ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی ۴ گیاه دارویی بر ۱۰ باکتری استاندارد

بهمن فاضلی نسب*[۱]، سعیده سعیدی[۲]، فرزانه فاضلی[۳]، فاطمه بیدرنامنی[۱]. زهرا بیگمی[۴]

۱- گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، ایران.
۴- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

دریافت مقاله: ۱۷ شهریور ۱۴۰۱، بازنگری: ۱۸ مهر ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۲۰ مهر ۱۴۰۱

چکیده

یکی از مشکلات کنونی درمان عفونت‌های باکتریایی، افزایش مقاومت آنها به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باعث مرگ و میر قابل توجهی درمقایسه با باکتری غیر مقاوم می‌شوند. بنابراین استفاده از گیاهان دارویی زیتون، لوفا و مریم‌گلی، به دلیل خاصیت ضد التهابی و ضد میکروبی آنها بر علیه ۱۰ پاتوزن انسانی مورد هدف تحقیق حاضر بود. بدین منظور آزمایشی به صورت کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. صفاتی مانند، فنل، فلاونوئید، آنتی‌اکسیدان و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Statistix10 و تهیه نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد. بیشترین میزان فلاونوئید (۳۹۸/۰۲ میکروگرم در گرم ماده خشک) در میوه زیتون و کمترین میزان (۲۵۵/۷۸ میکروگرم در گرم ماده خشک) در برگ مریم‌گلی به دست آمده است. عصاره متانولی برگ زیتون با میانگین ۸ میلیمتر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد هافنیا الوی داشته است. عصاره متانولی برگ مریم‌گلی با میانگین ۱۴ میلیمتر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس داشته است. عصاره متانولی بذر لوفا با میانگین ۱۲ میلیمتر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا داشته است. عصاره متانولی میوه زیتون با میانگین ۱۸ میلیمتر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد باسیلوس سرئوس داشته است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که گیاهان لوفا، زیتون و مریم‌گلی و حتی بافت‌های مختلف آنها در درمان بعضی از باکتری‌های بیماری‌زا مانند هافنیا الوی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و رشد باسیلوس سرئوس مؤثر بوده‌اند. همچنین، توصیه می‌شود با استخراج مواد مؤثر عصاره این گیاه و سایر گیاهان، تحقیقات بیشتری روی انواع ترکیبات عصاره این گیاهان صورت گیرد.

واژگان کلیدی: *لوفا، هافنیا الوی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا ، باسیلوس سرئوس*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: bfazelinasab@gmail.com

مقدمه

یکی از مشکلات کنونی درمان عفونت‌های باکتریایی افزایش مقاومت آنها به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باعث مرگ و میر قابل توجهی در مقایسه با باکتری غیر مقاوم می‌شوند (۲۰). اوایل قرن بیستم پیشرفت علم شیمی وکشف سیستم‌های پیچیده سنتز آلی منجر به توسعه صنعت داروسازی و جای گزینی داروهای صناعی به جای داروهای گیاهی شد. اما همزمان با پیشرفت در تولید داروهای شیمیایی جدید و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، به تدریج اثرات مضر این داروها ظاهر شدند و از دهه ۱۹۵۰ باکتری‌های بیماری‌زای متعددی به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند که این مقاومت همچنان در حال گسترش است (۴).

از بین باکتری‌های گرم منفی مقاوم به آنتی‌بیوتیک که ایجاد عفونت‌های بیمارستانی می‌کنند می‌توان به گونه‌های انتروباکتریاسه، سودوموناس، اسینتوباکتر و از بین باکتری‌های گرم مثبت می توان به گونه های استافیلوکوک، استرپتوکوک و انتروکوک اشاره کرد (۲۳). افزایش روزافزون مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، تلاش در پی جایگزین کردن درمان‌های جدید در سراسر جهان در حال انجام است. این مورد از جمله موارد امیدبخش استفاده از گیاهان دارویی می‌باشد که با بدن انسان سازگاری بالایی دارند (۱۶).

در سال‌های اخیر از عصاره‌های گیاهی به‌عنوان عوامل ضد میکروبی استفاده می‌شود. یکی از این عصاره‌ها عصاره برگ زیتون بود که به دلیل وجود ترکیبات فنلی خاصیت ضد میکروبی دارد. یوروپین مهم‌ترین ترکیب فنلی در برگ زیتون است (۲۲). این ترکیب و سایر ترکیبات فنلی موجود در عصاره برگ زیتون مانند پاراتیکسوکسیکزوئیک، فرولیکاسید، قهوه، وانیل‌کاسید، پروکاتوکوکال، سینرژیک‌کشید، پاراکومینیالین، اکتروتین، اکتروتین می‌باشد (۸). پلی‌فنول‌های برگ زیتون به دلیل چندین اثر مفید بر سلامت به دلیل فعالیت های ضد فشار خون، ضد دیابت، ضد سرطان، ضد آترواسکلروتیک، ضد التهابی و ضد میکروبی که دارند موضوع تحقیقات شدیدی هستند (۱۲، ۱۵).

لوفا با نام علمی *Luffa cylindrica linn* متعلق به خانواده Cucurbitaceae معروف به "راجا کوشاتاکی" یک گیاه سنتی مهم با خواص دارویی بیشتر است (۱۳). لوفا حدود هفت گونه دارد که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری در سراسر هند و حتی در زمین‌های بایر به‌ویژه در امتداد منطقه ساحلی یافت می‌شود (۷).گیاهان متعلق به این خانواده به تولید تعداد زیادی از اجزای مهم بیولوژیکی معروف هستند. به‌طور سنتی از این گیاه برای درمان طحال، جذام، هموروئید، تومور، برونشیت و سیفلیس استفاده می‌شود (۱).

تعداد فراوانی از گیاهان تیره نعناع دارای ویژگی‌های درمانی بوده و برخی نیز حاوی اسانس‌های مهمی هستند که در صنایع داروسازی، عطرسازی و فرآورده‌های آرایش و بهداشتی و نیز به‌عنوان طعم‌دهنده و چاشنی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مریم گلی (Salvia)، گونه گیاهی علفی، یکساله و چند ساله دارد (۱۷). *Salvia officinalis L* همچنین به‌عنوان "گیاه نجات" شناخته می‌شود، از دیرباز در طب سنتی در سراسر جهان مورد استفاده قرار گرفته و به خوبی مستند شده است. ترکیبات زیست فعال آن، و به‌ویژه مشخصات پلی فنول آن به‌طور گسترده مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته است. با این حال، اثرات مفید مریم گلی بسیار فراتر می‌رود و امروزه با طیف وسیعی از تکنیک‌های استخراج جدید، در حال کشف اجزای جدید با اثرات درمانی جدید، به‌ویژه در

زمینه بیماری‌های عصبی و سرطان‌های مختلف هستند (۱۰). *S. officinalis* به شکل یک بوته‌ی زیرخاکی چند ساله تا ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر رشد می‌کند. برگ‌ها متقابل و ساده با کرک‌های سفید در سطح پایین برگ و سبز یا خاکستری مایل به سبز در سطح بالایی هستند. ساقه‌ها به‌صورت ایستاده یا برآمده با شاخه‌های پرمویی سبز تیره هستند. برگ‌ها دراز و دمبرگ با حاشیه دندانه‌دار، سطحی زبر و گاهی با لوب‌های قاعده‌ای هستند. طول گلها از ساقه ۲ تا ۴ میلی‌متر است و به صورت شبه قلیان با ۵ تا ۱۰ گل بنفش مایل به آبی هستند که خوشه‌های جعلی و مرکب را تشکیل می‌دهند. بسته به زیستگاه و شرایط آب و هوایی از مارس تا ژوئیه شکوفا می‌شوند (۱۰).

در سیستم‌های غذایی غلظت‌های بالاتری از اسانس‌ها برای داشتن اثرات ضد میکروبی مشابهی که در شرایط آزمایشگاهی به‌دست می‌آیند مورد نیاز است. استفاده از اسانس‌ها و اجزای جدا شده آنها رویکردهای جدیدی برای افزایش کارایی آنها با بهره‌گیری از اثرات هم‌افزایی و افزایشی آنهاست. احتمالاً مشخصات بیولوژیکی آنها نتیجه هم‌افزایی تمام مولکول‌های موجود در روغن است (۲). استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهی یکی از امیدوارکننده‌ترین پیشرفت‌ها در برابر میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو است (۲). از طرفی، پذیرش طب سنتی به‌عنوان یک درمان جایگزین برای عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است (۲۱). بنابراین، استفاده از گیاهان دارویی زیتون، لوفا و مریم‌گلی، به دلیل خاصیت ضد التهابی و ضد میکروبی آنها بر علیه ۱۰ پاتوزن انسانی مورد هدف تحقیق حاضر بود.

مواد و روش‌ها

برگ‌های گیاه زیتون، مریم‌گلی کاروندری ، بذر لوفا و میوه زیتون از مزرعه دشت‌های استان سیستان و بلوچستان- شهرستان زابل جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌ها در شرایط سایه و دمای معمولی اتاق خشک شده و آسیاب شدند. جهت عصاره‌گیری به روش ماسراسیون سرد، ۲۰ گرم از برگ گیاه پودر شده به‌طور جداگانه در حلال متانول خیسانده و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر نگهداری شدند. بعد از یک روز، مواد از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ عبور داده شدند. سپس حلال‌ها توسط دستگاه روتاری خلاء از مواد فیلتر شده خارج شدند. عصاره غلیظ شده تا حاصل شدن عصاره خالص و زدوده شدن کامل حلال، به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در نهایت عصاره‌های به‌دست آمده خشک شده و پس از توزین، تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد.

سویه‌های باکتریایی و شرایط کشت:

سویه‌های باکتریایی از آزمایشگاه استاندارد گروه دامپزشکی دانشگاه زابل، زابل، ایران تهیه شد. سویه‌های باکتری شامل: Streptococcus pyogenes ATCC® 19615™، S. saprophyticus ATCC®15305، Streptococcus pneumoniae ATCC 49619، Hafnia alvei ATCC 51873، *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923، Serratia marcescens ATCC 274، Enterococcus faecalis ATCC 29212، Proteus mirabilis ATCC 35659، Acinetobacter baumannii ATCC 19606 روی محیط کشت نوترینت آگار تکثیر و تا زمان استفاده در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

به‌منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی از کشت تازه و جوان باکتری، چند کلنی به محیط کشت مولر هینتون براث منتقل شد. جهت یکسان نمودن کدورت سوسپانسیون میکروبی تهیه شده مطابق با لوله شماره ۰/۵ استاندارد مک فارلند (کدورت

معادل 10^8 × ۱/۵ باکتری در هر میلی‌لیتر)، جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر در محدوده ۰/۰۸ تا ۰/۱ تنظیم گردید. برای رسیدن به غلظت 10^7 × ۱/۵ باکتری در هر میلی‌لیتر، سوسپانسیون باکتریایی با کدورت ۰/۵ مک فارلند به نسبت ۰/۱ رقیق گردید. اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش انتشار در آگار مورد بررسی قرار گرفت. به کمک سواب استریل از کدورت معادل 10^7 × ۱/۵ باکتری در میلی‌لیتر، روی محیط کشت مولر هینتون آگار به‌صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس در فاصله‌های مناسب، تعدادی چاهک به قطر شش میلی‌متر با عمق ۵ میلی‌متر ایجاد گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها درون چاهک مربوط به آن ریخته شد. آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکسازین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد نمونه‌های باکتریایی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. به‌منظور تأیید نتایج حاصل از آزمایش برای هر یک از عصاره‌ها و برای هر نمونه باکتریایی، سه بار تکرارگردید.

عصاره‌گیری جهت سنجش‌های فنل کل، فلاونوئید کل و آنتی‌اکسیدانی: عصاره متانولی با روش ماسراسیون سرد و با نسبت ۱:۲۰ ماده خشک گیاهی و حلال متانول ۸۰ درصد تهیه گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت درون حلال و بر روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm خیسانده شد. پس از آن با کاغذ صافی واتمن No.1 صاف گردید و جهت تغلیظ به دستگاه روتاری اواپوراتور با دمای ۴۵ درجه انتقال یافت. یک ساعت پس از تغلیظ عصاره به زیر هود لامینار انتقال یافته تا مابقی حلال به تدریج تبخیر گشته و عصاره خشک حاصل شود. از این عصاره خشک جهت تهیه عصاره متانولی جهت سایر سنجش‌ها با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید (۲۴).

سنجش میزان فنل کل: مقادیر ترکیب‌های فنلی در عصاره متانولی گیاهی توسط روش لی و همکاران (۲۵) اندازه‌گیری گردید و نتایج بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره بیان شد. بر طبق این روش مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها (با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، در لوله‌های آزمایش ریخته شد. ۴۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) و ۴۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷ درصد به مخلوط فوق اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نوری آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. در نهایت با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد گالیک اسید (۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، مقدار فنل کل موجود در عصاره محاسبه شد. داده‌ها بر اساس معادل میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره (mg GAE/g) بیان شد. همه سنجش‌ها در سه تکرار انجام شد.

$$Y=0.004\ X+0.1$$

Y: عدد جذب ثبت شده در دستگاه اسپکتوفتومتر

X: میزان فنل کل

سنجش فلاونوئید کل: محتوای فلاونوئیدی این عصاره‌ها به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. در این روش به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلومینیوم کلرید (۱۰ درصد)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس جذب مخلوط در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد بر اساس محلول با غلظت‌های متفاوت (-250-350-450- 550 mg/ml 150-50) کوئرستین رسم شده و میزان محاسبه

فلاونوئید معادل میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم پودر خشک گیاه ($mgQUEg^{-1}$) محاسبه و تعیین گردید ضمناً بلانک محلول نیز به همین صورت و بدون عصاره آماده شد (۲۶). تمامی سنجش‌ها در سه تکرار انجام شد.

$Y=2.1647x - 2.8775$

Y: عدد جذب ثبت شده در دستگاه اسپکتوفتومتر

X:میزان فلاونوئید کل

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان: سنجش فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به روش باروس و همکاران (۲۷) صورت گرفت. این روش بر اساس تغییر رنگ محلول متانولی بنفش رنگ ۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل- هیدرازیل به محلول زردرنگ دی فنیل- پیکریل هیدرازین می‌باشد. ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره با ۷۵۰ میکرولیتر از محلول DPPH (دو میلی‌گرم DPPH در ۵۰ میلی‌لیتر متانول حل شد) مخلوط گردید. این نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای اتاق انکوبه شد و سپس میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد.

درصد مهار رادیکال‌های آزاد با فرمول ذیل محاسبه گردید:

درصد مهار رادیکال آزاد = (Ac-As)/Ac×100

AC: میزان جذب برای نمونه شاهد

میزان جذب نمونه گیاهی AS:

آنالیز آماری داده‌ها: برای هر تیمار سه تکرار مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. آنالیز آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزارآماری SAS نسخه ۹/۱ انجام شد و داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف از معیار ارئه گردید.

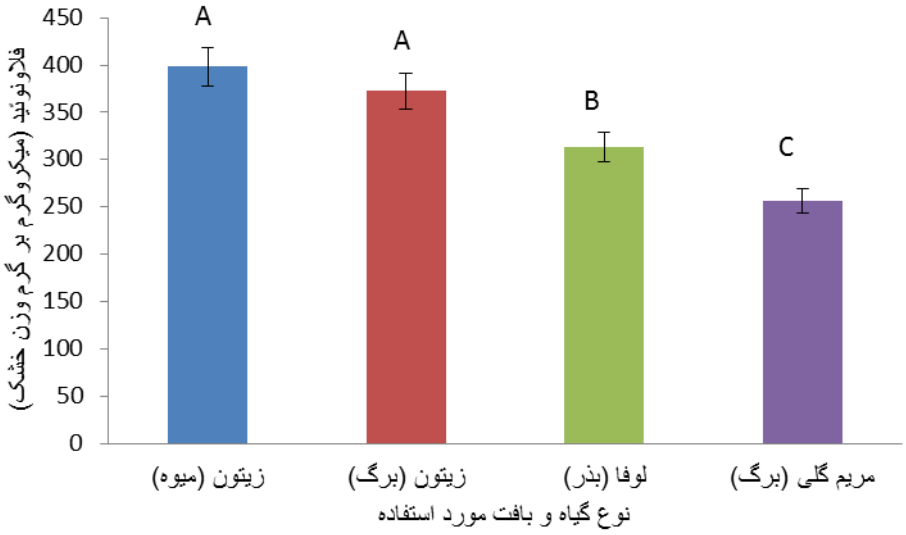
نتایج

میزان فلاونوئید در زیتون (میوه)، زیتون (برگ)، لوفا (بذر) و مریم‌گلی (برگ) متفاوت بوده است ($p =۰/۰۱$) اما میزان فنل و آنتی‌اکسیدان متفاوت نبوده است (جدول ۱). بیشترین میزان فلاونئید (۳۹۸/۰۲ میکروگرم در گرم ماده خشک) در میوه زیتون و کمترین میزان (۲۵۵/۷۸ میکروگرم در گرم ماده خشک) در برگ مریم‌گلی به دست آمده است (شکل ۱).

جدول ۱- آنالیز واریانس میزان فنل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان در زیتون (میوه)، زیتون (برگ)، لوفا (بذر) و مریم‌گلی (برگ)

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		آنتی اکسیدان	فلاونوئید	فنل
نوع باکتری	۳	۴۰۶/۱۴۱**	۱۲۱۴۵/۱^{ns}	۱/۴۸۷۵^{ns}
خطا	۸	۱۸۰۰/۰۰	۲۲۵/۰	۱/۰
کل	۱۱			

**: معنی‌دار در سطح یک درصد؛ ns: غیر معنی‌دار



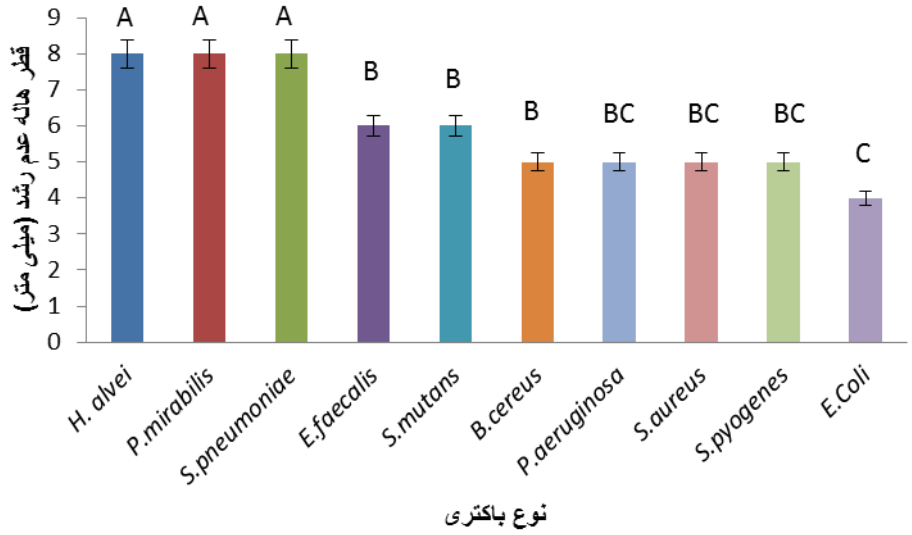
شکل ۱- میزان فلاونوئید در زیتون (میوه)، زیتون (برگ)، لوفا (بذر) و مریم‌گلی (برگ)
حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف است

عصاره متانولی زیتون (برگ)، مریم‌گلی (گل)، لوفا (بذر) و زیتون (میوه) برای کشندگی و مهار رشد باکتری‌های باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه، استرپتوکوکوس پایوژنز، استرپتوکوکوس موتانس، هافنیا الوی، سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی، پروتئوس میرابیلیس و انتروکوکوس فیکالیس نتایج متفاوتی ارایه داده‌اند ($P=۰/۰۱$) (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که عصاره متانولی برگ زیتون با میانگین ۸ میلیمتر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد و هافنیا الوی با ۴ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، کمترین تأثیر بر مهار رشد اشریشیاکلی داشته است (شکل ۲). عصاره متانولی برگ مریم‌گلی با میانگین ۱۴ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس و با ۱ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، کمترین تأثیر بر مهار رشد انتروکوکوس فیکالیس داشته است (شکل ۳). عصاره متانولی بذر لوفا با میانگین ۱۲ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا و با ۲ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، کمترین تأثیر بر مهار رشد استرپتوکوکوس پنومونیه داشته است (شکل ۴). عصاره متانولی میوه زیتون با میانگین ۱۸ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد باسیلوس سرئوس و با ۲ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، کمترین تأثیر بر مهار رشد استرپتوکوکوس پنومونیه داشته است (شکل ۵).

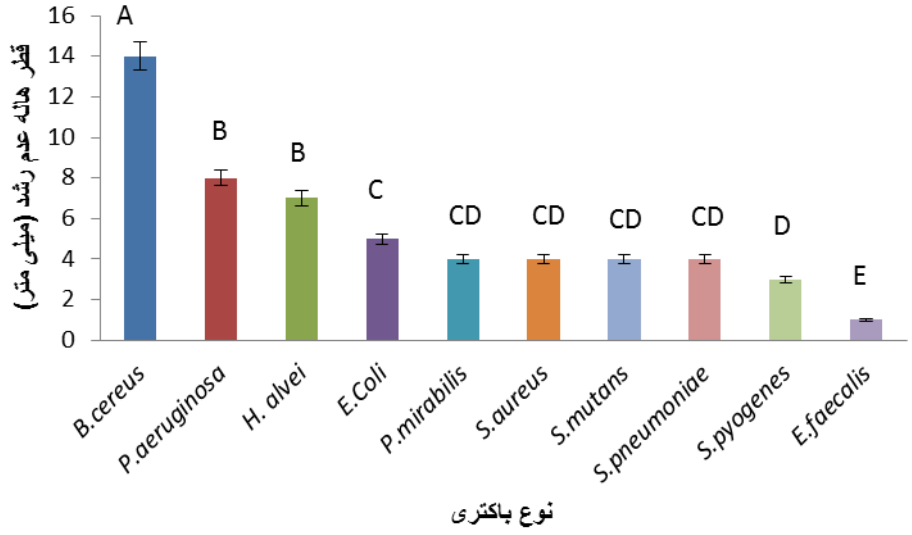
جدول۲- بررسی میزان قطر هاله عدم رشد عصاره متانلی گیاهان دارویی بر روی سویه‌های بالینی (میلی‌متر)

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		زیتون (برگ)	مریم‌گلی (گل)	لوفا (بذر)	زیتون (میوه)
نوع باکتری	۹	۶/۶۶**	۳۸/۸**	۸۶۲۹**	۷۰/۰۳**
خطا	۲۰	۱	۱	۱	۱
کل	۲۹				

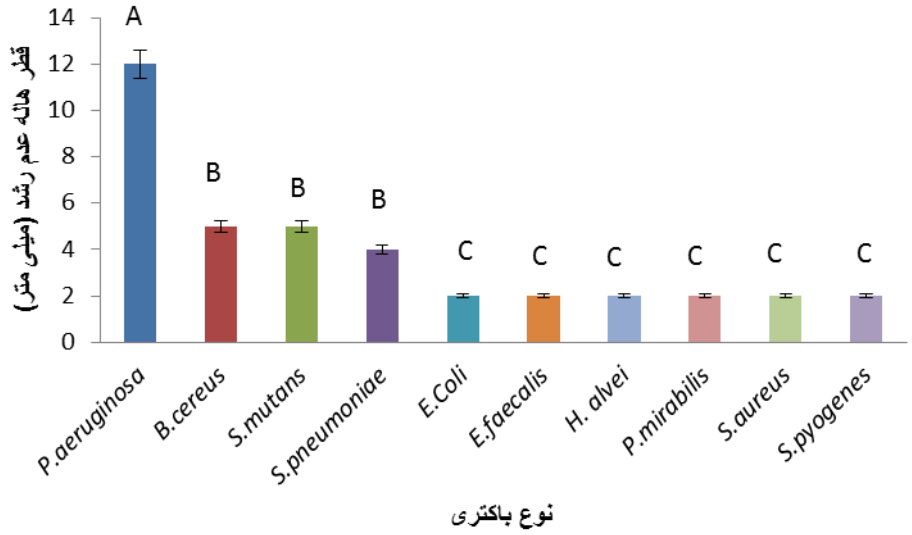
**:معنی‌دار در سطح یک درصد



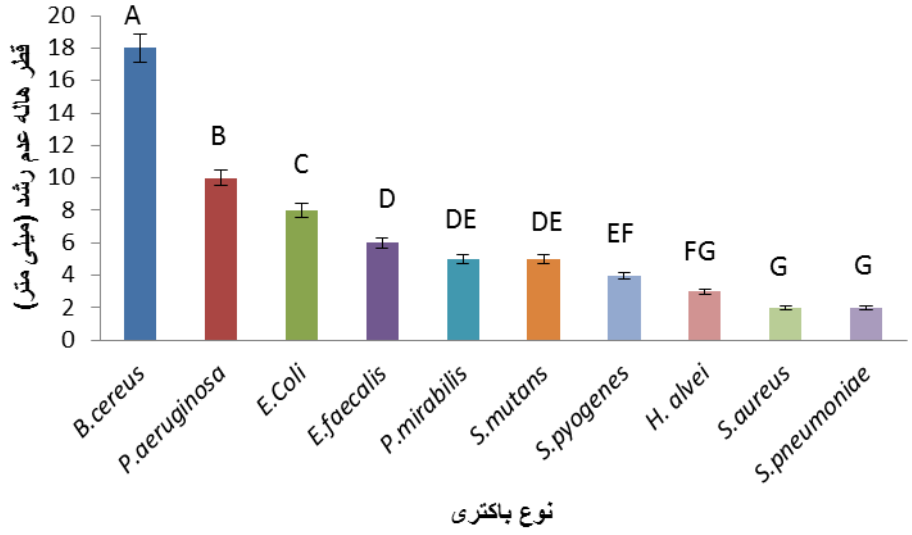
شکل ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی برگ زیتون بر مهار رشد سویه‌های بالینی (میلی‌متر)
حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف است.



شکل ۳- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی برگ مریم‌گلی بر مهار رشد سویه‌های بالینی (میلی‌متر)
حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف است



شکل ۴- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی بذر لوفا بر مهار رشد سویه‌های بالینی (میلی‌متر)
حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف است



شکل ۵- میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی میوه زیتون بر مهار رشد سویه‌های بالینی (میلی‌متر)
حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف است

بحث و نتیجه‌گیری

گزارش شده است که برگ‌های مریم‌گلی (Salvia officinalis L., Lamiaceae) دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند اثرات ضد باکتریایی، قارچی، ویروسی، قابض، نشاط‌آور و ضد آب هستند (۶). اثر بازدارندگی اسانس مریم‌گلی بر

روی کاندیدا آلبیکنس در حداقل زمان تماس و غلظت روغن کامل و قطعی بود. اما اسانس اثر باکتریواستاتیک موقتی را روی اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی‌موریوم و همچنین سودوموناس آئروجینوزا نشان داد. در مقایسه با اکثر آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده، کارایی اسانس S. officinalis به‌ویژه در برابر باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بسیار بهتر بوده است (۱۱). کاریوفیلن اسانس‌های مریم‌گلی، فعالیت‌های باکتریواستاتیک و باکتری‌کشی قابل توجهی را علیه باسیلوس سرئوس، باسیلوس مگاتریوم، باسیلوس سوبتلیس، آئروموناس هیدروفیلا، آئروموناس سوبریا و کلبسیلا اکسیتوکا از خود نشان داده است (۵). بررسی اثرات ضد باکتریایی ترکیبات مختلف اسانس مریم‌گلی به تنهایی و همچنین با کمک برخی آنتی‌بیوتیک‌ها (سفالوسپورین‌ها)، علیه استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، سراتیا مارسسنس، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و به روش میکرودیلوشن بررسی و مشخص شده است که اسانس‌ها در ترکیب با سایر مواد اثرات متفاوتی (بی‌تفاوت، افزایشی، متضاد و هم‌افزایی) بر علیه باکتری‌ها و رادیکال‌های آزاد DPPH از خود نشان داده که احتمالاً به دلیل مکانیسم‌های مختلف عمل در این مورد بوده است (۲). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که عصاره متانولی برگ مریم‌گلی با میانگین ۱۴ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس داشته است.

قابلیت استفاده از برگ‌های درخت زیتون رنگ‌شده بدون مواد رنگ‌زا بر علیه اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس آزمایش شده و مشخص شده است که اثر ضد باکتریایی قابل توجهی در برابر هر دو باکتری آزمایش شده ارائه داده و حداقل ۹۰ درصد کاهش باکتری مشاهده شده است. استفاده از برگ‌های درخت زیتون بدون هیچ ماده‌ای نیز کارایی ضد باکتریایی را نشان داده و کاهش باکتریایی بهتری برای هر دو گونه باکتری در رنگرزی‌ها در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است. علت کارایی ضد باکتریایی ناشی از برگ درخت زیتون با استفاده از آنالیز ICP-MS بررسی شده که علاوه بر محتوای اولئوروپئین عصاره، عناصر شناسایی شده توسط ICP-MS مسئول کاهش باکتری فرض گردیده‌اند (۲۲). قطر هاله عصاره زیتون در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۰/۴۵±۱۷/۶، سالمونلا تیفی‌موریوم ۰/۳۶±۱۰/۸، اشریشیاکلی ۰/۳±۱۴/۳ و باسیلوس سرئوس ۰/۱۸±۱۰/۷ میلی‌متر بوده است (۱۸). فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی برگ زیتون و اثر مفید برگ زیتون در کنترل عفونت‌های میکروبی گزارش شده است (۳). فعالیت ضد میکروبی عصاره تجاری Oleaeuropaea (زیتون) بررسی و مشخص شده است که برگ زیتون خواص ضد باکتریایی برای برخی گونه های باکتریایی نشان می‌دهد (۱۹). فعالیت ضد باکتریایی عصاره برگ *Olea europaea L*. در برابر چهار باکتری بیماری‌زا (اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس) بررسی و مشخص شده است که عصاره برگ زیتون مانع رشد این چهار پاتوژن شده است (۹). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که عصاره متانولی برگ زیتون با میانگین ۸ میلیمتر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد هافنیا الوی داشته است و همچنین عصاره متانولی میوه زیتون با میانگین ۱۸ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، نیز بیشترین تأثیر بر مهار رشد باسیلوس سرئوس داشته است.

تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره دانه های لوفا بر روی برخی از میکروب‌های بیماری‌زا انجام داد. نتایج نشان می‌دهد که عصاره‌ها فعالیت ضد میکروبی علیه اشریشیاکلی نیز نشان دادند. کولی،

استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم و باسیلوس سوبتیلیس. محدوده بازداری بین ۶۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌متر بود (۱۴). عصاره اتانولی و اتیل استات *L. cylindrica* دارای خواص آنتی‌اکسیدانی متوسط در ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، با مهار ۵۳/۳۱ درصد و ۵۴/۷۳ درصد بوده است. عصاره اتانولی فعالیت ضد التهابی قابل توجهی را در 50 mg/kg با مهار ۳۱/۱ درصد در مقایسه با ۳۹/۷ درصد ثبت شده برای کنترل (دیکلوفناک) نشان داده است. عصاره اتیل استات مهاری ۱۵ درصدی ایجاد کرد. در ارزیابی ضد میکروبی، عصاره‌های اتانولی و اتیل استات فعالیت ضد باکتریایی متوسطی را علیه استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم و باسیلوس سوبتیلیس نشان دادند. عصاره اتیل استات در مقایسه با عصاره اتانولی فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی در برابر جدایه‌های آزمایشی نشان داد. تجزیه و تحلیل HPLC-DAD عصاره اتیل استات وجود دو ترکیب فلاونوئیدی لوتئولین و آپیژنین را به‌عنوان اجزای کلیدی عصاره برگ *L. cylindrica* پیشنهاد کرد. این ترکیبات دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد میکروبی هستند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره برگ گیاه *L. cylindrica* دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد میکروبی است (۱۳). در تحقیق حاضر نیز مشخص شده که عصاره متانلی بذر لوفا با میانگین ۱۲ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد، بیشترین تأثیر بر مهار رشد سودوموناس داشته است.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که گیاهان لوفا، زیتون و مریم‌گلی و حتی بافت‌ها مختلف آنها در درمان بعضی از باکتری‌های بیماری‌زا مانند هافنیا الوی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و رشد باسیلوس سرئوس مؤثر بوده‌اند. همچنین توصیه می‌شود با استخراج مواد مؤثر عصاره این گیاه و سایر گیاهان، تحقیقات بیشتری روی انواع ترکیبات عصاره این گیاهان صورت گیرد.

References

1- Aboh M I, Fidelis S, Oladosu O P, Adeshina G O, Olayinka B O, Olonitola S O. Antifungal potentials of *Luffa cylindrica* (Roem) ethyl acetate leaf extract. *J Ethnopharmacol.* 2020; 9(3): 118-178.

2- Adrar N, Oukil N, Bedjou F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Ind Crops Prod.* 2016; 88: 112-119.

3- Aliabadi M A, Darsanaki R K, Rokhi M L, Nourbakhsh M, Raeisi G. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. *Ann Biol Res.* 2012; 3(8): 4189-4191. [In Persion]

4- Berhane N, Abayneh T, Tesfaye S. Impacts of pathogen-host-drug interaction in the evolution and spread of antimicrobial-resistant pathogens. *MID*. 2022; 3(2): 286-295.

5- Delamare A P L, Moschen-Pistorello I T, Artico L, Atti-Serafini L, Echeverrigaray S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem.* 2007; 100(2): 603-608.

6- Eidi M, Eidi A, Zamanizadeh H. Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100(3): 310-313.

7- Garai S, Ghosh R, Bandopadhyay P, Mandal N, Chattopadhyay A. Anti-microbial and Anti-cancer Properties of Echinocystic Acid Extracted from Luffa cylindrica. *J Food Process Technol.* 2018; 9(2): 2-4.

8- Guo L, Gong S, Wang Y, Sun Q, Duo K, Fei P. Antibacterial activity of olive oil polyphenol extract against *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*: Possible Mechanisms. *Foodborne Pathog Dis.* 2020; 17(6): 396-403.

9- Himour S, Yahia A, Belattar H. Oleuropein

and antibacterial activities of *Olea europaea* L. leaf extract. *Eur Sci J*. 2017; 13: 342-353.

10- Jakovljević M, Jokić S, Molnar M, Jašić M, Babić J, Jukić H, *et al*. Bioactive profile of various *Salvia officinalis* L. preparations. *Plants.* 2019; 8(3): 55.

11- Khalil R, Li Z-G. Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. *Afr J Biotechnol.* 2011; 10(42): 8397-8402.

12- Nazzaro F, Fratianni F, Cozzolino R, Martignetti A, Malorni L, De Feo V, *et al.* Antibacterial activity of three extra virgin olive oils of the Campania region, Southern Italy, related to their polyphenol content and composition. *Microorganisms.* 2019; 7(9): 321.

13- Onyegbule F A, Okoye C I, Chukwunwejim C R, Umeokoli B O, Eze P M. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of the leaf extracts of *Luffa Cylindrica*. *J Health Sci.* 2018; 8(2): 101.

14- Oyetayo F, Oyetayo V, Ajewole V. Phytochemical profile and antibacterial properties of the seed and leaf of the Luffa plant (*Luffa cylindrica*). *J Pharmacol Toxicol.* 2007; 2(6): 586-589.

15- Pietrocola G, Ceci M, Preda F, Poggio C, Colombo M. Evaluation of the antibacterial activity of a new ozonized olive oil against oral and periodontal pathogens. *J Clin Exp Dent.* 2018; 10(11): e1103.

16- Sarfraz I, Rasul A, Hussain G, Hussain S M, Samiullah K, Rasool B, *et al*. Global and Temporal Trends in the Use of Antibiotics and Spread of Antimicrobial Resistance. In *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes: Environmental Occurrence and Treatment Technologies*, M.Z. Hashmi, ed. (Cham: Springer International Publishing). 2020; 81-94.

17- Selim S, Almuhayawi M S, Alqhtani H, Al Jaouni S K, Saleh F M, Warrad M, *et al.* Anti-Salmonella and Antibiofilm Potency of *Salvia officinalis* L. Essential Oil against Antibiotic-Resistant *Salmonella enterica*. *Antibiotics.* 2022; 11(4): 489.

18- Shariatifar N, Pirali-Hamedani M, Moazzen M, Ahmadloo M, Yazdani D. Study of the Antimicrobial Effects of Aqueous Extract of *Olea europaea*, *Solanum nigrum*, *Artemisia sieberi*, *Teucrium polium*, *Glycyrrhiza glabra* on some Food-borne Pathogenic Bacteria. *J Med Plant Res.* 2019; 18(72): 264-273.

19- Sudjana A N, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, *et al.* Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33(5): 461-463.

20- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet D L, *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18(3): 318-327.

21- Tiwari Pandey A, Pandey I, Zamboni P, Gemmati D, Kanase A, Singh A V, *et al.* Traditional herbal remedies with a multifunctional therapeutic approach as an implication in COVID-19 associated co-infections. *Coatings.* 2020; 10(8): 761.

22- Yılmaz F, Bahtiyari M İ. Antibacterial finishing of cotton fabrics by dyeing with olive tree leaves fallen during olive harvesting. *J Clean Prod.* 2020; 270: 122068.

23- Zouheir Y, Atany T, Boudebouch N. Emergence and spread of resistant *N. meningitidis* implicated in invasive meningococcal diseases during the past decade (2008–2017). *J Antibiot.* 2019; 72(3): 185-188.

24. Pourmorad F, Hosseini mehr S J, Shahabi majd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 2006; 5(11): 1142-1145. [In Persion]

25. Li H, Deng Z, Wu T, Liu R, Loewen S, Tsao R. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chem.* 2012; 130: 928–936. 2011.08.019.

26. Chang C C, Yang M H, Wen H M, Chern J C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002; 10(3).

27. Barros L, Baptista P, Ferreira I C F R. Effect of Lactariuspiperatus fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food ChemToxicol.* 2007; 45: 1731–1737.

Investigation of antimicrobial and antioxidant activity of 4 medicinal plants on 10 standard strains

Bahman Fazeli-Nasab[1*], Saeide saeidi[2], Farzaneh Fazeli[3], Fatemeh Bidarnamani[1], Zahra Beigomi[4]

1- Department of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran.
2- Agricultural Biotechnology Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Department of Biology, Payame Noor University (PNU), P.O.Box, 19395-4697 Terhran, Iran.
4- Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

Receive: September 8, 2022; Revise: October 10, 2022; Accept: October 12, 2022

Summary

One of the current problems of treating bacterial infections is increasing their resistance to antibiotics. Antibiotic-resistant bacteria cause significant mortality compared to non-resistant bacteria. Therefore, the use of olive, luffa, and sage medicinal plants, due to their anti-inflammatory and antimicrobial properties against 10 human pathogens, was the target of this research. For this purpose, a completely random experiment was conducted in three replications. Traits such as phenol, flavonoid, antioxidant and the diameter of the growth zone were measured. Data analysis was done using Statistix10 software and charts using Excel software. The highest amount of flavonoids (398.02 micrograms per gram of dry matter) was found in olive fruit and the lowest amount (255.78 micrograms per gram of dry matter) was obtained in sage leaves. Methanolic extract of olive leaf with an average diameter of 8 mm of non-growth zone had the greatest effect on inhibiting the growth of Hafnia alvei. Methanolic extract of sage leaves with an average diameter of 14 mm of non-growth zonehad the greatest effect on inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*. Methanolic extract of luffa seed with an average diameter of 12 mm of non-growth zone had the greatest effect on inhibiting the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. Methanolic extract of olive fruit with an average diameter of 18 mm of non-growth zone had the greatest effect on inhibiting the growth of *Bacillus cereus*. The results of the present research showed that Luffa, olive and sage plants and even their different tissues were effective in treating some pathogenic bacteria such as *Hafnia alevi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and the growth of *Bacillus cereus*. Also, it is recommended to conduct more research on various compounds of these plant extracts by extracting the effective ingredients of this plant extract and other plants.

Keywords: *Luffa, H. alvei, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus*