ارزیابی خاصیت ضد میکروبی عصاره هیدرو الکلی تعدادی گیاه دارویی بر طیفی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

محمد رهنما[۱]، بهمن فاضلی نسب*[۲]، ایوب مزارعی[۳]، سعید شهریاری[۴]

۱- گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی پژوهشگاه دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳- کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۴- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

دریافت مقاله: ۵ فروردین ۱۳۹۷، بازنگری: ۱۰ اردیبهشت ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۳۰ تیر ۱۳۹۷

چکیده

باکتری‌ها بیشتر از دیگر عوامل بیماری‌زایی که به وسیله غذا منتقل می‌شوند سبب بروز و شیوع بیماری می‌شوند. مطالعات نشان داده است که اغلب اسانس‌های گیاهی دارای خواص ضد میکروبی می‌باشند. هدف از تحقیق حاضر بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره هیدرو الکلی گیاهان دارویی، مورد، زعفران، بومادران، آویشن و رزماری بر باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *لستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است. در این مطالعه آزمایشگاهی، اثرات ضد میکروبی عصاره‌های هیدرو الکلی بر باکتری‌ها با روش انتشار در محیط کشت مولر هینتون آگار با استفاده از دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری منطبق بر دستورالعمل Bauer و Kirby حاصل گردید. همچنین از آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، آزیترومایسین، تری متوپریم سولفامتوکسازول، سفتریاکسون، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین جهت کنترل مثبت استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه و آزمون تعقیبی کمترین تفاوت معنی‌دار انجام شد. عصاره مورد به ترتیب با میانگین ۰/۴۳±۲/۵۰، ۰/۲۵±۱/۶۷ و ۰/۶۶±۲/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین گیاه دارویی بر باکتری‌های *لستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. عصاره‌ی رزماری با میانگین ۰/۶۶±۱/۲۵ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین عصاره بر *اشریشیاکلی* بودند. در مقایسه اثر عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشخص شد که اکثر عصاره‌ها نسبت به آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین بر باکتری *اشریشیاکلی* مؤثرتر، عصاره مورد نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* مؤثرتر، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثرتر بوده است. با توجه به نتایج تحقیق و افزایش روزافزون مقاومت به مواد آنتی باکتریال سنتتیک، به نظر می‌رسد گیاه مورد و بعد از آن رزماری می‌توانند به عنوان گیاهان مؤثر در پاک‌سازی برخی از باکتری‌ها ازجمله *اشریشیاکلی*، *لستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شوند.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی، رزماری، سالمونلا تیفی موریوم، لستریا مونوسیتوژنز، مورد*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: Bfazeli@uoz.ac.ir

مقدمه

مصرف مدام و بی‌رویه ترکیبات دارویی شیمیایی باعث ایجاد پدیده مهم مقاومت نسبت به میکروارگانیسم‌ها شده و با ایجاد این پدیده اثر داروها ضعیف و یا خنثی شده و در نهایت باعث افزایش مقدار مصرف دارو و تمایل به استفاده از ترکیبات با فرمولاسیون جدیدتر و قوی‌تر می‌شود. ضمناً عیب دیگر استفاده از این داروها افزایش اثرات جانبی آن‌ها بوده که منجر به ایجاد بیماری‌هایی می‌شود که از بیماری اولیه خطرناک‌تر است (۱).

گزارش‌ها حاکی از آن است که بسیاری از اسانس‌های گیاهی دارای اثر بازدارندگی قابل‌توجهی بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند (۲) و مشخص شده‌است که اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد قارچی، ضد انگل، ضد باکتری و ضد ویروس می‌باشند (۳). بنابراین اسانس‌های گیاهی در زمینه‌های فارماکولوژیکی، داروشناسی گیاهی، میکروبیولوژی پزشکی و کلینیکی، فیتوپاتولوژی و نگهداری مواد غذایی، میوه‌ها و سبزی‌ها شدیداً غربالگری شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۴). این داروهای گیاهی نزد مردم دارای مقبولیت بیشتری در مصرف هستند (۵) این دلایل علت افزایش موج جدید مطالعات گسترده جهانی و معرفی اثرات ضد باکتری گیاهان مختلف در سال‌های اخیر بوده است (۶).

متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از نظر اثرات ضد میکروبی‌شان مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۷) و تخمین زده شده که دست‌کم یک‌سوم کلیه فرآورده‌های دارویی منشأ گیاهی دارند یا پس از استخراج از گیاه تغییر شکل یافته‌اند (۸). به طوری که این مواد علاوه بر جلوگیری از رشد باکتری‌ها و کپک‌های آلوده‌کننده مواد غذایی به‌منظور افزایش عمر نگهداری غذاهای فرآوری شده در سیستم غذایی و نیز افزایش عمر نگهداری میوه‌ها و سبزی‌ها مورد استفاده قرار گرفته اند (۹). استافیلوکوکوس گستره وسیعی از عفونت‌های ساده پوستی تا بیماری‌های تهدیدکننده زندگی (مانند پنومونی، منتژیت، استئومیلیت، اندوکاردیت، سندرم شوک سمی و سپتی سمی) را ایجاد و به عنوان یکی از پنج عامل شایع ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه عفونت‌های زخم پس از جراحی است (۱۰). آلودگی سالمونلایی در انسان به صورت مسمومیت غذایی، گاستروآنتریت، تب تیفوئید و گاهی اوقات سپتی سمی بروز می‌کند (۱۱). انتروتوکسین‌های تولید شده توسط برخی از باکتری‌ها مانند اشریشیاکلی، سالمونلا، استافیلوکوکوس، یرسینیا و کلاستریدیوم، مسمومیت دستگاه گوارش و بروز علائم گوارشی ناشی از آن می‌باشند (۱۲).

تاکنون خواص ضد میکروبی برخی گیاهان بر روی باکتری‌های مختلفی ارزیابی‌شده است. مثلاً خواص بازدارندگی و ضدمیکروبی اسانس و عصاره آویشن روی اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس (۱۳، ۱۴)، عصاره آبی مورد بر سویه‌های پسودوموناس آئروژینوزا (۱۵)، عصاره قسمت‌های مختلف زعفران از جمله برگ‌ها، مادگی و کرولا علیه باکتری‌های اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس، اپیدرمیس، استافیلوکوکوس اورئوس، میکروکوکوس و قارچ‌ها (۱۶)، عصاره رزماری بر لوکونوستوک مزانتروئیدس، لستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس موتانس و باسیلوس (۱۷) و عصاره بومادران بر کاندیدا آلبیکنس و باسیلوس سوبتیلیس (۱۸) بررسی شده است.

با توجه به این‌که در استان‌های مختلف ایران برخی گیاهان دارویی بیشترین استفاده را دارند و از طرفی نیز استفاده از آنتی بیوتیک‌های مختلف در بین مردم متأسفانه رایج شده (۱۹) لذا در تحقیق حاضر سعی شد تا برخی از این گیاهان دارویی از قبیل رزماری (دامنه‌های کبیر کوه)، بومادران (شیراز)، زعفران (قائن)، آویشن شیرازی (شیراز) و مورد (دامنه‌های کبیر کوه) را از خاستگاه اصلی جمع‌آوری و بر عدم رشد تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای کلیدی (اشریشیاکلی، لستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس) مورد ارزیابی قرار داده و با آنتی بیوتیک‌های رایج (سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، آزیترومایسین، تری متوپریم سولفامتوکسازول، سفتریاکسون، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین) مورد مقایسه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی پژوهشکده زیست فناوری و آزمایشگاه میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل اجرا گردید. بدین صورت که مقدار ۱۰ گرم برگ خشک‌شده در سایه و در مجاورت هوا ازگیاهان دارویی تهیه شده (جدول ۱)، آسیاب (مدل basic A11 کمپانی IKA آلمان) و سپس در ۱۰۰ سی‌سی محلول (الکل ۷۰ درصد و آب مقطر ۳۰ درصد) خیسانده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر (شرکتUniEquip مدل SKIR-601L کشور آلمان) نگهداری گردید. پس از طی شدن زمان مورد نظر، عصاره‌ها صاف، سپس حلال مورد نظر در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه روتاری (شرکت ایران پارس آزما مدل RO02) تبخیر و باقی‌مانده بعد از خشک شدن برای انجام آزمایش‌ها در یخچال با درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۰، ۲۱).

به‌منظور مطالعه نقش برهم‌کنش عصاره گیاهی (پنج نوع عصاره) و غلظت عصاره (باقی‌مانده عصاره نگهداری شده) در چهار سطح (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بر قطر هاله عدم چهار نوع باکتری (*اشریشیاکلی*، *لستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) به همراه آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سیپروفلوکساسین، آمیکاسین، جنتامایسین، آزیترومایسین، تری متوپریم سولفامتوکسازول، سفتریاکسون، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین به عنوان کنترل مثبت و شاهد بدون عصاره به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

بررسی اثرات ضد میکروبی: در این مطالعه، اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها بر باکتری *اشریشیاکلی* کد (ATCC 25922)، *لستریا مونوسیتوژنز* کد (ATCC 19118)، *سالمونلا تیفی موریوم* کد (PTTC 1609) و *استافیلوکوکوس اورئوس* کد (ATCC 25923)، تهیه شده از شرکت پاتن تب با روش انتشار در محیط کشت مولر هینتون آگار (ساخت شرکت مرک آلمان) با استفاده از دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری بررسی (۳۱، ۳۲) و تعیین حساسیت میکروبی نیز به روش Kirby (1966) و Bauer (۳۳) انجام شد.

روش انتشار دیسک (۳۲) هنگامی که این روش توسط سازمان NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) پذیرفته شد به طور گسترده‌ای تا به امروز مورد استفاده قرار گرفت. این روش توسط بوئر، کربی، شریس و تراک توصیف شد (عموماً به آزمون کربی- بوئر معروف است)(۳۳).

تکنیک انتشار دیسک معمولاً به صورت گسترده‌ای در سنجش فعالیت ضد میکروبی یک مهارکننده‌ی مجهول به کار می‌رود (۳۴). در این روش دیسک‌های کاغذی فیلتری استریل شده ۶ میلی‌متری توسط عامل ضد میکروب با غلظت

دلخواه اشباع می‌شود (۳۵). دیسک‌های اشباع شده سپس روی سطح محیط‌های آگار جامد مناسب مانند مولرهینتون، تریپتوکیس‌سوی آگار یا نوترین آگار که از قبل توسط ارگانیسم‌ها تلقیح شده، قرار داده می‌شوند (۳۴).

مقدار تلقیح استاندارد CFU/1mL۱۰۸ برای باکتری و CFU/1mL۱۰۵ برای قارچ می‌باشد (۳۶) و این با استاندارد کدورت ۰/۵ مک‌فارلند برابر است. برخی از پژوهشگران دیسک‌های کاغذی را قبل از قرار دادن روی پلیت‌های تلقیح شده به عامل ضد میکروبی آغشته می‌کنند، در حالی که برخی دیگر ترجیح می‌دهند بعد از قرار دادن دیسک‌های کاغذی روی پلیت‌های تلقیح شده، آن را به عامل ضد میکروبی آغشته کنند (۳۶، ۳۷). زمان خشک شدن دیسک کاغذی تلقیح شده در بین محققان از ۲ ساعت تا یک شب کامل زیر هود لامینار متفاوت است (۳۶). پلیت‌های تلقیح شده به باکتری را ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و تلقیح شده به قارچ را ۴۸ ساعت در ۲۵ درجه سانتی گراد قرار می‌دهند (۳۵). بعد از انکوباسیون قطر هاله را تا نزدیک‌ترین نقطه‌ای که در آن یک کاهش ۸۰ درصدی رشد را به طور مشخص داریم بر حسب میلی‌متر گزارش می‌کنیم (۳۸).

جدول ۱- مشخصات گیاهان دارویی و بافت‌های مورد استفاده

گیاه دارویی	اسم علمی	بافت مورد استفاده	ماده مؤثره	خواص دارویی	محل جمع‌آوری
رزماری	*Rosmarinus officinalis*	برگ	رزمارینیک	مکمل خوراکی انرژی زا، افزایش انرژی و وزن، حجم ساز، سرشار از ویتامین، رشد عضلات و استخوان(۲۲, ۲۳)	دامنه کبیرکوه – ایلام
بومادران	*Achillea millefolium*	برگ	ماتریکارین	بند آوردن خون، درمان کبودی چشم، رفع گاستریت‌های حاد و مزمن، رفع نفخ و ترش کردن، کاهش فشار خون، درمان نارسایی‌های کیسه صفرا، ازدیاد ادرار و رفع سنگ کلیه، باد شکن و تب بُر، دارای خاصیت ضد باکتری و ضد تورم، رفع ضعف قلب و ورم ماهیچه‌های دل، درمان بیماری‌های عصبی مانند ضعف اعصاب، هیستری، صرع و قلنج‌های تشنج آور، رفع کرمک، کرم آسکاریس، کیست ژیاردیا (۲۴, ۲۵)	شیراز – فارس
آویشن شیرازی	*Zataria Multiflora*	برگ	تیمول	رفع علائم سرماخوردگی، سینوزیت و آنفولانزا، زکام، برونشیت، آسم، گریپ، ضد سرفه، خلط آور و ضدالتهاب دهان و گلو، ضدعفونت بدن، شدت دادن به جریان خون(۲۶, ۲۷)	شیراز – فارس
زعفران	*Crocus sativus*	گلبرگ	کروستین	ضد افسردگی، عامل پیشگیری از کاهش دید در سالخوردگی، ضد سرطان، جلوگیری از سقط جنین و یا برطرف کننده سخت زایی (۲۸)	قائن – خراسان جنوبی
مورد	*Myrtus communis*	برگ	میرتول	آنتی سپتیک، ضد احتقان، قابض، تقویت‌کننده سیستم گوارشی، درمان اختلالات سیستم گوارشی، مجاری ادرار، سینوزیت و سرفه‌های خشک و دارای کاربرد موضعی آن در آکنه، بواسیر و پسوریازیس، کمک به رویش مجدد مو، ضد ریزش، سفیدی مو(۲۹, ۳۰)	دامنه کبیر کوه – ایلام

** شناسایی گونه‌های گیاهی در آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشگاه زابل توسط دکتر سیروس‌مهر انجام شده است.

در این تحقیق نیز دیسک‌ها به مدت ۲ ساعت در زیر اشعه ماورای بنفش قرار گرفتند تا استریل شوند. پس از آن که کدورت باکتری، به کدورت نیم مک فارلند رسید، پلیت‌ها توسط سوآپ استریل آغشته به سوسپانسیون میکروبی تلقیح شد و دیسک‌گذاری توسط پنس استریل و در کنار شعله انجام و فاصله دیسک‌ها با دیواره پلیت حداقل ۵ میلی‌متر و از یکدیگر حداقل ۲۵ میلی‌متر تعیین شد و بعد از تماس کامل با محیط کشت با سمپلر (Nichipet EXII ژاپن) استریل مقدار ۱۰ میکرو لیتر از عصاره‌های گیاهی روی دیسک‌ها ریخته شد. بعد از انجام مراحل فوق پلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴

ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور (شرکت memrt آلمان مدل RS232) نگهداری شدند. پس از سپری شدن زمان لازم، قطر هاله‌های عدم رشد با کولیس دیجیتال (مدل میتوتویو Mitutoyo) کشور ژاپن) با دقت ۰/۰۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (۳۱، ۳۹).

تجزیه آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده ها با کمک نرم‌افزار Statistic Student نسخه ۹ انجام و با توجه به کمی بودن داده‌ها، ابتدا طبیعی بودن توزیع فراوانی آنها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov تعیین شد (P >۰/۰۵) سپس میانگین پارامترها توسط آنالیز واریانس دو طرفه و برای بررسی اختلاف معنی‌دار از آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار LSD (Least Significant Difference) در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

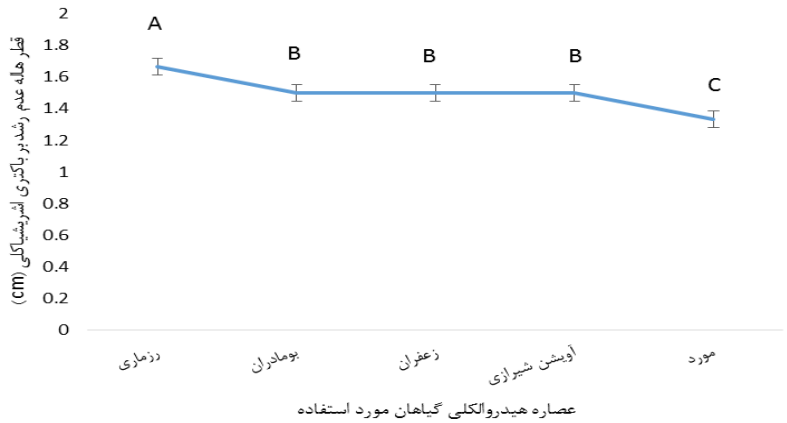
باکتری اشریشیاکلی: نتایج حاصل از تأثیر عصاره هیدرو الکلی گیاهان مورد، زعفران، بومادران، آویشن و رزماری، غلظت‌های مختلف عصاره مورد استفاده و همچنین اثر متقابل عصاره و غلظت‌های مختلف بر قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی* متفاوت و معنی‌دار در سطح کمتر از ۱ درصد بود (جدول ۲). آزمون تعقیبی LSD نشان داد که عصاره رزماری با میانگین ۱/۶۶ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره مورد با میانگین ۱/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره بودند (شکل ۱). در بین غلظت‌های مورد استفاده عصاره، مؤثرترین و کم اثرترین غلظت به ترتیب غلظت‌های ۱۲۰ و ۹۰ میلی‌گرم عصاره هیدرو الکلی عصاره هیدرو الکلی بود. از طرفی نیز غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم عصاره هیدرو الکلی رزماری با میانگین ۲ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد مؤثرترین و غلظت ۶۰ میلی‌گرم عصاره هیدرو الکلی مورد با میانگین ۱ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین بود (شکل ۲). در مقایسهی اثر عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشخص شد که اکثر عصاره‌ها نسبت به آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین بر باکتری *اشریشیاکلی* اثر مثبت داشته‌اند (شکل ۳).

جدول ۲- ارزیابی عصاره گیاهان مورد استفاده بر قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی*

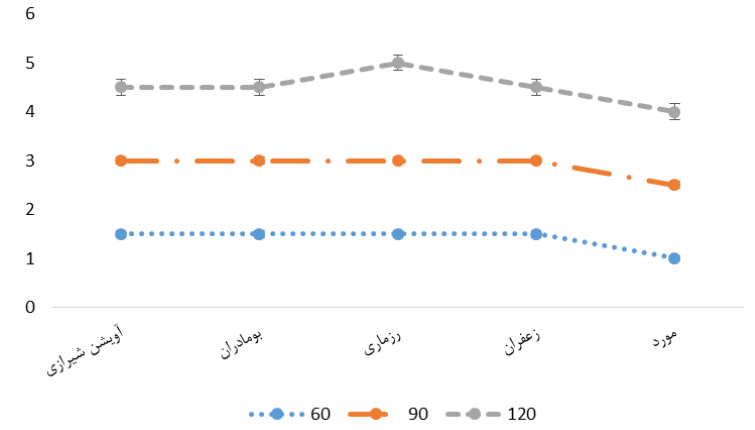
منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
عصاره	۴	۰/۵۰	۰/۱۲۵	۶۰	< ۰/۰۱
غلظت عصاره	۲	۰/۳۰	۰/۱۵۰	۶۰	< ۰/۰۱
عصاره غلظت عصاره	۸	۰/۷۰	۰/۰۸۷۵	۳۵	< ۰/۰۱
خطا	۳۰	۰/۰۷۵	۰/۰۰۲۵		
کل	۴۴	۱/۵۷۵			

باکتری لستریا مونوسیتوژنز: نتایج حاصل از تأثیر عصاره متانولی گیاهان مورد، زعفران، بومادران، آویشن و رزماری، غلظت‌های مختلف عصاره مورد استفاده و همچنین اثر متقابل عصاره و غلظت‌های مختلف بر قطر هاله عدم رشد باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* متفاوت معنی‌دار در سطح کمتر از ۱درصد بود (جدول ۳). آزمون تعقیبی LSD نشان داد که عصاره مورد با میانگین ۲/۵ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره رزماری با میانگین ۱/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره بودند (شکل ۴). در بین غلظت‌های مورد استفاده عصاره، مؤثرترین و کم‌اثرترین غلظت به ترتیب غلظت‌های ۱۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم عصاره هیدرو الکلی بود. از طرفی نیز

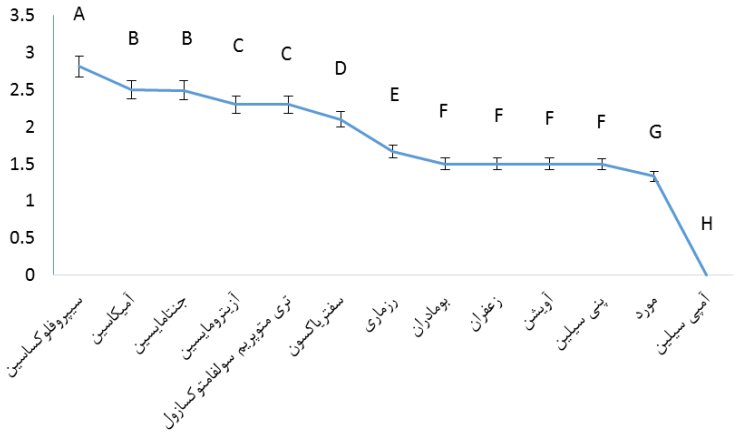
غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم عصاره بومادران و زعفران با میانگین ۳/۵ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد مؤثرترین و غلظت ۶۰ میلی‌گرم عصاره‌های رزماری، بومادران و زعفران کم اثرترین بودند (شکل ۵). در مقایسه اثر عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشخص شد که عصاره مورد نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* اثر مثبت داشته است (شکل ۶).



شکل ۱- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی* در عصاره‌های گیاهی مختلف. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است



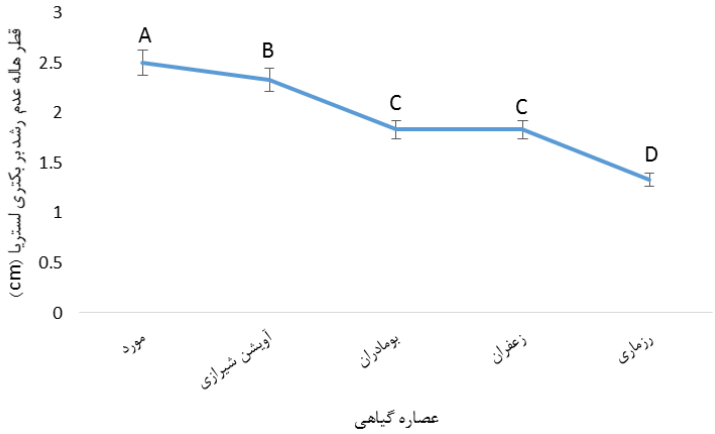
شکل ۲- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی* در اثر متقابل عصاره گیاهی و غلظت‌های مختلف عصاره (mg/ml). حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است



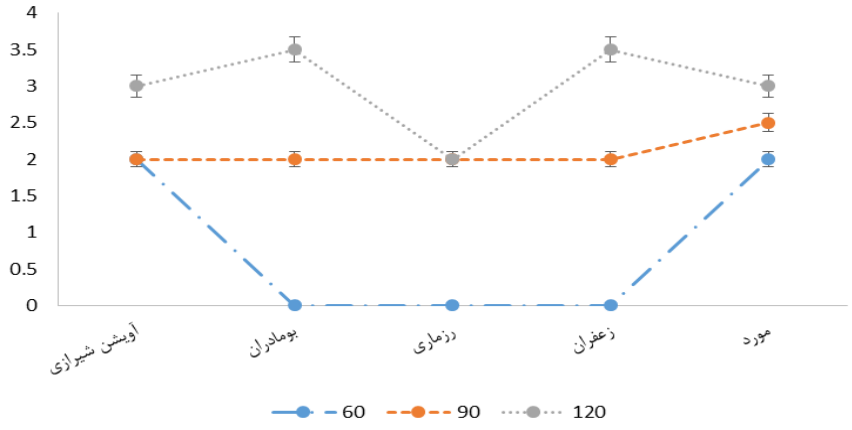
شکل ۳- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی* در اثر عصاره‌ها گیاهی و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

جدول ۳- ارزیابی عصاره گیاهان مورد استفاده بر قطر هاله عدم رشد باکتری *لستریا مونوسیتوژنز*

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
عصاره	۴	۷/۷	۱/۹۲۵	۹۶۲/۵	< ۰/۰۱
غلظت عصاره	۲	۳۶/۷	۱۸/۳۵	۹۱۷۵	< ۰/۰۱
عصاره * غلظت عصاره	۸	۱۱/۸	۱/۴۷۵	۷۲۳/۵	< ۰/۰۱
خطا	۳۰	۰/۰۶	۰/۰۰۲		
کل	۴۴	۵۶/۲۶			



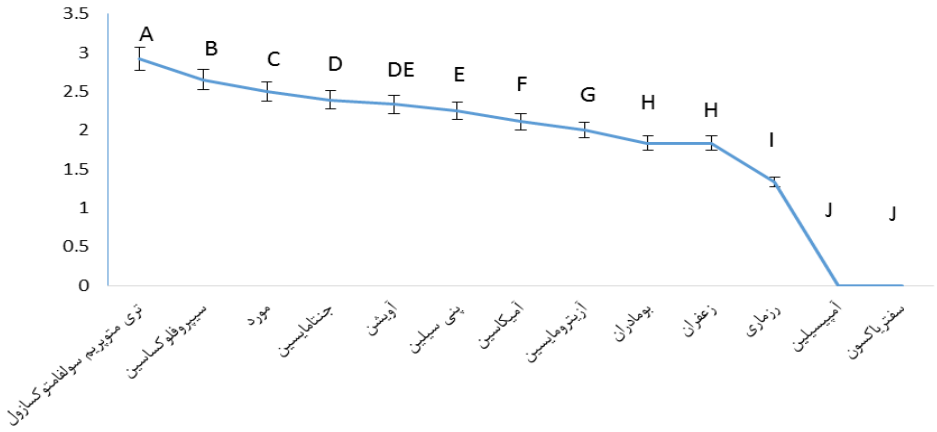
شکل ۴- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* در عصاره‌های مختلف. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۵- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* در اثر متقابل عصاره گیاهی و غلظت‌های مختلف عصاره (mg/ml). حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

باکتری *سالمونلا تیفی موریوم*: نتایج حاصل از تأثیر عصاره هیدرو الکلی گیاهان مورد، زعفران، بومادران، آویشن و رزماری، غلظت‌های مختلف عصاره مورد استفاده و همچنین اثر متقابل عصاره و غلظت‌های مختلف بر قطر هاله عدم رشد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* متفاوت و معنی‌دار در سطح کمتر از ۱درصد بود (جدول ۴). آزمون تعقیبی LSD نشان داد که عصاره مورد با میانگین ۱/۶۷ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره زعفران با میانگین ۰/۸۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره بودند (شکل ۷). در بین غلظت‌های مورد استفاده عصاره، مؤثرترین و

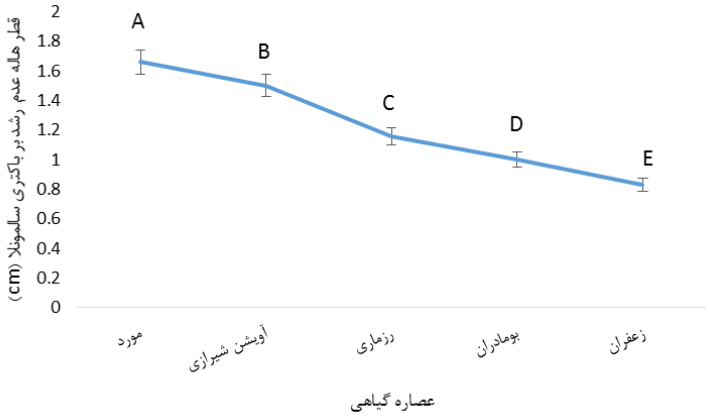
کم‌اثرترین غلظت، غلظت‌های ۱۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم عصاره هیدرو الکلی بود. از طرفی نیز غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم عصاره مورد، رزماری و زعفران با میانگین ۲ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد مؤثرترین و غلظت ۶۰ میلی‌گرم عصاره بومادران و رزماری و زعفران فاقد هرگونه هاله عدم رشد بودند (شکل ۸). در مقایسه اثر عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشخص شد که عصاره مورد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، جنتامایسین و آمپی‌سیلین بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* اثر مثبت داشته‌اند (شکل ۹).



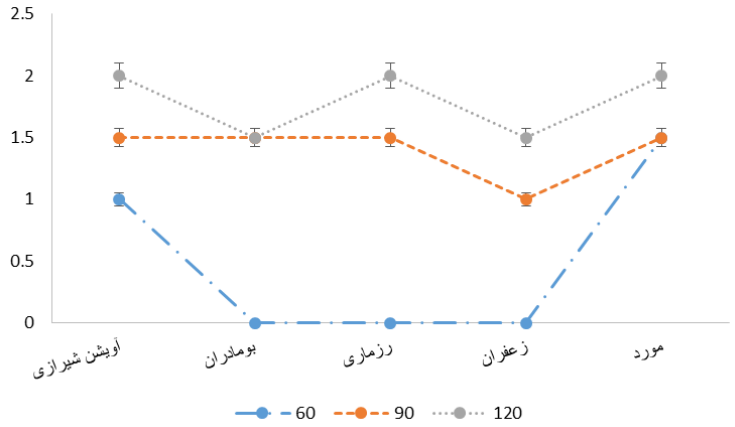
شکل ۶- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* در عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

جدول ۴- ارزیابی عصاره گیاهان مورد استفاده بر قطر هاله عدم رشد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم*

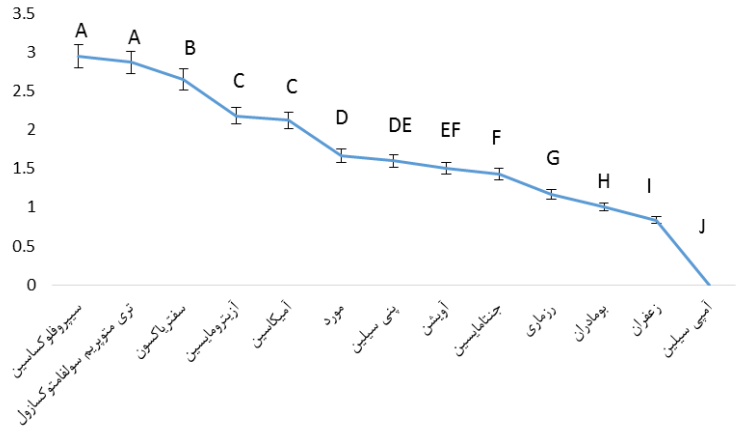
منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
عصاره	۴	۰/۷۵	۱/۰۷۵	۵۷۳/۵	< ۰/۰۱
غلظت عصاره	۲	۱۳/۳	۶/۶۵	۳۳۲۵	< ۰/۰۱
عصاره * غلظت عصاره	۸	۳/۲	۰/۴	۲۰۰	< ۰/۰۱
خطا	۳۰	۰/۰۶	۰/۰۰۲		
کل	۴۴	۲۰/۸۶			



شکل ۷- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* در عصاره‌های مختلف. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است



شکل ۸- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* در اثر متقابل عصاره گیاهی و غلظت‌های مختلف عصاره. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

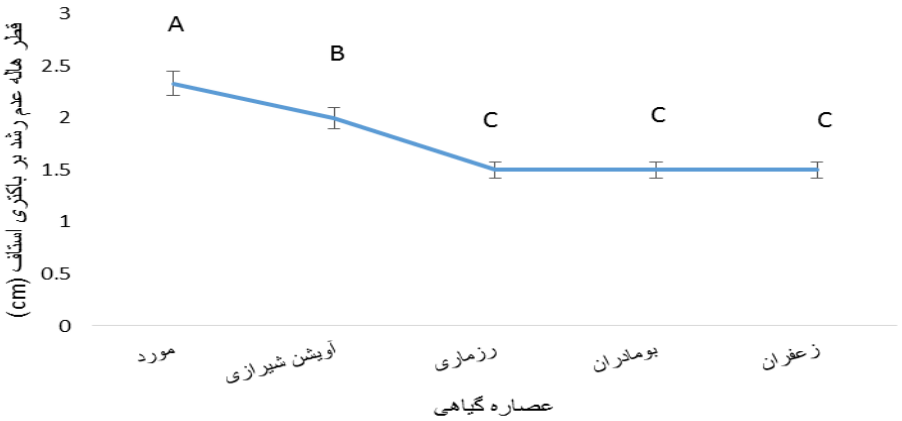


شکل ۹- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* در عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف. حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس: نتایج حاصل از تأثیر عصاره هیدرو الکلی گیاهان مورد، زعفران، بومادران، آویشن و رزماری، غلظت‌های مختلف عصاره مورد استفاده و هم‌چنین اثر متقابل عصاره و غلظت‌های مختلف بر قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* متفاوت معنی‌دار در سطح کمتر از ۱درصد بود (جدول ۵). آزمون تعقیبی LSD نشان داد که عصاره مورد با میانگین ۲/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره‌های زعفران، بومادران و رزماری با میانگین ۱/۵ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره‌ها بودند (شکل ۱۰). در بین غلظت‌های مورد استفاده عصاره، مؤثرترین و کم اثرترین غلظت، غلظت‌های ۱۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم بود. از طرفی نیز غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم عصاره مورد و رزماری با میانگین ۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد مؤثرترین و غلظت ۶۰ میلی‌گرم عصاره‌های رزماری زعفران و بومادران فاقد هرگونه هاله عدم رشد بودند (شکل ۱۱). در مقایسه اثر عصاره‌های گیاهی با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده مشخص شد که عصاره مورد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ازیترومایسین، جنتامایسین، آمیکاسین و آمپی‌سیلین بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر مثبت داشته‌اند (شکل ۱۲). هر چند سایر عصاره‌ها نیز شرایط مناسبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها داشتند.

جدول ۵- ارزیابی عصاره گیاهان مورد استفاده بر قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
عصاره	۴	۵/۳	۱/۳۲۵	۶۶۲/۵	< ۰/۰۱
غلظت عصاره	۲	۳۴/۳	۱۷/۱۵	۸۵۷۵	< ۰/۰۱
عصاره * غلظت عصاره	۸	۵/۲	۰/۶۵	۳۲۵	< ۰/۰۱
خطا	۳۰	۰/۰۶	۰/۰۰۲		
کل	۴۴	۴۴/۸۶			



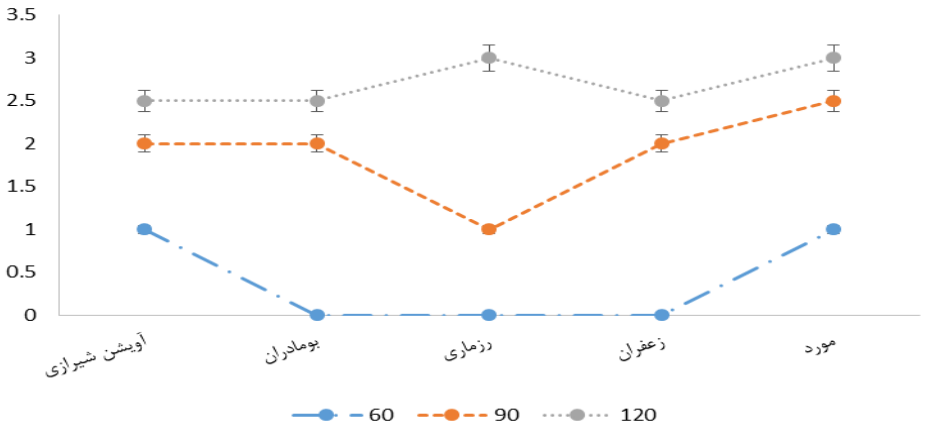
شکل ۱۰- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در عصاره‌های مختلف.
حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

بحث و نتیجه‌گیری

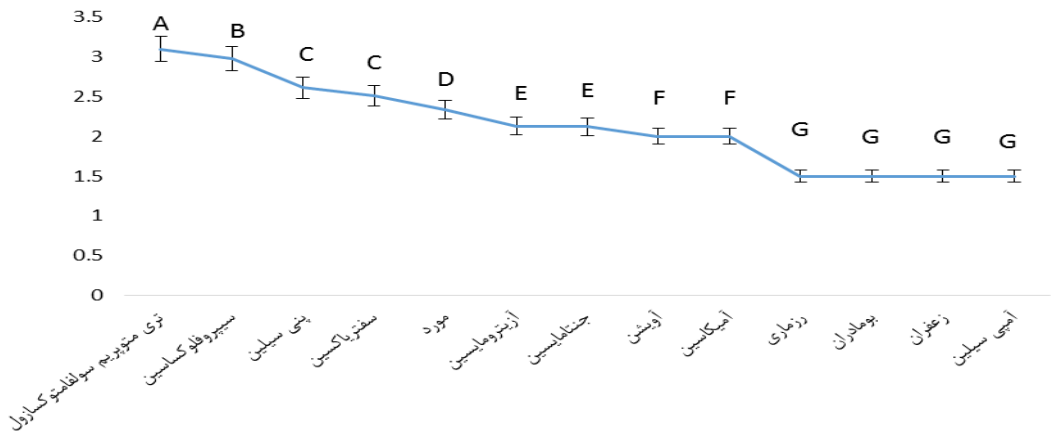
نتایج حاصل از تأثیر عصاره هیدرو الکلی گیاهان مورد استفاده نشان داد که عصاره رزماری با میانگین ۱/۶۶ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره مورد با میانگین ۱/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره بر باکتری *اشریشیاکلی* بود. عصاره مورد با میانگین ۲/۵ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره رزماری با میانگین ۱/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* بودند. عصاره مورد با میانگین ۱/۶۷ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره زعفران با میانگین ۰/۸۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم اثرترین عصاره بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بودند. عصاره مورد با میانگین ۲/۳۳ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد باکتری مؤثرترین و عصاره‌های زعفران، بومادران و رزماری با میانگین ۱/۵ سانتی‌متر قطر هاله عدم رشد کم‌اثرترین عصاره‌ها بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند.

گزارش شده که عصاره اتانولی مورد بر *استافیلوکوکوس اورئوس* (۴۰، ۴۱) تأثیر مثبت داشته ولی روغن مورد تأثیر بیشتری نشان داده است (۴۱). ضمناً تأثیر مثبت سایر عصاره‌های استخراجی کلروفرم، اتیل استات و متانول برگ مورد و همچنین وابستگی این عصاره‌ها به غلظت آن‌ها بر *استافیلوکوکوس اورئوس* (۴۲) و تأثیر بیشتر عصاره متانولی نسبت به عصاره اتانولی برگ و شاخه گیاه مورد بر باکتری‌های *لستریا مونوسیتوژنز*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین تأثیر بیشتر عصاره مورد بر باکتری‌های گرم مثبت بوده است (۴۳). در مطالعه‌ای مشخص شده که اگرچه عصاره متانولی گیاه مورد تأثیر بالایی در فعالیت انتشار نفوذی *اشریشیاکلی* نشان نداده اما حداقل غلظت

کشنده برای *اشریشیاکلی* بالای ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش داده‌اند (۴۴) و در تحقیقات دیگر نیز از عدم تأثیر عصاره مورد بر *اشریشیاکلی* حکایت داشته‌اند (۴۱، ۴۳). Houshmand و همکاران در تحقیقی بیشترین اثربخشی عصاره گیاه مورد بر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در غلظت ۲/۵ درصد با قطر هاله عدم رشد حدود ۱۶ میلی‌متر و کمترین اثربخشی عصاره گیاه مورد در غلظت ۵ درصد بر لاکتوباسیل با قطر هاله عدم رشد حدود ۶ میلی‌متر گزارش دادند و در کل به این نتیجه رسیدند که عصاره مورد با غلظت‌های مختلف دارای اثرات متفاوت بر روی باکتری‌ها است (۴۵).



شکل ۱۱- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در اثر متقابل عصاره گیاهی و غلظت‌های مختلف عصاره. حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است



شکل ۱۲- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف. حروف مشترک نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است

در تحقیق دیگر نیز غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره هیدرو الکلی مورد بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین تأثیر را نشان داده که اختلاف معنی‌داری با تمامی تیمارهای دیگر و آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد داشته اما بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* تأثیری نداشته و فقط در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر باکتری *اشریشیاکلی* تأثیر داشته است (۴۶). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که عصاره برگ مورد توانسته مؤثرترین عصاره بر باکتری‌های *لستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و کم اثرترین عصاره بر

باکتری *اشریشیاکلی* باشد. ضمناً با افزایش غلظت عصاره مورد، فعالیت ضد میکروبی آن نیز زیاد شده به طوری‌که بیشترین تأثیر را در غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر داشته است. لازم به ذکر است که کم اثرترین غلظت عصاره گیاه مورد بر *اشریشیاکلی* غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی لیتر بوده از طرفی هر چند با افزایش غلظت عصاره، خاصیت ضد میکروبی آن نیز زیاد شده اما نتوانسته از ۹۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشتر، تأثیر مثبت داشته باشد و در کل نتایج خاصیت ضد میکروبی عصاره هیدرو الکلی مورد در این تحقیق با نتایج ارایه شده (۴۰، ۴۱، ۴۴، ۴۶) مشابهت داشت. ضمناً در تحقیق دیگری قطر هاله عدم رشد عصاره گیاه مورد (۱۰درصد) بر روی *استافیلوکوکوس آرئوس* ۳۵ میلی‌متر و بر روی *پسودوموناس آئروژینوزا* ۱۸ میلی‌متر بوده است (۴۷). در تحقیق حاضر نیز قطر هاله عدم رشد عصاره مورد بر باکتری *استافیلوکوکوس* ۳۰ میلی‌متر بود.

Afshar-Mohammedan و همکاران اثر ضد باکتریایی عصاره متانول اسیدی کلاله و گلبرگ گونه‌های مختلف زعفران (کروکوس کروکوس، کروکوس اسپیشوس و ساتیووس کاسپیوس) بر روی دو نوع باکتری گرم‌مثبت (*باسیلوس سابتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) و دو باکتری گرم‌منفی (*اشریشیاکلی* و *پسودوموناس ائروجینوسا*) از طریق سنجش قطر هاله عدم رشد باکتری به روش میزان نفوذ چاهک و تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد بررسی و به این نتیجه رسیدند که *باسیلوس سوبتیلیس* حساس‌ترین باکتری و *اشریشیاکلی* مقاوم‌ترین باکتری به عصاره‌ها بود. همچنین عصاره گلبرگ گونه کروکوس ساتیووس و عصاره‌ی کلاله گونه *کروکوس اسپیشوس* اثر مهاری بیشتری روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نشان داده‌اند (۴۸).

در تحقیقات دیگری اثر ضد میکروبی عصاره آبی گلبرگ (۴۹) و کلاله (۵۰، ۵۱) زعفران بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی مورد بررسی قرار داده و متوجه شدند که عصاره آبی گلبرگ زعفران بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* مؤثر اما بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *اشریشیاکلی* کم اثر اما عصاره کلاله بر اشریشیاکلی و *استافیلوکوکوس اورئوس* مؤثر بوده است. Barani و همکاران اثر ضد میکروبی عصاره آبی و الکلی زعفران بر باکتری‌های *استرپتوکوکوس موتانس*، *کاندیدا آلبیکنس* و *لاکتوباسیل* را بررسی و به این نتیجه رسیدند که عصاره آبی و الکلی زعفران بر روی هر سه باکتری اثر مهاری داشته، اگرچه که قدرت آن‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین) کمتر بوده است. ضمناً عصاره الکلی زعفران در از بین بردن قارچ *کاندیدا آلبیکنس* و باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* از عصاره آبی مؤثرتر بوده است (۵۲). در تحقیق حاضر نیز عصاره هیدرو الکلی گلبرگ زعفران بر *اشریشیاکلی* مؤثر بوده اما با افزایش غلظت عصاره تأثیر معنی‌داری بر *اشریشیاکلی* نداشته، ضمناً عصاره هیدرو الکلی زعفران تا سطح ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر باکتری‌های *لستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تأثیر نداشته اما با افزایش غلظت عصاره تأثیر آن بر این سه سویه باکتری بیشتر شده حتی مؤثرترین عصاره بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* عصاره گلبرگ زعفران به همراه عصاره برگ بومادران (در غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بوده است اما نسبت به سایر گیاهان بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کم‌اثرترین بوده است. ضمناً نتایج این تحقیق با نتایج (۴۸، ۵۲) مشابهت داشت.

در تحقیقی اثرات مهاری عصاره گیاه رزماری بر روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفته و مشخص شده

که *پروتئوس میرابیلیس* و *انتروکوکوس فاسیالیس* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به رقت‌های ۱، ۱/۲ و ۱/۴ و *انتروکوکوس فاسیالیس* و *اشریشیاکلی* حساس‌ترین باکتری‌ها نسبت به رقت‌های ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲ و ۱/۶۴ اسانس رزماری بودند (۵۳). در تحقیقی عصاره الکلی برگ و سرشاخه‌های گل‌دار خشک‌شده گیاه رزماری، گیاه علف چای و گیاه کاجیره به روش چاهک در غلظت‌های مختلف ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ گرم در میلی‌لیتر ارزیابی و گزارش دادند که در سه ساعت اولیه در هر سه غلظت باکتری *اشریشیاکلی* در حضور عصاره الکلی گیاه رزماری رشد کمتری نسبت به دو گیاه دیگر داشته و در این میان کمترین اثر مربوط به عصاره الکلی گیاه علف چای بوده اما از ساعت سوم به بعد، این تغییرات حالت معکوس پیدا می‌کنند و کاهش رشد باکتری *اشریشیاکلی* در حضور عصاره الکلی علف چای بیشتر از دیگر عصاره‌ها بوده است (۵۴).

نتایج حاصل از مطالعه Golshani و Dawoodi (۵۵) نشان داده که قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی رزماری بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بین ۸ تا ۱۵ میلی‌متر و همچنین قطر هاله عدم رشد در *سودوموناس آئروژینوزا* بین ۱۵ تا ۱۸ میلی‌متر مشاهده گردیده است. در تحقیقی دیگر جهت بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس رزماری مشخص گردیدکه میزان هاله عدم رشد این اسانس بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۱۸ میلی‌متر بود (۵۶) و همچنین دیگر اثرات مثبت اسانس رزماری بر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* گزارش شده است (۵۶، ۵۸).

در تحقیق حاضر عصاره رزماری مؤثرترین عصاره بر *اشریشیاکلی* بوده و با افزایش غلظت عصاره تأثیر معنی‌دار بیشتری داشته است که با نتایج قبلی (۵۳، ۵۴) ارایه شده مشابهت داشت، اما کم‌اثرترین عصاره بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* و جزو کم اثرترین عصاره‌ها بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بوده و تا سطح ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نیز بر هیچ کدام از سه سویه نامبرده هیچ اثری نداشته است، اما با افزایش غلظت عصاره تأثیر آن بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* بیشتر شده ولی این اثر با افزایش بیش از ۹۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر معنی‌دار نبوده است. مؤثرترین غلظت عصاره برگ رزماری بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده است. ضمناً مشخص شده عصاره هیدرو الکلی رزماری در غلظت های بالا (۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تأثیر مؤثرتری داشته است. قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی رزماری بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در تحقیق حاضر ۱۵ میلی‌متر بوده که با نتایج قبلی (۵۵، ۵۶) ارائه شده مشابهت دارد.

در گزارشی غلظت‌های مختلف (۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عصاره هیدرو الکلی گل و برگ بومادران به روش انتشار چاهک بر *استافیلوکوکوس آرئوس*، باسیلوس سرئوس، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیاکلی* بررسی و مشخص شده که عصاره گل بیشترین تأثیر بر باکتری *استافیلوکوکوس* آرئوس (با میانگین ۱۳ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد) و کمترین تأثیر (با میانگین ۴ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد) بر *اشریشیاکلی* داشته، هر چند *سودوموناس* هیچ حساسیتی به عصاره از خودش نشان نداده بود (۵۹). Ataei و همکاران اثر ضد قارچ و ضد باکتری عصاره‌های بومادران، بابونه و ریوند در مقایسه با دهان‌شویه‌های شیمیایی کلرهگزیدین ایرانی و خارجی را بر برخی باکتری‌ها و قارچها بررسی و به این نتیجه رسیدند که عصاره ریوند بیشترین اثر ضد

باکتریایی را از خود نشان داده و سپس عصاره بومادران و بابونه به ترتیب در مرحله بعدی قرار داشته‌اند. از نظر اثر ضد قارچی هر سه عصاره اثر بسیار ضعیفی نشان دادند (۶۰).

Shirazi و همکاران عصاره متانولی برگ مورد (*Myrtus communis* L.)، برگ و سرشاخه‌های گل‌دار مریم‌گلی (*Saliva officinalis* L.)، ریزوم و ریشه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، پوست خارجی نارنج (*Citurs bigaradia* L.)، ریشه کاسنی (*Cichorium intybus* L.)، برگ و سرشاخه‌های گل‌دار بومادران (*Achillea millefolium* L.)، برگ افسنطین (*Artemidia absinthium* L.)، میوه گل پر (*Heraclim persicum* Desf. ex Fischer)، دانه و برگ اسپند (*Peganum harmala* L.) و پوست شیطان زیتون (*Melia ozedarach* L.) را بر روی هلیکوباکترپیلوری مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که عصاره‌های گیاهی افسنطین، شیطان زیتون، شیرین‌بیان، مریم‌گلی، مورد به ترتیب با ۱۵، ۱۴، ۱۴، ۱۴، ۱۳ و ۱۱ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد بر *هلیکوباکترپیلوری* اثر مهاری داشته ولی سایر عصاره‌های گیاهی اثر مهاری قابل توجهی نداشتند (۶۱). در تحقیق حاضر نیز میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره هیدرو الکلی بومادران به روش انتشار دیسک بر باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس* آرئوس ۱۵ میلی‌متر، *سالمونلا تیفی موریوم*، ۱۰ میلی‌متر و *لستریا مونوسیتوژنز*، ۱۸ میلی‌متر بود که با نتایج ارائه شد ه قبلی (۵۹، ۶۱) مشابهت داشت. از طرفی عصاره هیدرو الکلی بومادران به ترتیب بیشتر از ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* تأثیر نداشته اما خاصیت ضد میکروبی آن با افزایش غلظت بر *استافیلوکوکوس* آرئوس و *لستریا مونوسیتوژنز* بیشتر شده است. در کل عصاره بومادران در غلظت‌های پایین اثر متوسط و ضعیف ضد باکتریایی داشته و نسبت به گیاهانی از جمله مورد، آویشن شیرازی، رزماری ضعیف‌تر بوده است، اما در غلظت‌های بالا اثر متفاوت‌تری داشته و حتی تا ۳۵ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد در غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* نیز داشته است.

با توجه به این که هر تحقیقی کمی و کاستی‌هایی دارد و تحقیق حاضر نیز مستثنی نبوده لذا پیشنهاد می‌گردد در مرحله بعدی مواد مؤثره گیاهانی که بیشترین نقش را در خاصیت ضد میکروبی داشتند به طور مستقیم مورد ارزیابی قرار گیرد تا نتیجه‌گیری نهایی به طور دقیق‌تر ارائه شود هر چند نویسنده مسئول این مقاله دارای چشم انداز تحقیقاتی تصویب شده در دانشگاه زابل به نام تولید انبوه متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی بوده که در مراحل بعدی تحقیقات زنجیرواری خود این کار را نیز انجام خواهد داد.

مؤثرترین عصاره بر *اشریشیاکلی* عصاره رزماری (غلظت ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بوده است. مؤثرترین عصاره بر باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* عصاره مورد بوده ولی در سطوح بالاتر (۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عصاره زعفران و بومادران بیشترین تأثیر را داشته‌اند. مؤثرترین عصاره بر باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* عصاره مورد بوده از طرفی در سطوح بالاتر (۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عصاره مورد به همراه عصاره رزماری و آویشن بیشترین تأثیر را داشته‌اند. مؤثرترین عصاره بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* عصاره مورد بوده از طرفی در سطوح بالاتر (۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) عصاره مورد به همراه عصاره رزماری بیشترین تأثیر را داشته‌اند. در کل مؤثرترین عصاره بر باکتری‌های *لستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* عصاره مورد و بر باکتری *اشریشیاکلی* عصاره رزماری است.

References

1- Pinto RJ, Marques PA, Neto CP, Trindade T, Daina S, Sadocco P. Antibacterial activity of nanocomposites of silver and bacterial or vegetable cellulosic fibers. Acta Biomater. 2009; 5(6):2279-89.

2- Marilena C, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Asteraceae. Int J Food Microbiol. 2005; 95(2):187-95.

3- Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus, Artemisia santonicum, and Artemisia spicigera essential oils. J. Agric. Food Chem. 2005; 53:9452-8.

4- Fooladvand Z, Fazeli-nasab B. Antibacterial activities of *Stachys lavandulifolia Vahl*. extract against eight bacteria. JHD (An International Journal on Medicinal Herbs). 2014; 5(1):13-8.

5- Mosaddegh M, Naghibi F. Iranian traditional medicine, past and present in traditional medicine and materia medica. Tehran: TMRC Pub. 2002:2-20.

6- Fazeli-Nasab B, Rahnama M, Mazarei A. Correlation between Antioxidant Activity and Antibacterial Activity of Nine Medicinal Plant Extracts. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(149):63-78 (In persian).

7- Azadbakht M, Morteza-semnani K, Khansari N. The essential oils composition of Achillea wilhelmsii C. Koch. Leaves and flowers. J Med Plants. 2003; 2:55-559.

8- Omidbeigi R. Production and processing of medicinal plants. Tarrahan Nashe press, Tehran. 2007:176 [In persian].

9- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods (a review). Int J Food Microbiol. 2004; 94(3):223-53.

10- Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 2005; 22(4):273-92.

11- Shapoori R, Rhnama M, Eghbal-Zadeh S. Study of *Salmonella* serotypes in chicken meat and egg, and determine the antibiotic susceptibility in Zanjan. J Biol Sci. 2009; 2(3):63-71.

12- Kotze M, Eloff J, Houghton P. Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). S. Afr. J. Bot. 2002; 68(1):62-7.

13- Sangclic O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano. Wissenchaft Und Technologic. 2003; 36(5):467-73.

14- Najafi Momen R, Torabi Goudarzi M, Bahonar A, Akbari H, Darabi M. Clinical Evaluation of the Effect of Myrtle Oil on the Oral Lesions of FMD in Cattle. J Med Plants. 2011; 2(38):135-41 [In persian].

15- Al-saimary LE, Bakr SS, Jaffar T, Al-saimary AE, Al-Muosawi R. Effect of some plant extracts and antibiotics on Psendo minas aeruginosa isolated from various burn cases. Saudi med. j. 2002; 23(7):802-5.

16- Vahidi H, Kamalinejad M, Sedaghati N. Antimicrobial properties of Croccus sativus L. Iran J Pharm Res. 2010;1:33-5.

17- Larrán S, Ringuelet JA, Carranza MR, Henning CP, Ré MS, Cerimele EL, et al. In vitro fungistatic effect of essential oils against Ascosphaera apis.JEOR. 2001; 13(2):122-4.

18- Sokmen A, Sokmen M, Daferera D, Polissiou M, Candan F, Ünlü M, et al. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini Afan*. (Asteraceae).Phytother Res. 2004; 18(6):451-6.

19- Hosseinzadeh F, Sadeghieh Ahari S, Mohammadian-erdi A. Survey the Antibiotics Prescription by General Practitioners for Outpatients in Ardabil City in 2013. J Ardabil Uni Med Sci. 2016; 16(2):140-50.

20- Ebrahimzadeh MA, Hosseinimehr SJ, Hamidinia A, Jafari M. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Feijoa sallowiana* fruits peel and leaves. Pharmacol online. 2008; 1:7-14.

21- Pourmorad F, Hosseinimehr S, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. Afr j biotechnol. 2006; 5(11):1142-5.

22- Cisarova M, Tancinova D, Medo J, Kacaniova M. The in vitro effect of selected essential oils on the growth and mycotoxin production of Aspergillus species. J Environ Sci Health B, Pesticides. 2016; 51(10):668-74. Epub 2016/06/21.

23- Felsociova S, Kacaniova M, Horska E, Vukovic N, Hleba L, Petrova J, et al. Antifungal activity of essential oils against selected terverticillate penicillia.: AAEM. 2015; 22(1):38-42. Epub 2015/03/18.

24- Kermanshah H, Kamangar SS, Arami S, Kamalinegad M, Karimi M, Mirsalehian A, et al. The effect of hydro alcoholic extract of seven plants on cariogenic bacteria--an in vitro evaluation. Oral Health Dent Manag. 2014; 13(2):395-401. Epub 2014/07/06.

25- Jaimand K, Ahrabi Asli H, Monfared A. Extraction and Determination of Quercetin in *Achillea millefolium* L., *Achillea bieberstinuii Afan.* and *Achillea tenuifolia Lam*.JSSM . 2011; 27(3):529-39.

26- Sharafati Chaleshtori R, Rafieian Kopaei M, Rokni N, Mortezaei S, Sharafati Chaleshtori A. Antioxidant Activity of Zataria Multiflora Hydroalcoholic Extract and Its Antibacterial Effect on Staphylococcus Aureus. J Mazandaran Univ Med

Sci 2013; 22(1):88-94 [In persian].

27- Shokri H, Sharifzadeh A. Zataria multiflora Boiss. A review study on chemical composition, anti-fungal and anti-mycotoxin activities, and ultra-structural changes. J Herbmed Pharmacol. 2017; 6(1):1-9.

28- Mohammadi D, Fazeli-Nasab B. Overview medicinal properties and hazards of saffron stigma and petals with an emphasis on the anti-tumor effects and lowers blood pressure. 2nd national conference on medicinal plants and permanent agriculture; Hamedan2014.

29- Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Eslami S. Effect of Increasing the Polarity of Solvent on Total Phenol and Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of Myrtle (Myrtus communis L.). J Mazandaran Univ Med Sci. 2015; 25(126):68-81 [In persian with abstract English].

30- Mozdastan S, Ebrahimzadeh MA, Khalili M. Comparing the Impact of Different Extraction Methods on Antioxidant Activities of Myrtle (Myrtus communis L.). J Mazandaran Univ Med Sci. 2015; 25(127):10-24 [In persian].

31- Abubakar LA, Mwangi CM, Uku JU, Ndirangu SN. Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin, *Tripneustes gratilla*, (Echinoidea). Afr. J. Pharmacol. Ther. 2012; 1(1):19-23.

32- Heatley N. A method for the assay of penicillin.Biochem J. 1944; 38(1):61-5.

33- Bauer A, Kirby W, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American J clin pathol. 1966; 45(4):493-6.

34- Freixa B, Vila R, Vargas L, Lozano N, Adzet T, Cañigueral S. Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants.Phytother Res . 1998; 12(6):427-30.

35- Salie F, Eagles P, Leng H. Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species.J Ethnopharmacol. 1996; 52(1):27-33.

36- Bariş Ö, Güllüce M, ŞAHİN F, Özer H, Kiliç H, Özkan H, et al. Biological activities of the essential oil and methanol extract of Achillea biebersteinii Afan.(Asteraceae). Turkish J Biol. 2006; 30(2):65-73.

37- Nostro A, Germano M, D'angelo V, Marino A, Cannatelli M. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity.J Appl Microbiol. 2000; 30(5):379-84.

38- Regiater F. Rules and regulations. Antibiotic susceptibility disks: correction. Fed Regist. 1973; 38:2576-84.

39- Jahan N, Khatoon R, Shahzad A, Shahid M, Ahmad S. Comparison of antibacterial activity of parent plant of Tylophora indica Merr. with its in vitro raised plant and leaf callus. Afr j biotechno. 2013; 12(31).

40- Alem G, Mekonnen Y, Tiruneh M, Mulu A. Invitro antibacterial activity of crude preparation of myrtle (*Myrtus communis*) on common human pathogens. Ethiop med j. 2008; 46(1):63-9.

41- Salvagnini LE, Oliveira JRS, Santos LEd, Moreira RRD, Pietro RCL. Evaluation of the antibacterial activity of *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) leaves. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18(2):241-4.

42- Gholamhoseinian-Najar A, Mansouri S, Rahighi S. Effect of sub-inhibitory concentrations of myrtus communis leave extracts on the induction of free radicals in *Staphylococcus aureus*; A possible mechanism for the antibacterial action. Asian J Plant Sci. 2009; 8(8):551-6.

43- Amensour M, Bouhdid S, Fernandez-Lopez J, Idaomar M, Senhaji NS, Abrini J. Antibacterial activity of extracts of Myrtus communis against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. Int J Food Propert. 2010; 13(6):1215-24.

44- Ghasemi Pirbalouti A, Jahanbazi P, Enteshari S, Malekpoor F, Hamedi B. Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants. Arch. of Biol. Sci. 2010; 62(3):633-41.

45- Houshmand B, Mortazavi H, Alikhani Y, Abdolsamadi H, AhmadiMotemayel F, Zare Mahmoudabadi R. In Vitro Evaluation of Antibacterial Effect of *Myrtus* Extract with Different Concentrations on Some Oral Bacteria. J Mash Dent Sch. 2011; 35(2):123-30.

46- Taheri A, Seyfan A, Jalalinezhad S, Nasery F. Antibacterial Effect of *Myrtus Communis* Hydro-Alcoholic Extract on Pathogenic Bacteria ZJRMS. 2013; 15(6):19-24.

47- Kilani S, Abdelwahed A, Ammar RB, Hayder N, Ghedira K, Chraief I, et al. Chemical composition, antibacterial and antimutagenic activities of essential oil from (Tunisian) Cyperus rotundus. JEOR. 2005; 17(6):695-700.

48- Afshar-Mohammedan M, Kordi S, Mashhadi-Nejad A. Antibacterial activity of stigma and petal of different species of saffron (*Crocus Spp*.). J Cell Mol Res (Iranian J Biol). 2016; 29(3):265-73.

49- Gandomi Nasrabadi H, Azami Sarokelaei L, Misaghi A, Abbaszadeh S, Shariatifar N, Tayyar Hashtjin N. Antibacterial effect of aqueous and alcoholic extracts from petal of saffron (*Crocus sativus* L.) on some foodborne bacterial pathogens. J Med Plants. 2012; 2(42):189-96.

50- Razzaghi R, Nourbakhsh R, Hemmati Kakhaki A, Saberi Najafi M. Antimicrobial effect of saffron. 3rd national congress on saffron, Iran [In persian]. 2003.

51- Tayel AA, El Tras WF. Possibility of fighting food borne bacteria by Egyptian folk medicinal herbs and spices extracts. J Egypt Public Health Assoc. 2009; 84(1-2):21-32.

52- Barani Karbasaki F, Hossenzadeh H, Fazli Bazzaz BS, Hoda V, Ghazvini K, Ajami B-a-m. Evaluation of Antimicrobial effects of Aqueous and Alcoholic Extracts of Saffron on Oral Path-

ogenic Microbes (Streptococcus Mutans, Lactobacillus, Candida Albicans). J Mashhad Dent Sch. 2016; 40(3):203-12.

53- Ahmadyasbchin S, Mostafapor-rami M, Rajaee-maleki S. The in Vitro Inhibitory Effects of the *Rosemary* Essential Oil on Some Gram Positive and Negative Bacteria. Scientific J Ilam Univ Med Sci. 2016; 24(2):80 - 9.

54- Mashreghi M, Momtazi F. Comparison of the Antibacterial Effects of Various Concentrations of Alcoholic Extracts of *Rosmarinus officinalis*, *Hypericum perforatum* and *Carthamus tinctorius* on the Growth Phases of Esherichia coli O157. J Rafsanjan Univ Med scie. 2012; 11(2):103-14.

55- Golshani Z, Dawoodi V. In vitro study of antimicrobial effects of *Rosmarinus officinalis* leaf extract against some pathogens. Arak Med Univ J. 2013; 16(77):82-9.

56- Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytother Res. 2007; 21(10):989-94.

57- Tsai P-J, Tsai T-H, Ho S-C. In vitro inhibitory effects Phytother Res of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. Food chem. 2007; 105(1):311-6.

58- Seydim A, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. Food Res Int. 2006; 39(5):639-44.

59- Amjad L, Mohammadi-Kamalabadi M, Mohammadi-Seichani M. Antibacterial activity of methanol extracts of flowers and leaves of yarrow. Qom Univ Med Sci J. 2011; 5(3):50-6.

60- Ataei Z, Abdolahi H, Naderi Poor S, Mohamadi S. An in vitro study of the effects of Yarrow, Chamomile and Rhubarb herbal extracts on candida albicans and common oral bacteria JIDAI. 2006; 18(3):25-31 [In persian].

70- Shirazi M, Amin G, Akhondi Lavasani B, Eshraghi S. Study of Antibacterial Properties of Adiantum capillus-veneris Extract on Eight Species of Gram Positive and Negative Bacteria. J. Med Plants. 2011; 4(40):124-32 [In persian].

Evaluation of antimicrobial activity hydro alcoholic extract of some medicinal herbs against a range of Gram-positive and gram-negative bacteria

Mohammad Rahnama[1], Bahman Fazeli-Nasab [*2], ayoub Mazarei [3], Saeed Shahriari [4]

1- Department of nutrition and animal breedings, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran.
3 M.Sc. of Plant medicinal, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
4- Department of pathobiology, Veterinary campus, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: March 25, 2018; Revise: April 30, 2018; Accept: July 21, 2018

Summary

Bacterial have caused the outbreak of diseases more than any other pathogens that are transmitted by food. The aim of this study is to evaluate the extracts of the medicinal plants, saffron, yarrow, thyme and rosemary on the bacteria *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial effects of hydro-ethanol extract on the bacteria was surveyed using diffusion method in a culture medium Mueller-Hinton agar by paper discs (6 mm) based on Bauer and Kirby instructions. The antibiotics *ciprofloxacin*, *amikacin*, *gentamicin*, *azithromycin*, *trimethoprim-sulfamethoxazole*, *ceftriaxone*, *penicillin* and *ampicillin* were used as positive control. Means square was conducted by Least Significant Difference (LSD) test at five percent of probability level ($P<0.05$). Myrtus Extract is the most effective medicinal plant on the bacteria *Listeria*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*, respectively; with an average of 2.5±0.43, 1.67±0.25 and 2.33±0.66 cm the diameter of bacterial inhibition zone. Rosemary Extract is the most effective medicinal plant on the bacteria *E.coli*, respectively with an average of 1.25±0.66 cm the diameter of bacterial inhibition zone. Comparison of the effect of plant extracts with antibiotics was used in this research, and it was found that most of the extracts were more effective than *ampicillin* and *penicillin* on the bacterium E. coli. *Myrtus* extract, compared with all antibiotics, was more effective on bacteria *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus*. According to the results and increasing resistance to antimicrobial synthetic materials; Myrtus, and after that, rosemary plant can be as effective in destroying some bacteria like; *E.coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*.

KeyWords: *E. coli, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus*