌سیلین در قرن ۲۰ میلادی توسط الکساندر فلمینگو گسترش استفاده از آن جهت درمان بیماری‌های عفونی، هر روز آنتی‌بیوتیک‌های جدید درمانی برای مبارزه با عفونت‌ها ارائه و تولید می‌گردد. نتیجه این امر گسترش استفاده بالینی آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی سنتتیک در درمان بیماری‌های عفونیاست. استفاده بی رویه از آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی منجر به افزایش مقاومت‌های دارویی در اکثر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا شده است [۳]. از سویی دیگر درمان با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی همواره نگرانی‌های را در زمینه عوارض جانبی دارو به همراه دارد. با توجه به تنوع آب و هوایی و شرایط جغرافیایی کشور ایران، پوشش گیاهی در ایران دارای تنوع بالایی است. در سالیان اخیر به دلایل زیادی از جمله اطلاع و آگاهی بشر از عوارض داروهای شیمیایی و سنتزی، ارزان بودن، در دسترس بودن، سازگاری با طبع و پذیرش بهتر توسط بیماران، تمایل مضاعفی در جامعه برای استفاده از این گیاهان با خاصیت درمانی و دارویی جهت رفع مشکلات طبی به وجود آمده است[٤]. با توجه به دلایل ذکر شده، امروزه پژوهش‌های بسیاری در زمینه فعالیت ضدمیکروبی انواع ادویه‌ها،اسانس‌ها و عصاره‌ها گیاهی بر میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی صورت گرفته است که حاکی از قدرت و توانایی این ترکیبات در جلوگیریاز رشد این میکرو ارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشد. ازآنجا که این ترکیبات کاملاً طبیعی بوده، ضرر و زیان آن‌ها برای سلامت انسان‌ها و محیط زیست بسیار کمتر از نگهدارنده‌های سنتزی و شیمیایی می‌باشد [٥ و ٦].

گیاهان دارویی، اسانس‌ها و عصاره‌های آن‌ها درجات متنوعی از فعالیت‌های زیستی و ضدباکتریایی و ضدقارچی را دارا می‌باشند. اثر ضدمیکروبی برخی از ادویه‌ها و گیاهان معطر در مواد غذایی از قرن‌ها پیش شناخته شده است و بشر هرگاه لازم بود مواد غذایی را برای زمان طولانی نگهداری نماید، از این ادویه‌ها برای افزایش عمر ماندگاری مواد غذایی استفاده می‌نمود[۷].

گیاه سنبله نقره‌ای با نام علمی *Stachysbyzantina*از راسته لب‌گلی‌ها (Lamiales) و تیره نعنائیان(Lamiaceae) می‌باشد. از نظر گیاه‌شناسی، دارای ساختار علفی، پایا، همراه باکرک‌های فراوان و تارهای دراز است. گیاه سنبله نقره‌ای در کشورهای ایران، ارمنستان و ترکیه یافت می‌شود. این گیاه در ایران در مناطقی مانند شمال و شمال غرب کشور رشد می‌کند. در طب سنتی از گیاه سنبله نقره‌ای به عنوان آرام‌بخش، خواب‌آور، التیام و بهبود زخم‌ها، ضدسرفه، رفع گلودرد و عفونت‌های مجاری ادرای و کلیه استفاده می‌گردد. در مطالعات پیشین فعالیت ضدمیکروبی و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی این گیاه به اثبات رسیده است[۸-۱۰].

با توجه به پژوهش‌های محدود انجام شده بر گیاه سنبله نقره‌ای، هدف از این پژوهش، ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای بر باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *انتروباکتر ائروژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش‌های متنوع کمی و کیفی (کربی-بوئر، سیلندر پلیت، حداقل غلظت مهارکنندگی (میکرودایلوشن براث و رقت آگار) و حداقل غلظت کشندگی) در شرایط آزمایشگاهی بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی و مصرفی

مواد مصرفی و شیمیایی مورد استفاده در پژوهش حاضر شامل: محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان)، محیط کشت مولر هینتون براث (مرک، آلمان)، دی متیل سولفوکسید (سیگما-آلدریچ، آمریکا)، معرف تری فنیل تترازولیوم کلرید (مرک، آلمان)، الکل (مرک، آلمان)، دیسک‌های کاغذی (پادتن طب، ایران) و چاهک ۹٦ خانه‌ای (SPL، کره جنوبی)

بود. دستگاه‌های مورد استفاده شامل: آسیاب آزمایشگاهی (T3800، توس شکن، ایران)، سانتریفیوژ (K2042، Centurion، آمریکا)، دستگاه تقطیر در خلأ (روتاری) (laborota 400 Heidolph، Heidolph Instruments، آلمان)، اسپکتروفتومتر (Biochrom WPA Lightwave S2000 ،UV/VIS، انگلیس) و انکوباتور (Model G25 & R25، New Brunswick Scientific، آمریکا) بود.

۲-۲- عصاره‌گیری از گیاه سنبله نقره‌ای

بعد از تهیه گیاه سنبله نقره‌ای و تایید اسم علمی توسط گیاه‌شناسان و متخصصان با استفاده از کلیدهای شناسایی، عمل عصاره‌گیری از گیاه سنبله نقره‌ای با روش خیساندن (عدم آسیب به مواد موجود در عصاره) انجام شد. به طور خلاصه در این روش گیاه خشک شده توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر شده و با نسبت ۱ به ۵ با اتانول مخلوط گردید. مخلوط گیاه و حلال به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. هر چند ساعت یکبار همزدن توسط میله‌ای شیشه‌ای جهت استخراج هر چه بهتر مواد موثر گیاه انجام شد. پس از ۷۲ ساعت از خیساندن گیاه در حلال اتانول، مخلوط از پارچه توری عبور داده شد. جهت جداسازی ذرات معلق و شفاف‌سازی هر چه بهتر مخلوط عمل سانتریفیوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. پس از عمل سانتریفیوژ کردن محلول رویی به روتاری منتقل شده و عمل تغلیظ شدن عصاره انجام شد. عصاره تغلیظ شده در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک گردید. عصاره سنبله نقره‌ای توسط کاردک به طور دقیق تراشیده شد و درون ظرف شیشه‌ای تیره رنگ در یخچال تا زمان انجام آزمون‌های میکروبی نگهداری گردید [۱۱ و ۱۲].

۲-۳- آماده‌سازی سوسپانسیون میکروبی استاندارد

برای اندازه‌گیری فعالیت ضدمیکروبی لازم است محلول استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند و سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک فارلند تهیه شود. برای تهیه استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند ابتدا محلول سولفات باریم (۹۹/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱٪ و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید باریم۱/۱۷۵٪) تهیه شد. استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند کدورتی معادل با $1/5\times10^8$ colony forming unit/mL ایجاد می‌کند. چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه‌گیری جذب در دستگاه اسپکتروفوتومتر مشخص شد. میزان جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر برابر با ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ می‌باشد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *انتروباکتر ائروژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به کشت ۲۴ ساعته از هر باکتری نیاز است. بنابراین ۲۴ ساعت قبل از آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار مولر هینتون آگار تلقیح انجام شد. پس از رشد کشت میکروبی سطح آن با محلول رینگر شسته و سوسپانسیون غلیظ میکروبی حاصل گردید. سپس مقداری از سوسپانسیون میکروبی درون لوله استریل درب‌دار حاوی محلول رینگر ریخته شده، و کدورت آن با اسپکتروفوتومتر اندازه گیری گردید. رقیق‌سازی محلول سوسپانسیون تا زمان برابر شدن کدورت محلول ۰/۵ مک فارلند و سوسپانسیون میکروبی ادامه یافت [۱۳].

۲-۴- بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی عصاره سنبله نقره‌ای به روش کربی-بوئر

برای انجام روش کربی-بوئر، ابتدا عصاره اتانولی سنبله‌ای نقره‌ای توسط اشعه UV استریل شد. عصاره استریل شده در آب مقطر حل گردید و غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد. دیسک‌های کاغذی بلانک استریل به مدت ۳۰ دقیقه در هر یک از غلظت‌های ساخته شده خیسانده شد. پس از ۳۰ دقیقه، دیسک‌های آغشته به هر یک از غلظت‌های عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای توسط پنس استریل برداشته شد و با دقت به پتری دیش (۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون آگار) حاوی هر سویه میکروبی استاندارد که قبلا میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر باکتری به صورت چمنی و با استفاده از میله ال شکل استریل در سطح آن پخش شده بود با دقت جای‌گذاری شد. یک دیسک بلانک نیز در مرکز جهت نمونه کنترل منفی قرار گرفته شد. عمل پیش انتشار با قرار دادن هر پتری دیش به مدت ۲۰ دقیقه در یخچال انجام شد. پس از آن عمل انتقال محیط‌های کشت میکروبی به انکوباتور انجام گرفت. عمل انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، میزان هاله بازدارندگی هر سویه توسط

خط‌کش اندازه‌گیری شد و بر حسب میلی‌متر یادداشت شد [۱۱-۱۳]. جهت اطمینان از نتایج برای هر سویه میکروبی آزمون بیش از ۳ مرتبه تکرار گردید.

۲-۵- بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره اتانولی عصاره سنبله نقره‌ای به روش سیلندر پلیت

روش سیلندر پلیت مطابق با مطالعه مهدوی میمند و همکاران (۱۳۸۸)، انجام پذیرفت[۱٤].در این روش به طور خلاصه از سیلندرهایی از جنس استیل زنگ‌نزن با قطر داخلی ٦ میلی‌متر، ارتفاع ۱۰ میلی‌متر و قطر خارجی ۸ میلی‌متر استفاده شد. سیلندرها قبل از انجام آزمون با استفاده از حرارت خشک در دمای ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ دقیقه در آون استریل شدند. تعداد ۳ سیلندر در اطراف پتری‌دیش‌های میکروبی و با فواصل منظم از یکدیگر قرار گرفته شد. یک سیلندر نیز در مرکز پتری دیش به عنوان نمونه کنترل منفی قرار گرفت. غلظت‌های عصاره اتانولی استریل شده سنبله نقره‌ای درون سیلندرهای اطراف ریخته شد. پس از پر شدن سیلندرها از عصاره، پتری‌دیش‌ها جهت رشد هر سویه میکروبی (میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر سویه میکروبی بر سطح پتری دیش کشت چمنی داده شد) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از ۲٤ ساعت قطر هاله عدم رشد میکروبی بر حسب میلی‌متر گزارش شد[۱٤].لازم به ذکر می‌باشد که اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای برای هر سویه میکروبی ۳ مرتبه تکرار گردید و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید.

۲-٦- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای از ۲ روش میکرودایلوشن براث (چاهک ۹٦ خانه‌ای و معرف) و رقت آگار استفاده شد. در زیر هر یک از روش‌ها به طور خلاصه آورده شده است.

۲-٦-۱- روش میکرودایلوشن براث (میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای و معرف تری فنیل تترازولیوم کلرید)

در روش میکرودایلوشن براث، غلظت‌های مختلف از عصاره سنبله نقره‌ای با حل شدن ٤ گرم از عصاره سنبله نقره‌ای در محیط کشت مولر هینتون براث و دی متیل سولفوکسید (۹/۵ از محیط کشت و ۰/۵ از امولسیفایر) غلظت ٤۰۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر تهیه شد. سایر غلظت‌های متوالی عصاره از غلظت ٤۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با نصف شدن (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ٦/۲۵، ۳/۱۲۵ و ۱/۵٦۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. درون هر یک از خانه‌های میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ساخته شده ریخته شد. میزان ۱۰ میکرولیتر نیز از سوسپانسیون میکروبی استاندارد هر سویه میکروبی توسط سمپلر ریخته شد. ۲ خانه از میکروپلیت نیز به عنوان نمونه کنترل منفی (محیط کشت و اسانس) و کنترل مثبت (محیط کشت و باکتری) استفاده شد. در نهایت عمل گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. پس از گذشت ۲٤ ساعت میزان ۱۰ میکرولیتر از معرف رنگی به هر خانه اضافه شد. اولین خانه‌ای که در آن تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای گزارش شد[۱۵].

۲-٦-۲- روش رقت آگار

روش رقت آگار مطابق با مطالعه علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۱۷)، انجام شد[۱٦].در این روش غلظت‌های تهیه شده عصاره سنبله نقره‌ای با افزودن امولیسفایر (دی متیل سولفوکسید) در محیط کشت مولر هینتون آگار حل گردید. پس از بسته شدن محیط کشت میکروبی، عمل کشت سطحی از هر سویه میکروبی استاندارد انجام شد. در نهایت عمل انکوبه کردن پتری‌دیش‌های میکروبی به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از ۲٤ ساعت پتری‌دیش‌های میکروبی از نظر رشد کلنی مورد ارزیابی قرار گرفت. اولین پتری‌دیشی که در آن کلنی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید[۱٦].

۲-۷- تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای

تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای مطابق با روش حیدری سورشجانی و همکاران (۲۰۱۳) انجام گردید[۱۷]. در این روش به طور خلاصه میزان ۱۰۰ میکرولیتر از

غلظت خانه حداقل غلظت مهارکنندگی و غلظت‌های بالاتر عصاره به وسیله سمپلر به محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد. عمل پخش کردن توسط میله ال شکل انجام گردید. عمل گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت انجام شد. پس از زمان مذکور، پتری دیش‌ها مورد بررسی قرار گرفت و اولین پتری دیش که در آن هیچ کلنی نبود به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای گزارش گردید[۱۷].

۲-۸- آنالیز آماری

از نرم افزار SPSS و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد. سطح معنی‌داری ۵ درصد در نظر گرفته شد. حداقل تکرار برای هر یک از آزمون‌های ضدمیکروبی ۳ مرتبه بود.

۳- نتایج و بحث

در پژوهش حاضر اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای (بومی ایران) بر باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *انتروباکتر ائروژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش‌های متنوع کیفی و کمی (کربی-بوئر، سیلندر پلیت، رقت آگار، میکرودایلوشن براث و حداقل غلظت کشندگی) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج حاصل از اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای به روش کربی-بوئر بر سویه‌های باکتری عامل عفونت و مسمومیت غذایی در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* نسبت به *اشرشیا کلی* و *انتروباکتر ائروژنز* بیشتر بود. بیشترین هاله عدم رشد در روش کربی-بوئر برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با قطر ۱۸/۸۰ میلی‌متر مشاهده شد. میزان قطر هاله عدم رشد برای مقاوم‌ترین سویه (*انتروباکتر ائروژنز*) در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برابر با ۱۲/۳۰ میلی‌متر بود. در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای تمامی باکتری‌های مورد بررسی به جز باکتری گرم منفی *انتروباکتر ائروژنز* هاله عدم رشد مشاهده شد. میزان قطر هاله عدم رشد مشاهده شده در روش کربی-بوئر برای باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس* تقریبا یکسان بود و از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری نداشت. قطر هاله عدم رشد مشاهده شده برای باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *اشرشیا کلی* در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۱٦/٦۰ و ۱٦ میلی‌متر بود. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره اتانولی سنبله‌نقره‌ای میزان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا کرد. به نظر می‌رسد یک رابطه مستقیم میان قطر هاله عدم رشد میکروبی و افزایش غلظت عصاره سنبله نقره‌ای وجود دارد. مقایسه دوتایی نتایج هاله عدم رشد میان غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای برای باکتری‌های بیماری‌زای عامل عفونت و مسمومیت غذایی نشان داد که میان غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری *اشرشیا کلی* اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. نتایج آماری نشان داد در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای تمامی سویه‌های بیماری‌زا اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده گردید.

Table 1 Mean inhibition zone diameter (mm) of *Stachysbyzantina*extract on some *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*(Kirby-Bauer method)

Microorganism \ Concentration	25 mg/ml	50 mg/ml	75 mg/ml
Enterobacter aerogenes	-	9.70 ±0.27^{b}	12.30 ±0.50^{a}
Escherichia coli	11.00 ±0.32^{b}	12.10 ±0.45^{b}	16.00 ±0.42^{a}
Staphylococcus aureus	13.10 ±0.44^{c}	15.90 ±0.39^{b}	18.80 ±0.31^{a}
Bacillus cereus	11.20 ±0.40^{c}	13.30 ±0.66^{b}	16.60 ±0.50^{a}

Values are expressed as mean ±standard deviations, $n = 3$; different letters (a, band c) in each row show significant difference at $p \geq 0.05$.

نتایج حاصل از اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای به روش سیلندر پلیت بر باکتری *اشرشیا کلی*، *انتروباکتر ائروژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد که قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*) نسبت به باکتری‌های گرم منفی

(*اشرشیا کلی* و *انتروباکتر ائروژنز*) بزرگتر بود. در روش سیلندر پلیت نیز همانند روش کربی-بوئر قطر هاله عدم رشد (هاله بازدارندگی) برای باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین (۱۷/۹۰ میلی‌متر) بود. میزان قطر هاله عدم رشد برای باکتری گرم منفی*انتروباکتر ائروژنز* (مقاوم‌ترین سویه) در غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برابر با ۱۳/۱۰ میلی‌متر بود. در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری‌های *انتروباکتر ائروژنزو اشرشیا کلی* هاله عدم رشد مشاهده نشد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای، قطر هاله عدم رشد برای میکروارگانیسم های مورد بررسی افزایش یافت. عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای، بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی موثر بود و توانست از رشد آن‌ها بر سطح محیط کشت جلوگیری نماید، اما میزان اثر بخشی آن بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بوده و در غلظت برابر از عصاره اتانولی گیاه سنبله نقره‌ای بر باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوساورئوس* نسبت به باکتری‌های گرم منفی *انتروباکتر ائروژنز* و *اشرشیاکلی* موثرتر بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها در برابر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای، بر اساس مقاوم‌ترین به حساس‌ترین سویه میکروبی به ترتیب شامل: *E. coli >E. aerogenes > S.aureus>B. cereus* بود.

مقایسه دوتایی نتایج هاله عدم رشد میان غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای به روش سیلندر پلیت برای باکتری‌های بیماری‌زای شاخص غذایی نشان داد که میان تمامی غلظت‌های عصاره اتانولی اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود دارد.

Table 2.Mean inhibition zone diameter (mm) of *Stachysbyzantina* extract on some *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* (Cylinder-plate method)

Concentration / Microorganism	25 mg/ml	50 mg/ml	75 mg/ml
Enterobacter aerogenes	-	9.50 ±0.60^{b}	13.10 ±0.67^{a}
Escherichia coli	-	10.90 ±0.28^{b}	15.60 ±0.39^{a}
Staphylococcus aureus	13.00 ±0.60^{c}	16.20 ±0.58^{b}	17.90 ±0.56^{a}
Bacillus cereus	12.60 ±0.66^{c}	15.00 ±0.64^{b}	17.60 ±0.63^{a}

Values are expressed as mean ±standard deviations, $n = 3$; different letters (a, b and c) in each row show significant difference at $p \geq 0.05$.

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی به روش‌های میکرودایلوشن براث و رقت آگار در جدول ۳، آورده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی به روش میکرودایلوشن براث برای باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *انتروباکتر ائروژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*به ترتیب ۵۰، ۱۰۰، ۲۵ و ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی به روش رقت آگار برای باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *انتروباکتر ائروژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۵۰، ۱۰۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای در جدول ۳، آورده شده است.

Table 3 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the *Stachysbyzantina* extract on some *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*

Microorganism	MIC (micro-well dilution) (mg/ml)	MIC (agar dilution) (mg/ml)	MBC (mg/ml)
Enterobacter aerogenes	100	100	200
Escherichia coli	50	50	100
Staphylococcus aureus	6.25	12.5	25
Bacillus cereus	25	25	100

نتایج حداقل غلظت کشندگی برای باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *انتروباکتر ائروژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. به طور کلی اثر عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای بر باکتری‌های گرم مثبت

بیشتر بود و در غلظت کم‌تری از عصاره توانست باعث مهار رشد و کشندگی سویه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر شود. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی در هر دو روش نسبت به حداقل غلظت کشندگی کم‌تر بود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که از میان باکتری‌های مورد بررسی، باکتری‌های گرم مثبت همانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* با سهولت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی (پوشش سلولی باکتری‌های گرم منفی دارای ساختمانی چندلایه و بسیار پیچیده است) همانند *اشرشیا کلی* و *انتروباکتر ائروژنز* مهار گردید. دلیل این امر را می‌توان به لایه لیپوپلی‌ساکاریدی غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی که خود نیز از سه بخش لیپید A، اولیگوساکارید مرکزی (هسته مرکزی) و آنتی‌ژن O تشکیل شده است مرتبط دانست. این لایه به طور طبیعی باکتری‌های گرم منفی را به عوامل خارجی همانند رنگ‌های آبدوست، آنتی‌بیوتیک‌ها و شوینده‌ها مقاوم می‌کنند [۱۶ و ۱۸]. شایان ذکر است که دیواره خارجی لیپوپلی ساکاریدی به دلیل حضور پروتئین‌های پورین فراوان در آن، به راحتی اجازه عبور مواد محلول آب‌دوست و کوچک را می‌دهد اما این دیواره به عنوان سدی محکم در مقابل ترکیبات آبگریز، درشت مولکول و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. با توجه به اینکه اکثر ترکیبات موجود در عصاره جز ترکیبات آبگریز هستند بنابراین، به راحتی نمی‌توانند از سد این دیواره عبور کنند. به همین دلیل با توجه به اینکه باکتری‌های گرم مثبت فاقد این غشای خارجی می‌باشند بنابراین تاثیر عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی معمولا بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. این پدیده در بسیاری از پژوهش‌های گذشته نیز ذکر شده است [۱۵-۱۸].

سفرکار و همکاران (۱۳۹۶)، فعالیت ضدمیکروبی و هم‌افزایی عصاره الکلی سنبله نقره‌ای را بر تعدادی از سویه‌های بیماری‌زای استاندارد با روش‌های دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث در شرایط برون‌تنی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس* گروه A و *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشرشیا کلی* به ترتیب ۲۳/۲، ۱۸/٤، ۱٤/٤، ۵ و ۱۱/۷ میلی‌متر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره نیز برای باکتری‌های مذکور نیز به ترتیب برابر با ۱۲/۵، ۵۰، ۵۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. این پژوهشگران همچنین گزارش کردند که حداقل غلظت کشندگی برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس* گروه A و *سودوموناس ائروژینوزا* و *اشرشیا کلی*نیز به ترتیب ۱۰۰، ۲۵، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. مقایسه نتایج این پژوهشگران با نتایج مطالعه حاضر تا حدود بسیار زیادی همخوانی داشت[۸]. در مطالعه ما نیز کم‌ترین غلظت مهارکنندگی و غلظت کشندگی برای باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. نتایج پژوهش حاضر با مطالعه Dulgerو همکاران (۲۰۰۵) نیز مشابه بود. این پژوهشگران گزارش کردند که عصاره متانولی گونه‌های مختلف سنبله بر باکتری‌های بیماری‌زا گرم مثبت و گرم منفی موثر است. میزان اثر گذاری عصاره متانولی گونه‌های مختلف سنبله بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود[۱۹]. شایان ذکر است برخی از تفاوت‌های مشاهده شده درباره فعالیت ضدمیکروبی عصاره سنبله را می‌توان به شرایط انجام آزمایش و همچنین گونه‌های مختلف گیاه مرتبط دانست. روش خشک کردن گیاه، نوع حلال، نحوه استخراج عصاره، شرایط رشد گیاه، مرحله برداشت گیاه، نوع خاک و ... از جمله عوامل موثر بر ترکیبات موثر عصاره گیاهان دارویی است[۱۶].

٤- نتیجه‌گیری

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که عصاره اتانولی گیاه سنبله نقره‌ای دارای فعالیت ضدمیکروبی مناسبی بود. اثر فعالیت ضدباکتریایی عصاره سنبله نقره‌ای بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. نتایج پژوهش حاضر امکان استفاده از عصاره این گیاه را به عنوان یک ماده ضدمیکروبی موثر به ویژه موارد مقاومت دارویی را مطرح می‌کند. هر چند لازم است در ادامه ترکیبات شیمیایی و دور موثر گیاه نیز تعیین گردد. حساس‌ترین و مقاومت میکروارگانیسم بیماری‌زا نسبت به عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای به ترتیب *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروباکتر ائروژنز* بود. پیشنهاد می‌گردد اثر عصاره اتانولی سنبله نقره‌ای بر سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و همچنین آزمون-

های بالینی به صورت گسترده‌تر انجام گیرد تا بتوان از پتانسیل بالقوه عصاره سنبله نقره‌ای در صنایع غذایی و داروسازی بهره‌مند شد.

۵- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

۵- منابع

[1] Pirnia, M. (2019). Gellatin-Gum olibanum (*Boswelliacarteri*) based antimicrobial-edible films incorporated with ascorbic acid and *Hyssopus officinalis L.* essential oil on the shelf-life of fresh Ostrich meat at refrigerator temperature. Ph.D. Dissertation. Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

[2] Corns, C. M. (2003). Herbal remedies and clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry,* 40(5), 489-507.

[3] Weinstein, R. A. (2001). Controlling antimicrobial resistance in hospitals: infection control and use of antibiotics. *Emerging infectious diseases,* 7(2), 188-192.

[4] Mosaddegh, M., and Naghibi, F. (2002). Iran Traditional Medicine: Past & Present. *Traditional Medicine &Materiamedica*, 1, 2-20.

[5] Nejati, V., &Khaneshi, F. (2013). Effect of hydro-alcoholic extract of Plantago major leaf on serum level of insulin, glucose, and histology of pancreas and kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. *Qom University of Medical Sciences Journal,* 7(5), 14-20. [Full text in Persian].

[6] AlizadehBehbahani, B., TabatabaeiYazdi, F., Fakhri, S., Mortazavi, S. A., &Mohebbi, M. (2017). Investigation of chemical compounds and antibacterial activity of Tarragon (Artemisia dracunculus) essential oil on some pathogenic bacteria in vitro. *Qom University of Medical Sciences Journal,* 11(9), 42-51.

[7] Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology,* 22(4), 273-292.

[8] Safarkar, R., Bonabi, R., Massiha, A., RezaeiNazifi, M., & Sotoudeh, R. (2017). An evaluation of the inhibitory and synergistic effects of alcoholic extract of Stachysbyzantina on standard strains under in vitro conditions. *Journal of Babol University of Medical Sciences,* 19(5), 39-46. [Full text in Persian].

[9] Sonboli, A., Salehi, P., & Ebrahimi, S. N. (2005). Essential oil composition and antibacterial activity of the leaves of Stachysschtschegleevii from Iran. *Chemistry of natural compounds,* 41(2), 171-174.

[10] Skaltsa, H. D., Lazari, D. M., Chinou, I. B., &Loukis, A. E. (1999). Composition and antibacterial activity of the essential oils of Stachys candida and S. chrysantha from southern Greece. *Planta Medica,* 65(03), 255-256.

[11] TabatabaeiYazdi, F., AlizadeBehbahani, B., HeidariSureshjani, M. (2014). The comparison of antimicrobial effects of Chevil (Ferulagoangulata) extract with a variety of common therapeutic antibiotics in vitro. Journal of Arak University Medical Sciences, 17 (3), 35-46. [Full text in Persian].

[12] TabatabaeiYazdi, F., AlizadeBehbahani, B., & Mortazavi, A. (2014). Investigating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the Lavandulastoechas L. and Rosmarinus officinalis L. extracts on pathogen bacterias "in vitro". *Journal of Paramedical Sciences (JPS),* 5(2), 91-101.

[13] Barzegar, H., Mehrnia, M.A., AlizadehBehbahani, B. (2018). Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *HeracleumLasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. Journal of Applied Microbiology in Food Industry, 4(4), 15-28. [Full text in Persian].

[14] MahdaviMeymand, Z., Moshafi, M. H., &Forotanfar, H. (2009). Antibacterial activity of metanolic extract of 12 herbal species on 6 bacterial strains using Cylinder-plate method. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences,* 8(3), 227-238. [Full text in Persian].

[15] AlizadehBehbahani, B., Falah, F., Lavi Arab, F., Vasiee, M., &TabatabaeeYazdi, F. (2020). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities of Cinnamomum zeylanicum bark essential oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* 2020, 1-8.

[16] AlizadehBehbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., &Mohebbi, M. (2017). Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (Artemisia dracunculus) extract and chemical composition of its essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization,* 11(2), 847-863.

[17] Sureshjani, M. H., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Behbahani, B. A., & Shahidi, F. (2014). Antimicrobial effects of Kelussiaodoratissima extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. *Journal of Paramedical Sciences,* 5(2), 115-120.

[18] Zare, Z., Majd, A., Sattari, T. N., Iranbakhsh, A., & Mehrabian, S. (2012). Antimicrobial activity of leaf and flower extracts of Lippianodiflora L.(Verbenacea). *Journal of Plant Protection Research*, 52(4), 401-403.

[19] Dulger, B., Ugurlu, E., Aki, C., Suerdem, T. B., Camdeviren, A., &Tazeler, G. (2005). Evaluation of antimicrobial activity of some endemic Verbascum., Sideritis., and Stachys. species from Turkey. *Pharmaceutical Biology,* 43(3), 270-274.

The antimicrobial effect of *Stachysbyzantina* extract on pathogenic bacteria using agar dilution and Cylinder-plate methods

Noshad, M.[1], AlizadehBehbahani, B. [1*]

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food
2. Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

(Received: 2020/06/19 Accepted: 2020/08/22)

Stachysbyzantina belongs to Lamiaceae family. Regarding to the biologically active compounds and traditional use of the *Stachysbyzantina* for treatment of wounds and a cold, it seems that this plant has significant antibacterial effects. The aim of this study was evaluation of antibacterial effect of ethanolic extract of *Stachysbyzantina*against *Enterobacteraerogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. The inhibition zone diameter of the *Stachysbyzantina* extract on *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* was identified on a concentration of 25, 50, and 75 mg/mL, respectively, by Cylinder-plate and Kirby-Bauer methods. Moreover, minimum inhibitory concentration (MIC) (agar dilution and micro-well dilution) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the pathogenic microorganisms were determined in this study. The data were analyzed using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. The highest and lowest inhibition zone with a diameter of 17.90 and 13.10 mm at a concentration of 75 mg/mL were observed for *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter aerogenes* bacteria, respectively (Cylinder-plate method). The MIC of *Stachysbyzantina*extract for *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* was 100, 50, 25 and 12.5 mg/mL respectively (agar dilution). The ethanolic extract of *Stachysbyzantina"in vitro"* has a significant antibacterial effect on *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli* (Gram-negative bacteria)and *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* (Gram-positive bacteria).

Keywords: *Stachysbyzantina*, Cylinder-plate method, Agar dilution, Kirby-Bauer method.

* Corresponding Author E-Mail Address: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir