بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* (*Salvia chorasanica*) علیه برخی باکتری‌های عامل فساد و مسمومیت

اعظم مهربان[1]، محمدرضا عدالتیان دوم[2*]، محمد حسین حداد خداپرست[3]،

معصومه مهربان سنگ آتش[4]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استاد بازنشسته گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

٤- استادیار گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، جهاد دانشگاهی مشهد

(تاریخ دریافت: ٩٤/١٢/٠٥ تاریخ پذیرش: ٩٥/٠٥/٢٧)

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC: 6538)، *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC: 21299) ، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC: 14028) و *اشریشیا کلی* (ATCC: 25922) می‌باشد. در این پژوهش اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها با استفاده از روش انتشار در آگار بررسی شد. جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نیز روش میکرودایلوشن به‌وسیله الایزا و افزودن معرف تری‌فنیل تترازولیوم کلراید استفاده گردید. بیشترین قطر هاله بازداری در روش انتشار در آگار مربوط به عصاره‌های آبی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی *سالویا خراسانیکا* در مقابل باکتری *انتروکوکوس فکالیس* بود. میزان MIC محاسبه شده در مورد عصاره‌های آبی و اتانولی اندام‌های هوایی باکتری‌های گرم مثبت معادل ٦٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در مورد *اشریشیا کلی* معادل ٦٠ و ١٢٠ میلی‌گرم بر میلی-لیتر و برای *سالمونلا تیفی‌موریوم* به ترتیب ١٢٠ و ٢٤٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. این مقدار برای عصاره‌های هیدروالکلی در مورد باکتری‌های گرم مثبت ٦٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در مورد باکتری‌های گرم منفی برابر با ١٢٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

کلید واژگان: اثر ضد باکتریایی، انتشار در آگار، *سالویا خراسانیکا*، میکرودایلوشن.

*مسئول مکاتبات: edalatian@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-11]

۱- مقدمه

شرح مساله

بیماری‌های عفونی یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر بخصوص در کشورهای جهان سوم است. آنتی‌بیوتیک‌های موجود، مشکلاتی همچون مقاوم شدن ایزوله‌های بیماری‌زا در برابر آن‌ها را در بر دارند. از طرف دیگر مصرف طولانی و حتی مقطعی آن‌ها عوارض جانبی برجا می‌گذارد که بعضاً ممکن است از خود بیماری نیز خطرناک‌تر باشد. به همین دلیل تهیه آنتی‌بیوتیک‌های جدید ضروری به نظر می‌رسد[۱]. در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی برای ارزیابی آثار ضد میکروبی انواع اسانس‌ها، عصاره‌ها و ادویه‌ها صورت گرفته‌است که حاکی از قدرت و توانایی این ترکیبات در جلوگیری از رشد دامنه وسیعی از میکروارگانیسم-های بیماری‌زا و عامل فساد در مواد غذایی می‌باشد. از آنجا که این ترکیبات کاملا طبیعی هستند زیان آن‌ها برای سلامت انسان و محیط زیست بسیار کمتر از مواد نگه‌دارنده شیمیایی می‌باشد [۲].

گیاهان خانواده نعناع سالیان متمادی است به عنوان دارو به مصرف می‌رسند. در استان خراسان، ۳۰ جنس و بیش از صد گونه از گیاهان خانواده نعناع موجود می‌باشد که تا کنون از میان آن‌ها حداقل ۱۵ جنس، دارویی شناخته شده‌اند ولی قطعا در میان بقیه گیاهان این خانواده نیز انواع دارویی وجود دارد که هنوز مورد بررسی فیتوشیمی قرار نگرفته‌اند و برای تحقیقات آزمایشگاهی در این زمینه کاملا مناسب و نتیجه بخش خواهند بود [۳]. گونه‌های سالویا (متعلق به خانواده نعناع) به دلیل فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی در طب سنتی و پزشکی مدرن شناخته شده هستند. تحقیقات شیمیایی گذشته بر گونه‌های مختلف سالویا نشان داده‌اند که حضور فلاوونوییدها، تری-ترپنوییدها و اسانس‌های روغنی در این گیاه دلیل ایجاد فعالیت-های ضد توموری، ضدمیکروبی، سمیت برای سلول[1] و ضد التهاب آن می‌باشند [٤]. *سالویا خراسانیکا* یکی از گونه‌های بومی ایرانی سالویا است که تنها درخراسان رضوی رشد می‌کند. گزارش‌های مختلف اثر سمیت برای سلول و پروآپوپتوزی[2] این گونه را بر سلول‌های سرطانی دهانه رحم تایید کرده‌اند [۵].

Sivropoulou و همکاران (۱۹۹۷) در بررسی فعالیت ضدمیکروبی و ضدویروسی اسانس مریم گلی (*Salvia fructicosa*) مشاهده کردند که ترکیبات عمده این اسانس، ۱و۸ سینول[3]، توجون[4] و کامفور[5] است. همچنین مشخص شد که سینول و توجون دارای خاصیت ضدمیکروبی در برابر گونه‌های باکتریایی مورد بررسی (*اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا تیفی موریوم، استافیلوکوکوس اورئوس، رایزوبیوم لگومینوزاریوم و باسیلوس سوبتلیس*) است و کامفور تقریباً در برابر همه این باکتری‌ها غیر فعال می‌باشد [٦].

استافیلوکوک‌ها باکتری‌های کروی، گرم مثبت و بدون حرکتی هستند که در مجاورت هوا و یا در غیاب هوا رشد می‌کنند. *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از موفق‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا است که به دلیل تولید رنگدانه طلایی کارتنوییدی به نام استافیلوزانتین[6] کلنی‌های زرد رنگی ایجاد می‌نماید. این پیگمان در بیماری‌زایی نقش دارد زیرا به عنوان ماده آنتی اکسیدان عمل کرده و موجب در امان ماندن باکتری در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط سیستم ایمنی (گلبول‌های سفید) میزبان برای کشتن باکتری‌ها تولید می‌شوند [۷].

باکتری‌های جنس انتروکوکوس، ارگانیسم‌هایی گرم مثبتی هستند که اغلب در سبزیجات، گیاهان و مواد غذایی مخصوصا غذاهایی با منشا حیوانی مانند محصولات لبنی حضور دارند. در این پژوهش *انتروکوکوس فکالیس* جهت بررسی خواص ضد میکروبی عصاره گیاه *سالویا خراسانیکا* از خانواده انتروکوکاسه انتخاب شد. این باکتری را از بعضی افراد که دچار عفونت غذایی شده‌اند، جدا کرده‌اند. این گونه نسبت به گونه‌های هم خانواده خود بیشتر از سایر گونه‌ها مختص به روده است [۸].

انتروباکتریاسه‌ها گروه بزرگی از باسیل‌های گرم منفی و بدون اسپور بوده که انواع مختلفی از توکسین‌ها وسایر عوامل بیماری‌زا را تولید می‌کنند. تعدادی از آن‌ها ساپروفیت و عده‌ای بیماری‌زا هستند [۹] *سالمونلا تیفی‌موریوم* عامل بیماری پاراتیفوئید یا شبه حصبه می‌باشد. باکتری *اشریشیا کلی* به صورت عادی در دستگاه گوارش انسان زندگی می‌کند و معمولاً بیماری‌زا نیست، ولی سویه‌های خاصی از این باکتری تحت شرایط خاص می‌توانند بیماری‌های مختلفی ایجاد کنند. برخی از گونه‌های *اشریشیا کلی*

1. Cytotoxic
2. Proapoptosis

3. Cineole
4.Thujone
5. Camphor
6. Staphyloxanthin

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-11]

باعث اسهال خونی، ناراحتی‌های کلیوی و عفونت مجاری ادراری می‌شوند. این باکتری‌ها نیز نظیر سالمونلا از طریق فضولات حیوانی که روی غذاها و گوشتی که خوب پخته نشده باشد، به بدن انسان منتقل می‌شوند و شاخص آلودگی‌های مدفوعی در فرآورده‌های غذایی محسوب می‌شود [۱۰].

وجود ترکیبات فعال بیولوژیک در گیاه *سالویا خراسانیکا* و بومی بودن این گیاه در استان خراسان دلیلی شد تا در این پژوهش اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکی اندام هوایی *سالویا خراسانیکا* را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 6538)، *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC 21299)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC *14028*) و *اشریشیا کلی* (ATCC 25922) تعیین کنیم.

۲- روش تحقیق

شناسایی و آسیاب کردن اندام هوایی

گیاه *سالویا خراسانیکا* در اردیبهشت ۱۳۹۲ از ارتفاعات منطقه زشک شهرستان مشهد، استان خراسان رضوی جمع آوری و با همکاری هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد مورد شناسایی قرار گرفتند. اندام‌های هوایی این گیاه پس از آنکه در شرایط مناسب و در سایه خشک شدند ، جهت تهیه عصاره با آسیاب پودر شد [۱۱].

عصاره‌گیری

عصاره‌گیری به روش خیساندن در سه حلال اتانول ۹٦ درجه، آب مقطر و مخلوط آب و اتانول ۹٦ درجه (با نسبت ۸۰:۲۰ بر اساس صمصام شریعت، ۱۳۷۱) انجام گرفت. برای این منظور به ارلن‌های حاوی ۵۰ گرم از اندام‌های هوایی پودر شده به طور جداگانه ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، اتانول ۹٦ درجه و مخلوط آب و اتانول اضافه شد و پس از آن ارلن‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار گرفتند. مایع رویی پس از جمع آوری با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، سپس از صافی µ ۰/٤۵ عبور داده شد. در ادامه از دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) جهت حذف حلال استفاده گردید، در انتها به منظور جلوگیری از اثر نور و گرما عصاره‌ها در ظروفی استریل با پوشش ورق آلومینیوم تا زمان آزمایش در دمای یخچال نگهداری شدند [۱۲،۱۳]. تمامی آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام پذیرفتند.

تهیه سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک فارلند

۲٤ساعت قبل از انجام آزمایش، از باکتری فعال در مرحله فاز لگاریتمی در محیط کشت مولر هینتون براث استفاده گردید. سپس کدورت سوسپانسیون حاصل توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۲۵ نانومتر اندازه گیری شد و تا برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ استاندارد مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق شد [۱٤].

تعیین حداقل غلظت مهار کننده از رشد (MIC)

ابتدا جهت تهیه غلظت مادر برای عصاره‌های آبی توسط آب مقطر و عصاره‌های اتانولی و هیدروالکلی توسط دی‌متیل سولفوکساید[7] ۵ درصد غلظتی برابر با ۹٦۰mg/ml تهیه و با استفاده از فیلتر با قطر منافذ ۰/٤۵میکرون، استریل و پس از آن غلظت‌های سریالی عصاره، به ترتیب زیر درست گردید. در میکروپلیت‌های ۹٦ خانه ابتدا درون همه چاهک‌ها ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث (مرک آلمان) با غلظت مضاعف اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت اولیه عصاره که بالاترین غلظت مورد آزمون بود، به چاهک اول اضافه گردید، در این حالت غلظت عصاره در خانه اول به نصف (٤۸۰mg/ml)کاهش می‌یابد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته شد و به چاهک دوم منتقل گردید. این کار برای همه چاهک‌ها به غیر از چاهک شماره ۱۲ که کنترل مثبت است انجام گرفت. یعنی ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک شماره ۱۰ برداشته شد و به چاهک شماره ۱۱ که شاهد و کنترل منفی بود، اضافه گردید، به منظور مخلوط شدن کامل عصاره با محیط کشت در هر مرحله چند مرتبه سمپلر، پر و خالی گردید. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک شماره ۱۱ برداشته و دور ریخته‌شد. در مرحله بعد به تمام چاهک‌ها به غیر از چاهک شماره ۱۱ (کنترل منفی) ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند (با غلظت $1/5\times10^{8}$ cfu/ml) اضافه شد. سپس میزان کدورت اولیه چاهک‌ها پس از اینکه میکروپلیت به مدت ۷ ثانیه در دستگاه الایزا تکان داده شد، در طول موج ٦۳۰ نانومتر قرائت گردید. پس از آن میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲٤ ساعت

7. Dimethyl sulfoxide

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-11]

گرمخانه‌گذاری گردید. پس از طی زمان لازم دوباره میزان جذب یا کدورت چاهک‌ها توسط دستگاه الایزا قرائت و مقایسه شد. کمترین غلظت عصاره که مانع رشد باکتری شده بود، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد. تیمارها در ۳ تکرار انجام شد[۱۵،۱۶]. جهت تطابق نتایج حاصل از الایزا از محلول ۵ mg/ml تری‌فنیل تترازولیوم کلراید نیز استفاده گردید، به این ترتیب مقدار ۵۰ میکرولیتر از معرف مذکور درتمام چاهک‌های پلیت ریخته و مجدداً به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. یک غلظت بالاتر از آخرین غلظتی که رنگ قرمز تترازولیوم را به خود گرفته به‌عنوان MIC باکتری در نظر گرفته شد [۱۷].

تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC)

به منظور تعیین MBC عصاره از هر کدام از خانه‌های میکروپلیت که رنگ قرمز نگرفته اند ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. پس از گذشت زمان لازم پلیت‌ها از گرمخانه خارج و نتایج آن‌ها بررسی شد. غلظتی که در آن رشدی مشاهده نگردید به‌عنوان MBC عصاره برای باکتری موردنظر در نظر گرفته شد [۱۸].

روش انتشار در آگار

جهت بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* از روش انتشار در آگار به کمک دیسک استفاده شد. در این روش انتشار ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از کشت استاندارد هر سویه روی سطح محیط آگار کشت داده شد و توسط اسپریدر شیشه‌ای استریل بر سطح آگار پخش شد. عصاره‌های آبی توسط آب مقطر و عصاره-های اتانولی و هیدروالکلی توسط دی‌متیل سولفوکساید ۵ درصد رقیق و از صافی µ ۰/۴۵ عبور داده شدند. دیسک‌های بلانک پس از آنکه در غلظت‌های mg/ml ۲۴۰،۴۸۰،۹۶۰ عصاره خیسانده شدند، توسط پنس استریل با کمی فشار بر سطح محیط کشت ثابت گردیدند. در نهایت پس از آنکه پتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر با استفاده از خط‌کش میلی‌متری به طور دقیق اندازه‌گیری شدند [۱۹].

طرح آماری

داده‌های حاصل، به روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، با استفاده از نرم افزار SPSS Ver 16 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار خواهند گرفت. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای Duncan در سطح احتمال ۵ درصد استفاده خواهد شد.

۳- نتایج

نتایج نشان داد در روش میکرودایلوشن حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره آبی اندام‌های هوایی *سالویا خراسانیکا* از طریق مقایسه کدورت چاهک‌ها توسط دستگاه الایزا در خصوص باکتری‌های گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بصورت یکسان و معادل ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و در خصوص باکتری‌های گرم منفی *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیا کلی* به ترتیب معادل ۱۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین مشخص گردید MIC عصاره اتانولی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* در خصوص باکتری‌های گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز با یکدیگر برابر و معادل ۱۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در خصوص باکتری‌های گرم منفی *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *اشریشیا کلی* به ترتیب معادل ۲۴۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشخص گردید. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* در این روش برای *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. این مقدار برای باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* به ترتیب برابر ۱۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.

نمودارهای تعیین محدوده MIC عصاره‌های مورد آزمون در خصوص باکتری‌های مورد مطالعه که توسط نرم افزار اسلاید رایت[8] رسم شده اند در شکل‌های ۱ الی ۳ قابل مشاهده است. این نمودارها بر اساس محل تلاقی نمودار کدورت مربوط به تیمار (میکروارگانیسم، عصاره و محیط کشت) با نمودار کدورت مربوط به شاهد (عصاره و محیط کشت)، محدوده اثر ضد باکتریایی عصاره‌های مورد نظر را مشخص می‌کنند. محدوده بین

8. Slide Write Plus

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-11]

قرار گرفتن نمودار رشد باکتری زیر نمودار نمونه شاهد (نمونه بدون باکتری) تا نقطه تلاقی دو نمودار، محدوده MIC عصاره خواهد بود.

Table 1 Results of Minimum inhibitory concentration (MIC) of aqueous, ethanolic and hydro alcoholic extracts of *Salvia chorasanica* aerial organs using ELISA (mg/ml)

Type of extract	*Staphylococcus aureus*	*Enterococcus faecalis*	*Salmonella typhimurium*	*Escherichia coli*
aqueous	60±0.4a	60±0.2a	120±0.09b	60±0.08a
ethanolic	120±0.01b	120±0.01b	240±0.04c	120±0.01b
hydro alcoholic	60±0.06a	60±0.04a	120±0.06b	120±0.08b

Dissimilar letters in one row, represent the presence of significant difference (α= 5%) among the antimicrobial effect of various extracts.
Similar letters in one row, represent the absence of significant difference (α= 5%) among the antimicrobial effect of various extracts.

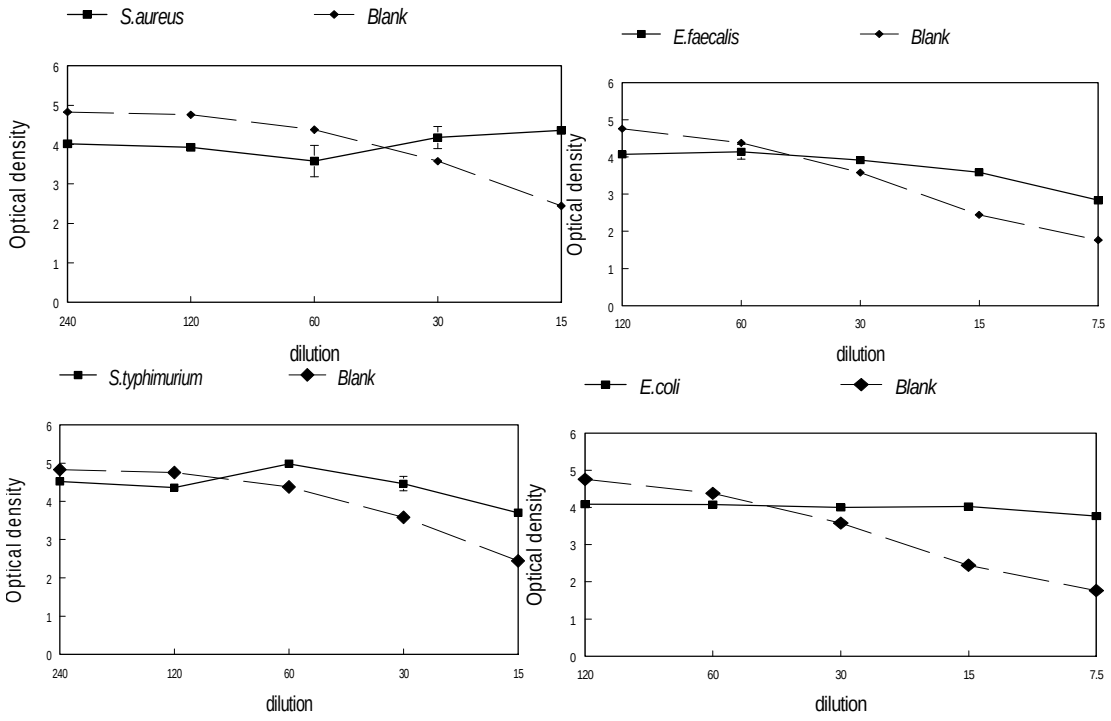

Fig 1 Range of antimicrobial effect of aqueous extract of *Salvia chorasanica* aerial organs against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* .

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-11]

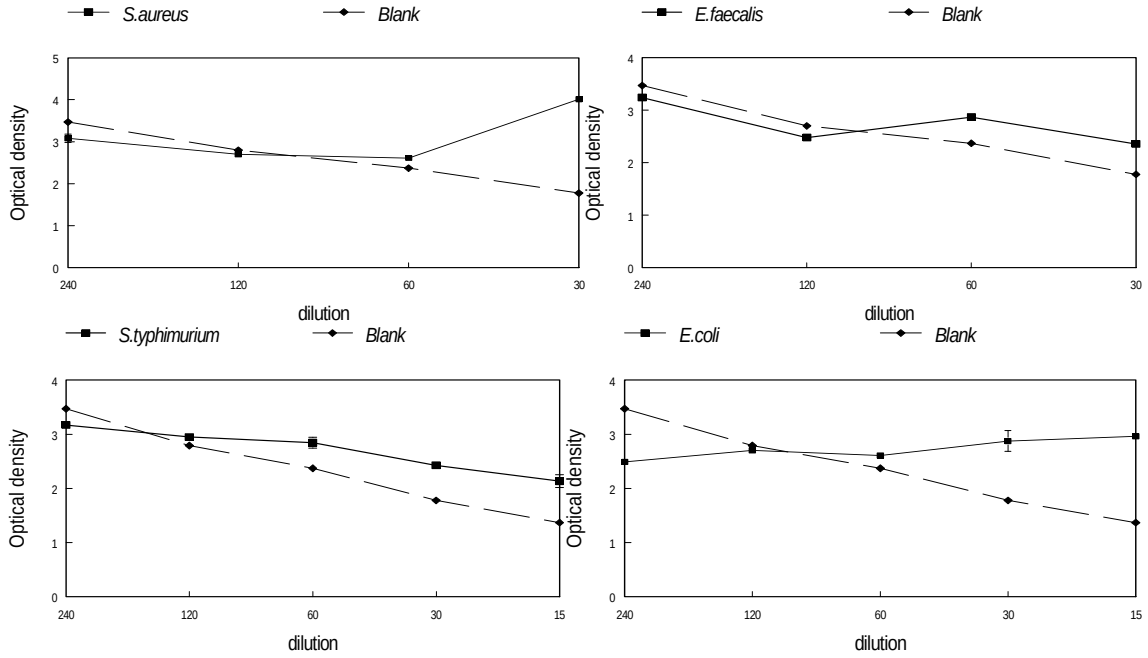

Fig 2 Range of antimicrobial effect of ethanolic extract of *Salvia chorasanica* aerial organs against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli***.**

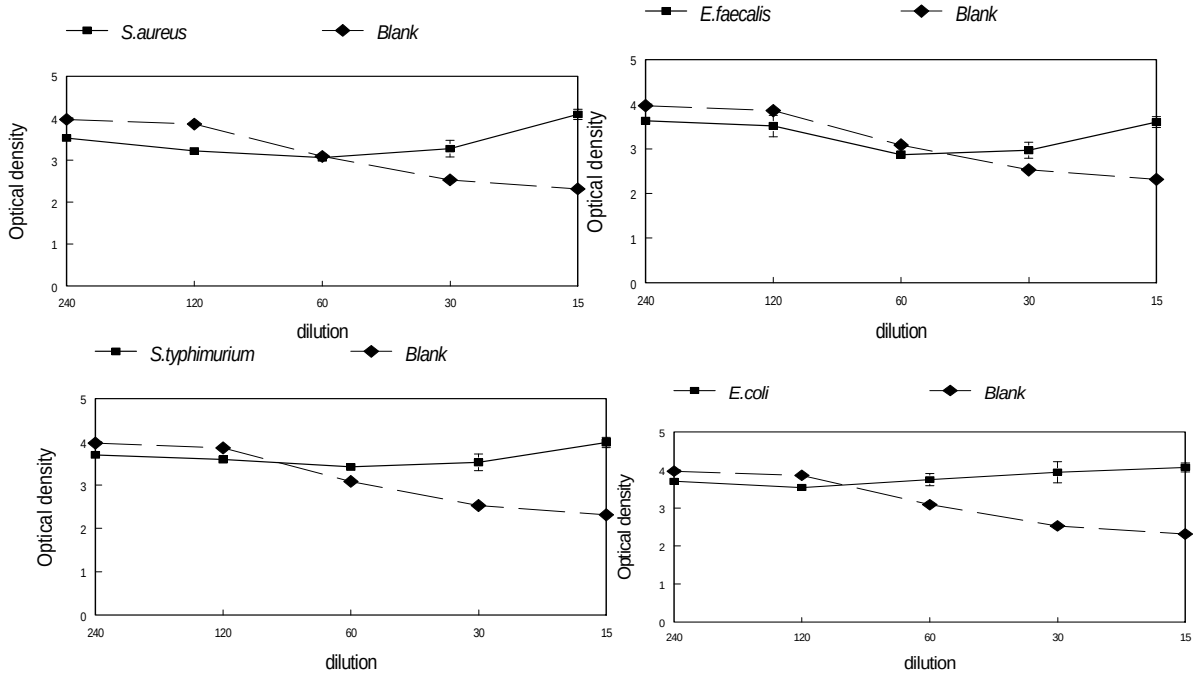

Fig 3 Range of antimicrobial effect of hydro alcoholic extract of *Salvia chorasanica* aerial organs against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli***.**

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-11]

نتایج به‌دست آمده از افزودن معرف تری‌فنیل تترازولیوم کلراید به کلیه چاهک‌ها و گرمخانه گذاری مجدد میکروپلیت‌ها نیز با نتایج حاصل از مقایسه کدورت چاهک‌ها به وسیله الایزا مطابقت داشتند.

در بررسی حداقل غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی اندام‌های هوایی مشخص شد که کمترین غلظت کشندگی این عصاره مربوط به باکتری‌های گرم مثبت، معادل ۱۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود همچنین مشاهده شد بیشترین غلظت کشندگی در اکثر باکتری‌ها مربوط به عصاره اتانولی اندام‌های هوایی بوده به طوری که کمترین اثر را بر باکتری‌های گرم منفی داشته است.

Table 2 Results of Minimum bactericidal concentration (MBC) of aqueous, ethanolic and hydro alcoholic extracts of *Salvia chorasanica* aerial organs (mg/ml).

Type of extract	*Staphylococcus aureus*	*Enterococcus faecalis*	*Salmonella typhimurium*	*Escherichia coli*
aqueous	240	120	480	240
ethanolic	240	240	ND	480
hydro alcoholic	120	120	240	240

ND: Not Determined

نتایج مقایسه کلیه میانگین‌ها در روش انتشار در آگار نشان داد که به ترتیب عصاره هیدروالکلی و آبی اندام های هوایی در غلظت ۹٦۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر بازدارندگی را بر کلیه باکتری‌های مورد بررسی داشتند. همچنین مشخص شد قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از اندازه این قطر در مورد باکتری‌های گرم منفی بود.

Table 3 Mean of diameter of clear inhibition zone of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in mm in the presence of aqueous, ethanolic and hydro alcoholic extracts of *Salvia chorasanica* aerial organs (well diffusion assay)

Escherichia coli	*Salmonella typhimurium*	*Enterococcus faecalis*	*Staphylococcus aureus*	Concentration	Type of extract
10.97±0.28a	8.54±0.17b	14.30±0.34d	13.52±0.75b	960	aqueous
9.54±0.20e	0.0±0.0c	13.55±0.15e	13.10±0.3f	480	Aerial organs
0.0±0.0g	0.0±0.0c	12.00±0.0f	11.05±0.23e	240	
9.14±0.57d	0.0±0.0c	11.51±0.26e	10.62±0.2a	960	
0.0±0.0e	0.0±0.0c	10.41±0.35f	9.55±0.17b	480	ethanolic
0.0±0.0e	0.0±0.0c	9.00±0.45g	0.0±0.0c	240	Aerial organs
12.61±0.17c	9.51±0.15a	15.24±0.25d	14.81±0.45b	960	hydro alcoholic
10.87±0.43e	8.10±0.23b	14.81±0.45e	13.26±0.34c	480	Aerial organs
0.0±0.0g	0.0±0.0c	13.66±0.10f	11.90±0.55e	240	

- Dissimilar letters in one column, represent the presence of significant difference (α= 5%) among the antimicrobial effect of various concentrations.
- Similar letters in one column, represent the absence of significant difference (α= 5%) among the antimicrobial effect of various comcentrations.

٤- نتیجه گیری

با توجه به تاکید سازمان بهداشت جهانی برحذف افزودنی‌های شیمیایی از صنایع غذایی، گیاهان دارویی گزینه‌های مناسبی برای استفاده در صنایع غذایی به‌عنوان نگهدارنده می باشند. همچنین افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و یا عدم رعایت دوز توصیه شده توسط بیماران، منجر به گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک‌ها گردیده است. این امر منجر به افزایش تمایل به توسعه ترکیبات جدید ضد میکروبی موثرتر و بدون سمیت شده است.

در بررسی و مقایسه نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه مشخص گردید که عصاره آبی اندام‌های هوایی نسبت به عصاره اتانولی

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-11]

اندام‌های هوایی اثر مهارکنندگی بیشتری داشته است که این امر می‌تواند تا حدودی تأثیرپذیر از در صد استحصال بیشتر این عصاره نسبت به عصاره اتانولی اندام‌های هوایی باشد. از طرف دیگر آب جزو حلال‌هایی است که بیشترین قدرت استخراج را برای اغلب مواد طبیعی با وزن مولکولی پایین موجود در گیاهان دارویی، همچون آلکالوییدها، ساپونین‌ها و فلاونوییدها دارد [۲۰]. Gundiza (۱۹۸۷) خاصیت ضد میکروبی گیاه ***Helinus integrifolius*** با دو روش نفوذ در آگار ورقت در لوله بررسی کرد و مشاهده کرد هنگام استفاده از روش رقت در لوله همه فراکسیون‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی بوده در حالی که در روش آگار هیچ یک از فراکسیون‌ها فعالیتی ضد میکروبی نشان ندادند. این نتایج حاکی از نفوذ بسیار اندک عصاره در آگار است حال آنکه در روش لوله به دلیل تماس مستقیم ترکیب با میکروارگانیسم‌ها، این مشکل وجود ندارد و حتی اگرعصاره مورد بررسی، انحلال پذیری کمی در آب داشته باشد، بدلیل تماس مستقیم با میکروارگانیسم می‌تواند اثر ضدمیکروبی نشان دهد [۲۱].

نتایج آنالیز یک طرفه (ANOVA) در روش انتشار آگار در دیسک نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام‌های هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* از غلظت ۲۴۰ تا ۹۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، هاله بازدارندگی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P<0/05$). همچنین نتایج مقایسه میانگین همه غلظت‌ها نشان داد که بین میانگین اکثر غلظت‌ها تفاوت معنی‌دار وجود دارد به طوری که می‌توان وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار میانگین قطر عدم رشد غلظت‌های مختلف را به مقدار ماده مؤثر موجود در عصاره‌ها نسبت داد. به‌طور کلی می‌توان گفت اثر نوع عصاره، غلظت و اثر متقابل نوع عصاره و غلظت برای کلیه باکتری‌های مورد آزمون در این پژوهش از لحاظ آماری معنی دار بود ($P<0/05$).

Mostafa و همکاران (۲۰۱۳) نیز در بررسی آزمایشگاهی خواص ضد میکروبی عصاره اتانولی مریم‌گلی بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروجینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه* مشاهده کردند که فعالیت بازدارندگی عصاره اتانولی این گیاه فعالیتی وابسته به غلظت است و می‌توان گفت با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله بازداری نیز افزایش می‌یابد [۲۲].

حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در مورد عصاره‌های اندام‌های هوایی *سالویا خراسانیکا* به دلیل طبیعت پیچیده موانع نفوذپذیری موجود در پوشش سلول می‌باشد. این پوشش شامل سه قسمت است، یک غشای سیتوپلاسمی یا غشا داخلی که محتوی لیپید و پروتئین است، یک لایه نازک پپتیدوگلیکان و یک غشای خارجی شامل لیپو پلی-ساکارید. اگر چه باکتری‌های گرم مثبت نیز دارای یک لایه غشای سیتوپلاسمی و پپتیدوگلیکانی می‌باشند، مابقی پوشش سلولی آن-ها به طور عمده از پلی‌ساکاریدهای آنیونی و در بعضی موارد از مقدار کمی پروتئین ساخته شده است. غشای خارجی که فقط در باکتری‌های گرم منفی وجود دارد، سدی در مقابل نفوذ مواد ایجاد می‌نماید و موجب می‌گردد که قابلیت نفوذ پذیری سلول‌های گرم منفی نسبت به بسیاری از انواع مولکول‌ها کمتر از سلول‌های گرم مثبت باشد [۲۳،۲۴].

Balouiri و همکاران (۲۰۱۴) فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی مریم گلی (***Salvia officinalis***) را با روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر مجموعه‌ای از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت هم‌چون *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار دادند. از نتایج حاصل از این بررسی مشخص گردید که عصاره متانولی گیاه مورد مطالعه دارای اثرات ضد باکتریایی با هاله عدم رشد مشخص بر باکتری‌های گرم مثبت بوده و بر باکتری‌های گرم منفی فاقد هاله عدم رشد بوده‌است [۲۵].

All-Howiriny (۲۰۰۳) ترکیبات و فعالیت ضدمیکروبی اسانس مریم‌گلی را بر باکتری‌هایی همچون *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *اشریشیا کلی* مورد بررسی قرار داد. در آنالیز ترکیبات این گیاه ۴۲ ترکیب شناسایی شد که ترکیبات عمده آن ۱و۸-سینول، آلفا پینن[9] و لیمونن[10] بودند. نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی نشان داد که MIC برای باکتری‌های گرم مثبت کمتر از باکتری-های گرم منفی است و این اسانس بر کپک‌ها نیز دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشد [۲۶].

9. α-pinene
10. Limonene

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-11]

نتایج این بررسی نشان داد عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی اندام هوایی گیاه *سالویا خراسانیکا* علیه باکتری‌های گرم مثبت اثر ضد باکتریایی بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارند و به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌های آبی، اتانولی و هیدروالکلی این گیاه را می‌توان به عنوان یک ماده ضد باکتری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروکوکوس فکالیس*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیا کلی* به کار برد.

۵- منابع

[1] Ayepola OO, & Adeniyi BA. The antibacterial activity of leaf extracts of Eucalyptus camaldulensis (Myrtaceae). Journal of Applied Science Research. 2008; 4(11): 1410-1413.

[2] Raad S. Increasing of the storage life of horticultural products using the antifungal activity of essential oils. Food Science and Technology Master's thesis, Ferdowsi University of Mashhad. 2000. (in Persian)

[3] Haddad khoda Parast M. Identify new sources of Butein in Nowruzak roots. Research projects of food Sciences. Islamic Azad University of Sabzevar. 1995. (in Persian)

[4] Firuzi O, Miri R, Asadollahi M, Eslami S, Jassbi AM. Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Contents of Eleven Salvia Species from Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2013; 12 (4): 801-810.

[5] Tayarani-Najaran Z, Emami SA, Asili J, Mirzaei A, Mousavi SH.. Analyzing cytotoxic and apoptogenic properties of *Scutellaria litwinowii* root extract on cancer cell lines. Evidence-*Based* Complementary and Alternative Medicine. 2011; 1-9.

[6] Sivropoulou A, Nikoloau C, Papanikolaou E, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial, Cytotoxic and Antiviral Activities Salvia of Fructicosa Essential oil. Journal of Agricultural &.Food chemistry. 1997 ; 45(8):3197-3201.

[7] Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of Staphylococcus aureus and its ability to cope with oxidative stress. Infection and immunity. Journal of Infection and Immunity For Microbilogy. 2006; 74 (8): 4950–4953.

[8] Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB. Family IV. Enterococcaceae fam. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 3 (The Firmicutes), pp. 594. Edited by P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer & W. B. Whitman. New York: Springer. 2009.

[9] Bitton G & Wiley J. Wastewater Microbiology. Third Edition.2005; 3-45.

[10] Shimi A. Veterinary Bacteriology and bacterial diseases. Tehran. Jahad daneshgahi press 1997; 1: 185-197. (in persian)

[11] Heidari Sureshjani M, Tabatabaee Yazdi F, Mortazavi A, Shahidi F. Inhibitory effect of aqueous and ethanolic extracts *of Kelussia odoratissima* on *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Listeria innocua* in vitro. Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine. 2013; 63:19-24. (In persian)

[12] Samsam Shariat H, Extraction of effective components from medicinal plants and their diagnostic and evaluation methods. 1st ed. Mani Press. Esfehan. 1992; 8 - 20.

[13] Ahmad I, & Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. Journal of Ethnopharmacology. 2001; 74(2): 113-123.

[14] Valero M & Salmeron M. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. International Journal of Food Microbiology. 2003; 85(1):73-81.

[15] Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer h, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A, Ozkan H..Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil and methanol extract from *Mentha Longifolia* l. spp.*longifolia* . Food Chemistry. 2007; 103: 1449-1456.

[16] Ozturk S, & Ercisli S. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides* .Food Control. 2007; 18(5): 535-540.

[17] Eloff JN. A sensitive and quick micro plate method to determine the minimal inhibitory

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-11]

concentration of plant extract for bacteria. Planta Medica Journal. 1998; 64: 711-713.

[18] Duffy CF, & Power RF.. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. International Journal Antimicrobial Age .2001; 17: 527-529.

[19] Awoyinka OA, Balogun IO, Ogunnowo AA.. Phytochemical screening and in vitro bioactivity of Cnidoscolus aconitifolius (Euphorbiaceae). Journal of Medicinal Plants Research. 2007; 1(3): 63-65.

[20] Hatami S, Yavarmanesh M, Mohammadi Sani A. Evaluate and compare the antimicrobial properties of aqueous extracts of two varieties of castor seed pathogens in food index. Journal of Iranian Food Science and Technology 2015; 48(12): 89-97. (In persian)

[21] Gundiza M.. Antimicrobial activities of *Helinus integrifolius*. Fitoterapia. 1987;58: 180-183

[22] Mostafa E, Yahyaabadi S, Doudi M.. In-Vitro Antibacterial Properties of Sage (*Salvia officinalis*) Ethanol Extract against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumonia.* Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2013; 16 (10): 42-46.

[23] Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. International Journal of Food Microbiology. 2001; 67: 187-195.

[24] Palombo EA & Semple JS. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 2001; 77: 151-157.

[25] Balouiri M, Sadiki M, Ouedrhiri W. Farah A et al.. Antimicrobial activity of extracts from *Salvia* officinalis and *Rosemarinus* officinalis and maceration method. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science. 2012; 2: 167-170.

[26] All-Howiriny TA. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Salvia Lanigera. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2003; 6(2): 133-135.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-11]

Study of Antibacterial Effect of Aqueous, Ethanolic and Hydroalcoholic Extracts of Aerial Organs of *Salvia chorassanica* against Some Spoilage and Poisoning Bacteria

Mehraban, A. [1], Edalatian Dovom, M. R. [2*], Haddad Khodaparast, M. H. [3], Mehraban Sang Atash, M. [4]

1. MSc. Graduated Student, Department of Food Science and Technology, Agriculture School, Ferdowsi University, Mashhad, Iran
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Agriculture School, Ferdowsi University, Mashhad, Iran
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Agriculture School, Ferdowsi University, Mashhad, Iran
4. Assistant Professor , Food Quality and Safety Department , Food Science and Technology Research Institute, Mashhad branch, Mashhad ,Iran

(Received: 2016/02/24 Accepted: 2016/08/17)

The purpose of this study is to investigate the antimicrobial effect of the aqueous, ethanolic and hydroalcoholic extracts of aerial organs of *Salvia chorassanica* against *Staphylococcus aureus* (ATCC: 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC: 21299), *Salmonella typhimurium* (ATCC: 14028) and *Escherichia coli* (ATCC: 25922). In this study the antibacterial effect of the extracts was determined using the agar diffusion method. Microdilution method by ELISA and adding phenyl Tetrazolium chloride reagent was used to determine the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration. The highest inhibition zone in diffusion method was related to aqueous and hydroalcoholic extracts of aerial parts of *Salvia chorassanica* against *Enterococcus faecalis*. The MIC in aqueous and ethanolic extracts of the aerial parts for Gram-Positive was 60 mg/ml, for *Escherichia coli* 60 and 120 mg/ml and for *Salmonella typhimurium* 120 and 240 mg/ml, respectively. The amount in hydroalcoholic extracts for Gram-Positive bacteria was 60 mg/ml and for Gram-Negative bacteria was 120 mg/ml.

Keywords: Antibacterial effect, Agar diffusion, *Salvia chorassanica*, Microdilution.

* Corresponding Author E-Mail Address: edalatian@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-03-11]