بررسی تأثیر زمان برداشت بر فعالیت ضد باکتریایی برگ گیاه نوروزک[۱]

معصومه مدرس، پروانه ابریشمچی: دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم

چکیده

گیاه نوروزک از تیره نعناع[۲] و بومی استان خراسان و سمنان است. این گیاه دارای خواص ارزشمند بسیاری است. از جمله، ضددرد، ضدالتهاب، آرام بخش، کاهش‌دهندهٔ قند خون و آنتی‌اکسیدان است. این تحقیق به منظور تعیین بهترین مرحلهٔ رشد و نمو برای استفادهٔ بهینه از خواص ضد باکتریایی برگ گیاه دارویی نوروزک[۱]، اجرا شد. برگ گیاه در سه مرحلهٔ مختلف از رشد و نمو (مرحلهٔ رویش، مرحلهٔ گل‌دهی و مرحلهٔ رسیدگی بذر) جمع‌آوری و خشك شد. سپس عصارهٔ متانولی برگ در دستگاه تقطیر در خلأ خشک شد. غلظت‌های ۵،۱۰،۱۵و۲۰ گرم در لیتر از آن تهیه و به‌روش دیسک دیفوزیون[۳] بر روی باکتری‌های اسریشیا کولی[۴]، پسدومونوس آروجینوس[۵] ، استافیلوکوکوس آرئوس[۶] ، کلبسیلا پنئومونیی[۷] و پروتئوس میرابیلیس[۸] اثر داده شد. پس از ۲۴ ساعت، قطر هاله ممانعت از رشد اندازه‌گیری و اثر بازدارندگی این عصاره‌ها با یکدیگر وبا آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین، پنی سیلین و آمپی سیلین مقایسه شد. تجزیه وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP و بر اساس آزمون HSD در سطح اطمینان ۹۵% انجام شد. بیش‌ترین فعالیت ضد باکتریایی برگ در مرحلهٔ گل‌دهی مشاهده شد و در بیش‌تر موارد تفاوت معنی‌داری بین مرحلهٔ گل‌دهی و دو مرحلهٔ دیگر وجود داشت. از سوی دیگر در مورد بعضی از باکتری‌ها تأثیر ضدمیکروبی عصاره برگ به‌ویژه در مرحلهٔ گل‌دهی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تأثیر آنتی بیوتیک‌های مذکور و در مواردی مشابه با تأثیر آن‌ها بود. بنا بر این به نظر می‌رسد که بهترین زمان برای بهره‌برداری از خاصیت ضد باکتریایی برگ، مرحله گل‌دهی است. همچنین با توجه به فرایند مقاوم شدن برخی سویه‌ها به آنتی بیوتیک‌های سنتزی رایج، لزوم استفاده از ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی می‌تواند ارزشمند باشد که البته این امر پژوهش‌های دقیق‌تری را ایجاب می‌کند.

مقدمه

نوروزك گیاهی است از تیره نعناع که بومی استان خراسان و سمنان است[۱]. گزارش‌های مختلفی در ارتباط با خواص درمانی گیاه نوروزک وجود دارد. برای مثال، عصاره آبی برگ آن خواب‌آور بوده و دارای اثر شل‌کنندگی عضلانی است و از این نظر با دیازپام قابل مقایسه است[۲]. همچنین تاثیر ضدالتهابی جوشانده برگ

واژه‌های کلیدی: نوروزک، *Salvia leriifolia*، ضد باکتریایی، برگ.
دریافت ۸۸/۲/۷ پذیرش۸۸/۸/۲۷

۱.*Salvia leriifolia Benth* ۲.*Lamiaceae* ۳.*disc diffusion* ۴. *Escherichia coli*
۵. *Pseudomonas aeruginosa* ۶. *Staphylococcus aureus* ۷. *Klebsiella pneumonia*
۸. *Proteus mirabilis*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

گیاه، از نظر کارایی مشابه با داروی دیکلوفناك است[۳]. از سوی دیگرعصاره‌های آبی و الکلی دانه و برگ این گونه سبب کاهش قند خون می‌شود[۴] و از ایجاد و توسعه زخم‌های معده در موش جلوگیری می‌کند[۵]. عصاره‌های آبی و الکلی ریشهٔ گیاه نیز دارای خاصیت حفاظت عصبی در برابر کم خونی‌های موضعی[۱] در مغز موش است[۶].

ارزش دارویی گیاه نوروزک وابسته به متابولیت‌های ثانویه ازجمله ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و آلکالوئیدها است[۷]. خاصیت آنتی‌اکسیدان برگ و ریشهٔ گیاه نوروزك نیز در ارتباط با حضور متابولیت ثانویه از نوع چالکون‌ها به نام بوتئین است[۸]،[۹].

چالکون‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویهٔ گیاهی و پیش‌ساز طبیعی فلاونوئیدها هستند که فعالیت‌های ضد التهابی، ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد سرطانی آن‌ها مشخص شده است[۱۰]. خواص دارویی این ترکیبات عمدتاً از خصوصیات آنتی‌اکسیدانی آن‌ها ناشی می‌شود [۱۱].

گزارش‌هایی در مورد خواص ضد میکروبی عصارهٔ برگ و ریشهٔ نوروزك وجود دارد. اثر ضد میکروبی اسانس وعصارهٔ برگ نوروزك بر میکروارگانیسم‌های (*Staphylococcus aureusm, Bacillus subtilis,* *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa,Candida albicans*) بررسی شده است. در این بررسی عصارهٔ برگ بر(*Staphylococcus aureus* و*Escherichia coli*) تأثیر بازدارندگی داشته است. همچنین تأثیراسانس برگ گیاه بر(*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus,Candida albicans*) چشمگیر و به‌ویژه اثر آن بر (*Candida albicans*) با داروی ضد قارچ کلوتریمازول، که امروزه به‌طور وسیعی در درمان عفونت‌های کاندیدیایی استفاده می‌شود، قابل قیاس بوده است[۱۲]. اثر ضد میکروبی ریشه نوروزك نیز برهمین میکروارگانیسم‌ها بررسی شده است که بر(*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis,* *Pseudomonas aeruginosa*) تأثیر بازدارندگی داشته است[۱۳].

میزان و نوع مواد مؤثر موجود در گیاهان که عمدتاً متابولیت‌های ثانویه هستند، در طول دوره رشد ونمو گیاه تغییر می‌کند، بنا بر این طبیعی است که خواص دارویی گیاه که وابسته به حضور این ترکیبات است نیز دچار تغییر شود. براساس بررسی‌های صورت یافته، تا به حال گزارشی در مورد بررسی خاصیت ضد باکتریایی این گیاه، در ارتباط با مراحل مختلف رشد و نمو وجود ندارد. بنا براین، از آنجا که تحقیق در مورد بهترین مرحلهٔ رشد و نمو گیاه برای استفاده بهینه از خواص دارویی آن می‌تواند راهگشای استفاده مؤثرتر از این گیاه در داروسازی باشد، در این تحقیق فعالیت ضد باکتریایی برگ گیاه نوروزک در مراحل مختلف رشد و نمو بررسی شد، تا مناسب‌ترین زمان برای برداشت برگ گیاه برای استفاده از خواص ضد میکروبی آن مشخص شود.

۱.Cerebral ischemia

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

مواد و روش‌ها

۱. **تهیهٔ نمونهٔ گیاهی:** جمع‌آوری گیاه در سه مرحلهٔ مختلف از رشد و نمو، یعنی مرحلهٔ رشد رویشی (مرحلهٔ ۱)، مرحلهٔ گل‌دهی(مرحلهٔ۲) و مرحلهٔ رسیدگی بذر(مرحلهٔ۳) به‌ترتیب در زمان‌های ۲۷ اسفند ۱۳۸۴، ۲۷ فروردین و۲۶ اردیبهشت ۱۳۸۵از منطقه کبودان واقع در شمال شهرستان بردسکن (استان خراسان رضوی) که دور از دسترس دام بود، انجام شد و شناسایی گونه با هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد تأیید شد. بعد از هر بار جمع‌آوری، برگ‌ها به‌طور جداگانه در سایه خشك شدند و تا زمان انجام آزمایش در کیسهٔ کتانی نگهداری و سپس با آسیاب پودر شدند.

۲. **استخراج عصاره گیاهی:** برای استخراج عصارهٔ گیاهی از روش خیساندن[۱] استفاده شد. برگ‌های خردشده نوروزک درمدت يك شبانه‌روز با متانول خالص به نسبت ۱: ۱۰(وزنی: حجمی) روی شیکر در دمای اتاق عصاره‌گیری شد. عصارهٔ حاصل با کاغذ واتمن شمارهٔ ۴۲ صاف شد. بقایای گیاهی مجدداً با متانول به مدت يك شبانه‌روز دیگر با همان شرایط قبل تحت عملیات استخراج قرار گرفت و محلول صاف شده به عصارهٔ اولیه اضافه شد. عصارهٔ استخراجی با کربن فعال (۱ گرم کربن: ۵ گرم گیاه خرد شده) به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر در دمای اتاق رنگ‌بری و سپس با کاغذ واتمن شمارهٔ ۴۲ صاف شد تا محلول شفافی به رنگ قهوه‌ای به دست آید. عصارهٔ متانولی سپس به نسبت ۱:۷ تحت خلأ و دمای کم‌تر از ۴۰°C با دستگاه تبخیرگردان تغلیظ و سپس در دمای کم‌تر از۴۰°C و زیر هود تا حد خشکی تبخیر شد[۱۴].

۳. **تهیهٔ سوسپانسیون میکروبی:** میکروب‌های آزمایش شده از کشت‌های باکتری‌های تازه تهیه شده از بیماران بیمارستان امام‌رضا واقع در شهر مشهد تهیه شدند. باکتری‌های (*Klebsiella pneumonia, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Proteus mirabilis*) که در بیمارستان بر روی محیط‌های اختصاصی (Blood Agar و E.M.B) خالص‌سازی شده بودند، استفاده شدند. باکتری‌های خالص‌سازی شده برای به‌دست آوردن کلنی تک در محیط کشت (Nutrient Agar) کشت شده و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس کلنی تک هر میکروب در محیط کشت مایع (Nutrient broth) کشت شدند. برای هر سری آزمایش کشت تازه ۲٤ ساعته تهیه شد. برای این کار يك لوپ از هر میکروب در ۵cc محلول محیط کشت فوق تلقیح شد و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت. برای تهیهٔ سوسپانسیون میکروبی با پیپت پاستور استریل، مقداری ازاین سوسپانسیون به لوله‌های درپیچ‌دار استریل منتقل شد و سپس با افزودن نرمال سالین ۰/۹% و مقایسه کدورت آن با محلول ۰/۵ مك فارلند، سوسپانسیونی با غلظت تقریبی 10^8 میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر

۱.maceration

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

به‌دست آمد که از آن برای تلقیح استفاده شد [۱۵]. سپس دانسیتهٔ عصاره‌ها از طریق اندازه‌گیری وزن عصارهٔ خشك با ترازوی با دقت ۰.۱ میلی‌گرم و تقسیم بر حجم محلول عصاره اندازه‌گیری شد و pH هرکدام از آن‌ها با pH متر تعیین شد.

٤.**عملیات کشت و تهیه تیمارهای مختلف از عصاره‌ها:** باکتری‌های آزمایش شده در محیط کشت مولر-هینتون آگار کشت یك‌نواخت شدند برای بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های حاصل از برگ در سه مرحلهٔ مختلف از رشد و نمو از روش دیسک دیفوزیون استفاده شد. غلظت‌های ۵،۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر از عصارهٔ خشک با کمك آب مقطر استریل تهیه شد. در غلظت ۲۰ گرم در لیتر pH عصاره در مراحل رویشی، گلدهی و رسیدگی بذر به ترتیب ٤/۹۲، ٥/۱۲و٥/۳٤ و دانسیتهٔ آن‌ها نیز به‌ترتیب ۰/۹۸٤، ۰/۹۸۲ و ۰/۹۸٥ بود. سپس دیسك‌های بلانك با قطر ٦/٥ میلی‌متر به مدت نیم ساعت در محلول عصاره در شرایط استریل خیسانده شدند و روی کشت باکتری‌ها قرار گرفتند. از دیسك‌های خیسانده شده در آب مقطر به‌عنوان شاهد منفی و از دیسك‌های آمادهٔ آنتی بیوتیك‌های تتراسایکلین (غلظت ۳۰ میکروگرم)، پنی‌سیلین (غلظت ۱۰ واحد) و آمپی‌سیلین (غلظت ۱۰ میکروگرم) به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. پتری‌ها ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفتند و سپس قطرهالهٔ ممانعت از رشد میکروب‌ها اندازه‌گیری شد.

٥- **تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:** تمام آزمایش‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ارزیابی داده‌ها با نرم افزار آماری JMP و اختلاف میانگین‌ها با آزمون Tukey)HSD) در سطح اطمینان ۹۵% انجام شد و نمودارها با نرم افزار Exell رسم شدند.

نتایج

الف) تأثیر غلظت‌های مختلف از عصاره (در هر یک از مراحل رشد و نمو) بر هر یک از باکتری‌ها: آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که در مواردی تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌های قطر هالهٔ ممانعت از رشد حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره برگ (۵،۱۰،۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر) که درسه مرحلهٔ مختلف از دورهٔ زندگی گیاه برداشت شد، مشاهده می‌شود(جدول‌های ۱تا۳).

بررسی قطر هالهٔ ممانعت از رشد حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره برگ در هر یك از مراحل رشد و نمو بر روی هر باکتری و سپس مقایسهٔ باکتری‌ها با هم نشان داد که غلظت ۱۵ گرم در لیتر مناسب ترین غلظت برای بازدارندگی از رشد برای همهٔ باکتری‌ها است. بنا بر این در مراحل بعد برای مقایسهٔ اثر بازدارندگی عصاره بین باکتری‌های مختلف این غلظت استفاده شد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

جدول ۱. مقایسه میانگین قطر هالهٔ ممانعت از رشد پنج باکتری مختلف که تحت تأثیرغلظت‌های مختلف از عصارهٔ برگ در مرحلهٔ رویشی ایجاد شدند. داده‌های دارای حروف مشترك برای هر باکتری از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند (داده‌ها میانگین سه تکرار است)

g/lعصارهٔ برگ در مرحلهٔ رویشی	قطر هالهٔ ممانعت از رشد (mm)				
	S. aureus	*P.mirabilis*	*E. coli*	*P. aeroginosa*	*K. pneumoniae*
۵	^{a}۸/۳	^{b}۷/۳	^{a}۷/۳	^{a}۶/۵	^{a}۸/۳
۱۰	^{a}۹/۶	^{a}۱۰/۶	^{a}۷/۶	^{a}۶/۵	^{a}۹
۱۵	^{a}۹/۵	^{a}۱۱	^{a}۸	^{a}۶/۵	^{a}۸/۳
۲۰	^{a}۹/۶	^{a}۱۰/۱	^{a}۷	^{a}۶/۵	^{b}۶/۵
شاهد متانول	^{a}۶/۵	^{a}۶/۵	^{a}۶/۵	^{a}۶/۵	^{a}۶/۵

جدول ۲. مقایسه میانگین قطر هالهٔ ممانعت از رشد پنج باکتری مختلف که تحت تأثیرغلظت‌های مختلف از عصارهٔ برگ در مرحلهٔ گل‌دهی ایجاد شدند. داده‌های دارای حروف مشترك برای هر باکتری از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند (داده‌ها میانگین سه تکرار است)

عصارهٔ برگ در مرحلهٔ گل‌دهی(g/l)	قطر هالهٔ ممانعت از رشد (mm)				
	S.aureus	*P. mirabilis*	*E. coli*	*P. aeroginosa*	*K. pneumoniae*
۵	۱۰/۱^{a}	۹/۳۳^{b}	۹/۳۳^{a}	۶/۵^{b}	۸^{b}
۱۰	۱۳/۲^{a}	۱۲/۲^{a}	۸/۶۶^{a}	۹^{a}	۹/۳^{b}
۱۵	۱۵/۴^{b}	۱۱/۳^{a}	۹/۳۳^{a}	۸/۳^{a}	۱۰/۶^{a}
۲۰	۱۶/۵^{b}	۱۳/۳^{a}	۹/۶۶^{a}	۸/۶^{a}	۱۲/۳^{a}
شاهد متانول	۶/۵^{a}	۶/۵^{a}	۶/۵^{a}	۶/۵^{a}	۶/۵^{a}

جدول ۳. مقایسهٔ میانگین قطر هالهٔ ممانعت از رشد پنج باکتری مختلف که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف از عصارهٔ برگ در مرحلهٔ رسیدگی بذر ایجاد شدند. داده‌های دارای حروف مشترك برای هرباکتری از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند (داده‌ها میانگین سه تکرار است)

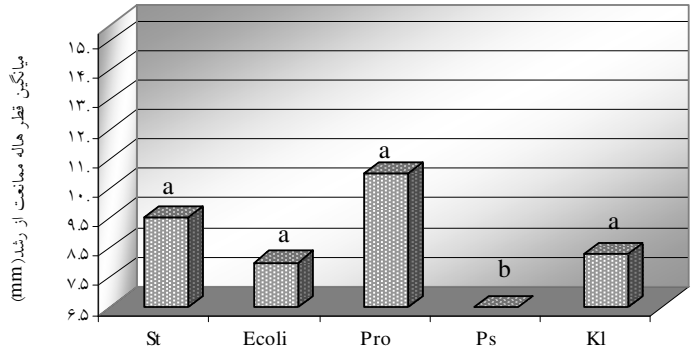
عصارهٔ برگ در مرحلهٔ رسیدگی بذر(g/l)	قطر هالهٔ ممانعت از رشد (mm)				
	S. aureus	*P. mirabilis*	*E. coli*	*P. aeroginosa*	*K. pneumoniae*
۵	۸/۶^{b}	۸/۳^{a}	۷^{a}	۶/۵^{a}	۶/۵^{a}
۱۰	۹^{b}	۸/۶^{a}	۷/۳^{a}	۶/۵^{a}	۶/۵^{a}
۱۵	۸/۳^{b}	۸^{a}	۷^{a}	۶/۵^{a}	۶/۵^{a}
۲۰	۱۲/۳^{a}	۸^{a}	۷^{a}	۶/۵^{a}	۶/۵^{a}
شاهد متانول	۶/۵^{a}	۶/۵^{a}	۶/۵^{a}	۶/۵^{a}	۶/۵^{a}

ب) مقایسهٔ اثرممانعت از رشد عصارهٔ برگ (۱۵ گرم در لیتر) در مرحلهٔ رویش بر پنج باکتری مختلف با یکدیگر: آنالیز داده‌ها نشان داد که غلظت ۱۵ گرم در لیتر از عصارهٔ برگ در مرحلهٔ رویشی بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر *اس. آئروس*[۱] و *پ. میرابیلیس*[۲] داشته است و پس از این دو *ک. پنومودیا*[۳] و *ای. کولی*[۴] حساسیت کم‌تری نسبت به این غلظت از عصاره نشان دادند که پاسخ این چهار باکتری نسبت به هم تفاوت معنی‌داری نداشت. این عصاره بر *پ. آئروجینوسا*[۵] اثر بازدارندگی نداشت(جدول۱ و نمودار۱). با توجه به آنالیز آماری داده‌ها اثر بازدارنده عصاره برگ در مرحله رویش برای باکتری‌های *اس. آئروس*، *پ. میرابیلیس*، *ک. پنومودیا* مساوی بوده و اثر بر آن‌ها به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از اثر بر *پ. آئروجینوسا* بوده است.

۱. *S. aureus* ۲. *P. mirabilis* ۳. *K. pneumonia* ۴. *E. coli* ۵. *P. aeruginosa*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

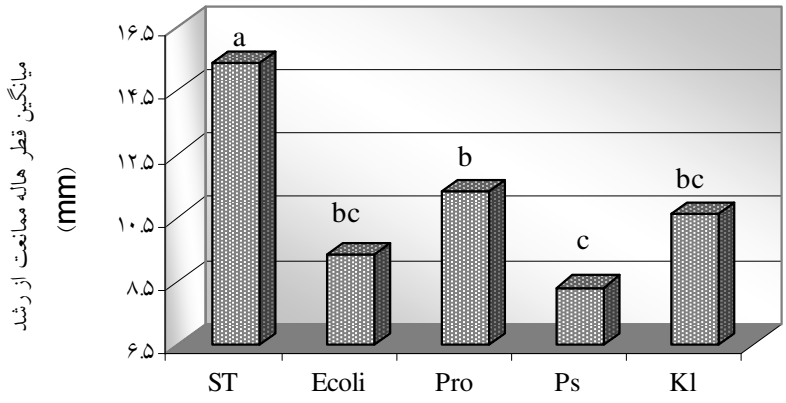
به‌طور کلی حساس‌ترین باکتری به غلظت ۱۵ گرم در لیتر از عصارهٔ برگ در این مرحله *اس. آئروس* و مقاوم ترین *پ. آئروجینوسا* است.



نمودار۱. مقایسهٔ اثر باز دارندگی عصارهٔ برگ (غلظت۱۵۰۰۰) در مرحلهٔ رویشی برپنج باکتری مختلف با یکدیگر(ستون‌های دارای حروف مشترك از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند).

Kl= *K.pneumoniae* **Ps=** ***P. aeruginosa*** **Pro =** ***P.mirabilis*** **St=** ***S. au****reus*

پ) مقایسهٔ اثر ممانعت از رشد عصارهٔ برگ (۱۵ گرم در لیتر) در مرحلهٔ گل‌دهی بر پنج باکتری مختلف با یکدیگر: مقایسه میانگین‌های قطر هالهٔ ممانعت از رشد و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها مشخص کرد اثر بازدارندگی غلظت ۱۵ گرم در لیتر از عصارهٔ برگ در مرحلهٔ گل‌دهی بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر *اس. آئروس* داشت که تفاوت آن با همه باکتری‌ها معنی‌دار بود و پس از آن بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر(*P. mirabilis* و *K. pneumoniae* و *E. coli*) داشت که تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند(جدول۲ و نمودار۲).



نمودار۲: مقایسهٔ اثر باز دارندگی عصاره برگ(غلظت۱۵۰۰۰) در مرحلهٔ گل‌دهی برپنج باکتری مختلف با یك‌دیگر (ستون‌های دارای حروف مشترك از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).

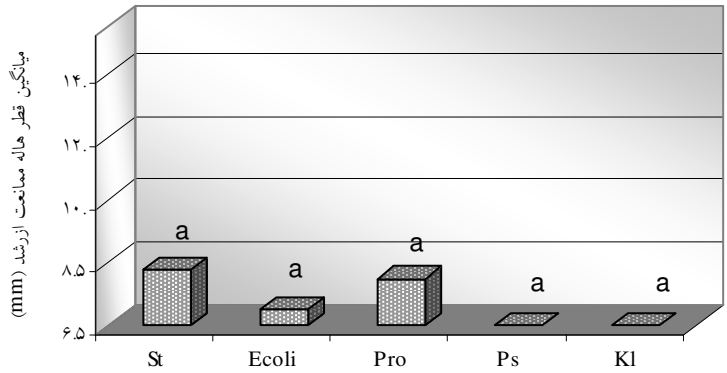
Kl= ***K. Pneumoniae*****. Ps=** ***P. aeruginosa*** **Pro =** ***P.mirabilis*** **St=** ***S. aureus***

با توجه به آنالیز آماری داده‌ها اثر بازدارندهٔ عصارهٔ برگ در مرحلهٔ گل‌دهی بر رشد *اس. آئروس* بیش‌تر از دیگر باکتری‌ها بوده است.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

به‌طور کلی حساس‌ترین باکتری به غلظت۱۵ گرم در لیتر از عصارهٔ برگ در این مرحله *اس. آئروس* و مقاوم ترین *پ. آئروجینوسا* است.

ت) مقایسهٔ اثر ممانعت از رشد عصارهٔ برگ در مرحلهٔ رسیدگی بذر بر پنج باکتری مختلف با یکدیگر: آنالیز داده‌ها نشان داد که غلظت۱۵ گرم در لیتر از عصارهٔ برگ در مرحلهٔ رسیدگی بذر بیش‌ترین اثر بازدارندگی را به ترتیب روی (*S. aureuse* و *P. mirabilis*) داشت که بین آن‌ها و پاسخ دیگر باکتری‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت(جدول ۳ و نمودار۳). با توجه به آنالیز آماری داده‌ها اثر بازدارنده عصارهٔ برگ در مرحلهٔ رسیدگی بذر برای همهٔ باکتری‌ها یکسان بوده است. به‌طور کلی، حساس‌ترین باکتری به غلظت ۱۵ گرم در لیتر از عصارهٔ برگ در این مرحله (*S. aureus* و*P. Mirabilis*) و مقاوم‌ترین (*P. aeruginosa* و *K. Pneumoniae*) است که این عصاره بر این دو باکتری اثری نداشت

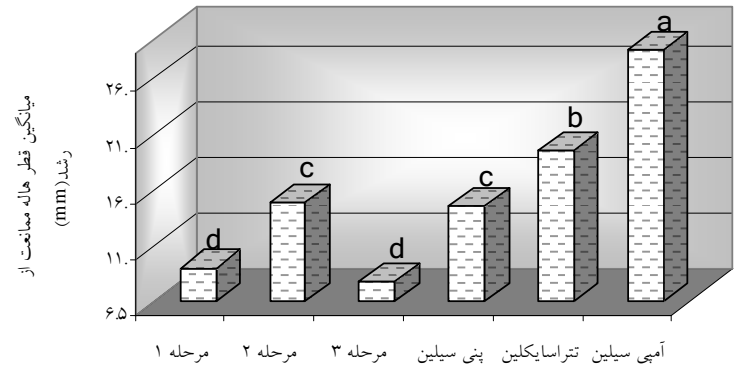


نمودار۳: مقایسهٔ اثر باز دارندگی عصارهٔ برگ(غلظت۱۵۰۰۰) در مرحلهٔ رسیدگی بذر بر پنج باکتری مختلف با یکدیگر (ستون‌های دارای حروف مشترك از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).
Kl=*K. Pneumoniae* Ps=*P. aeruginosa* Pro =*P.mirabilis* St=*S. aureus*

ث) بررسی تأثیر مراحل رشد برخاصیت ضد باکتریایی عصارهٔ برگ: مقایسهٔ تأثیر بازدارنده عصارهٔ برگ که در سه مرحلهٔ مختلف از رشد و نمو گیاه برداشت شده بود نشان داد که برای همه باکتری‌های بررسی شده، بیش‌ترین اثر بازدارندگی مربوط به مرحلهٔ گل‌دهی بود که در اغلب موارد با سایر مراحل زندگی گیاه تفاوت معنی‌داری داشت (نمودارهای ۴ تا ۸). در مورد باکتری‌های (*P. mirabilis* و *E. coli*) اگرچه اثر بازدارندگی عصارهٔ برگ در مرحلهٔ گل‌دهی بیش‌تر از مرحلهٔ رویش بود ولی تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار نبود.

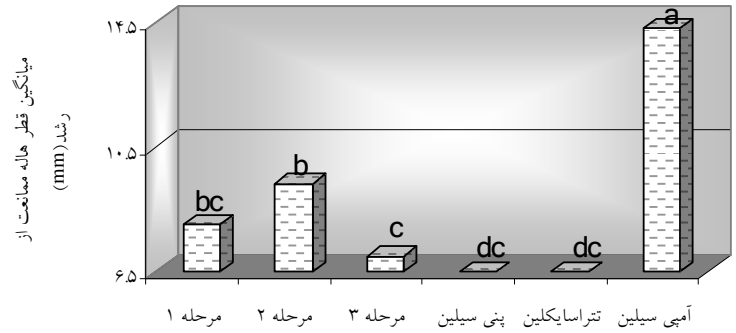
ج) مقایسهٔ تأثیر ضد باکتریایی عصارهٔ برگ در مراحل مختلف رشد و نمو با تأثیر بازدارنده آنتی بیوتیك‌ها: تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها نشان داد که اثر بازدارندگی عصارهٔ برگ در مرحلهٔ گل‌دهی بر(*S.aureus*) با اثربازدارندگی پنیسیلین مشابه بود(نمودار۴).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]



نمودار۴. مقایسهٔ اثر بازدارندگی عصاره برگ(ppm غلظت ۱۵۰۰۰) در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی بیوتیک‌ها بررشد باکتری (*S. Aureus*)(ستون‌های دارای حروف مشترك از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).

در مورد باکتری (*E.coli*)، تأثیر بازدارنده عصارهٔ برگ در مرحلهٔ گل‌دهی با اثر آمپی‌سیلین تفاوت معنی‌داری داشت ولی تأثیر عصاره در مرحله رویش و گل‌دهی از اثر تتراسایکلین و پنی سیلین که بر این باکتری اثر بازدارندگی نداشتند، بیش‌تر بود(جدول‌های ۱،۲،۳و۴ و نمودار ۵).



نمودار۵: مقایسهٔ اثر بازدارندگی عصارهٔ برگ(غلظت ۱۵ گرم در لیتر)در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی بیوتیک‌ها بر رشد باکتری (*E.coli*) (ستون‌های دارای حروف مشترك از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند)

جدول ۴- میانگین قطر هالهٔ ممانعت از رشد باکتری‌ها در اثر آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین،آمپی سیلین و تتراسایکلین(داده‌ها میانگین سه تکرار است)

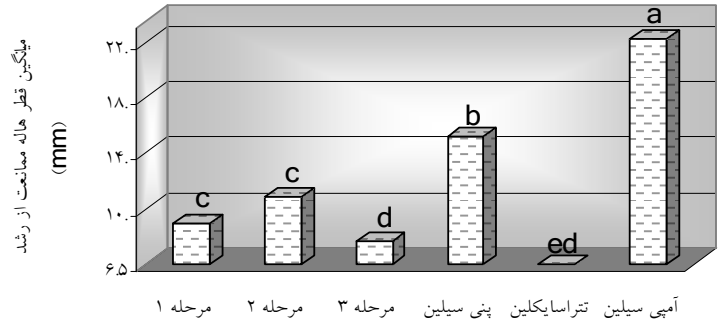
نوع آنتی بیوتیك	قطرهالهٔ ممانعت از رشد (mm)				
	S. aureus	*P. mirabilis*	*E. coli*	*P. aeroginosa*	*K. pneumoniae*
پنی سیلین	۱۵	۱۵/۶۷	۶/۵	۶/۵	۶/۵
آمپی سیلین	۲۹	۲۲/۶۷	۱۴/۳۳	۶/۵	۶/۵
تتراسایکلین	۲۰	۶/۵	۶/۵	۶/۵	۱۳/۲۵

برای باکتری(*P.mirabilis*) اثربازدارندگی آمپی‌سیلین وپنی سیلین به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از عصارهٔ برگ در مرحلهٔ رویش و گل‌دهی بود، در حالی که اثر بازدارندگی عصارهٔ برگ در این دو مرحله از اثر تتراسایکلین که بر این باکتری اثری نداشت، بیش‌تر بود(جدول‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ و نمودار ۶).

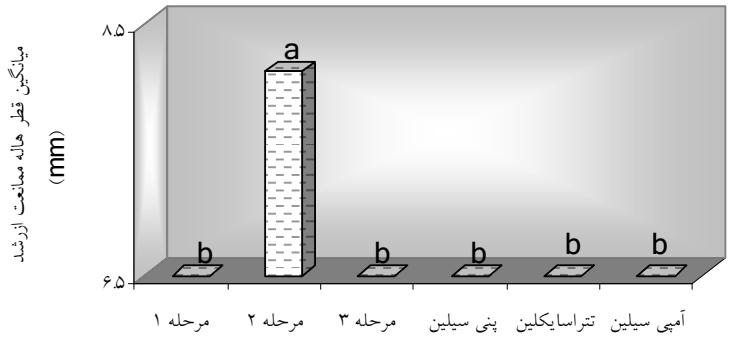
در مورد (*P.aeruginosa*) نتایج حاصل از آنالیز میانگین‌های قطر هالهٔ ممانعت از رشد در مورد اثر عصارهٔ برگ در مراحل مختلف رشد و نمو نشان داد که تنها عصارهٔ برگ در مرحلهٔ گل‌دهی بر(*P.aeruginosa*)

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

اثر بازدارندگی داشت. عصارهٔ مرحله رویشی و مرحلهٔ رسیدگی بذر اثر بازدارندگی بر این باکتری نداشتند. همچنین هیچ‌یک از آنتی بیوتیک‌ها اثر بازدارندگی بر این باکتری نداشتند(.جدول‌های۱،۲،۳و۴ ونمودار ۷).

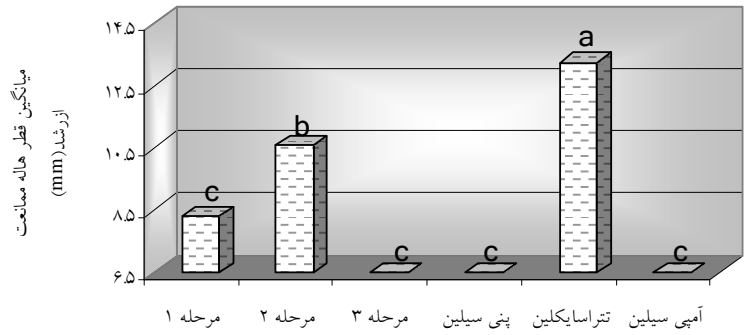


نمودار۶: مقایسهٔ اثر بازدارندگی عصارهٔ برگ(غلظت ۱۵ گرم در لیتر) در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی بیوتیک‌ها بر رشد باکتری *(P.mirabilis)*(ستون‌های دارای حروف مشترك از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند).



نمودار۷: مقایسه اثر بازدارندگی عصاره برگ(غلظت ۱۵ گرم در لیتر)در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی بیوتیک‌ها (ستون‌های دارای حروف مشترك از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند)(*P.aeruginosa*) بررشد باکتری

عصارهٔ برگ در مرحلهٔ رویشی و مرحلهٔ گل‌دهی روی (*K. Pneumoniae*) اثر بازدارندگی داشت. ولی در مرحلهٔ رسیدگی بذر بر این باکتری اثری نداشت. اثر بازدارندگی تتراسایکلین ازعصارهٔ برگ در همهٔ مراحل رشد و نمو به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود. ولی تأثیر عصارهٔ برگ در مرحلهٔ گل‌دهی از پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین که بر این باکتری اثربازدارندگی نداشتند، بیش‌تر بود(.جدول‌های۱، ۲، ۳ و ۴ و نمودار۸).



نمودار۸: مقایسه اثر بازدارندگی عصاره برگ(غلظت ۱۵ گرم در لیتر)در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی بیوتیک‌ها بررشد باکتری(*K. pneumoniae*) (ستون‌های دارای حروف مشترك از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند) ستون‌های دارای حروف مشترك از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

بحث

در زمینهٔ خواص ضد میکروبی جنس *سالویا*[۱] گزارش‌های متعددی وجود دارد. برای مثال *اس.لانیژرال*[۲] به علت داشتن ماده‌ای به نام لانیژرال دارای اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های گرم مثبت است[۱۶]. فعالیت ضد میکروبی برای عصارهٔ برگ و گل (*S. partensis, S. glutinosa, S. acthapis, S. substitus, S. Officinalis*) نیز گزارش شده است[۱۷]،[۱۸]،[۱۹][۲۰]. گالکین[۳] و همکاران (۲۰۰۴) اثر ضد میکروبی قوی (*Salvia sclarea* را بر *S. aureus*) و انواع دیگری از باکتری‌ها نشان دادند[۲۱]. اگر چه تحقیقات انجام شده بر روی گونه‌های مختلف جنس سالویا و گیاه نوروزك اثبات کرده است که ریشه و برگ این گیاهان دارای خواص ضد میکروبی هستند؛ ولی در هیچ یک از این تحقیقات مشخص نشده است که آیا این خاصیت در مراحل مختلف رشد و نمو تغییر می‌کند و در این صورت در کدام مرحله از مراحل رشد و نمو گیاه، بیش‌ترین خاصیت ضد میکروبی در ریشه و برگ وجود دارد.

تحقیق حاضر با هدف پاسخ‌گویی به این پرسش مهم صورت گرفت و نشان داد که عصارهٔ برگ در مرحلهٔ گل‌دهی بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر تمام باکتری‌های آزمایش شده داشت که در بیش‌تر موارد با عصارهٔ برگ در مرحلهٔ رویش و رسیدگی بذر تفاوت کاملاً معنی‌داری را نشان داد. تأثیر عصارهٔ برگ در همهٔ مراحل بر اس. آئروس شدیدتر بود واثر بازدارندگی عصاره برگ در مرحلهٔ گل‌دهی بر اس. آئروس با تأثیر آنتی‌بیوتیك پنی‌سیلین قابل قیاس بود. همچنین این عصاره بر پ. *آئروجینوسا* اثر بازدارندگی داشت در حالی‌که هیچ یک از آنتی‌بیوتیك‌ها تأثیری بر آن نداشتند. اثر بازدارندگی عصارهٔ برگ برروی باکتری‌ها با تحقیق ولیکویک[۴] [۲۲] مطابقت دارد. بر اساس تحقیقات وی با استفاده از روش *دیسک دیفوزیون* عصارهٔ برگ (*S.officinalis*) روی (*S. aureus*، *E. coli* و *P. aeruginosa*) اثر بازدارندگی دارد. در بررسی‌های انجام شده بر روی عصارهٔ برگ گونه (*S.aucheri*) دیگراک[۵] در سال ۱۹۹۹[۲۳] اثر ضدباکتریایی آن روی (*S.aureus* و *P.mirabilis*) گزارش کرد در صورتی‌که بر (*E. coli* و *P. aeruginosa* و *K. pneumonia*) اثری نداشت. باغی (۱۳۷۵) نیز گزارش داد که برگ نوروزک روی (*S. aureus* و *E. coli*) اثر بازدارنده دارد.

بر اساس گزارش طباطبایی یزدی چهار دسته ترکیبات شیمیایی مهم گیاهی شامل آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها وتانن‌ها در این گیاه وجود دارد. اگر برای نشان دادن وجود و مقدار هر یك از مواد ذکر شده از علائم (+) تا(++++) استفاده شود، برگ گیاه نوروزك حاوی آلکالوئید به میزان(+)، ساپونین(+++)، فلاونوئید (++) وتانن(++) است. در اسانس این گیاه ۱۷ نوع ترپن با درصدهای متفاوت وجود دارد. ترکیبات بورنئول با ۲۶%، ایونول با ۱۵% و ۱،۸-سینئول با ۹% بیش‌ترین سهم را دارند[۷].

---

۱. Salvia ۲. *S. lanigeral* ۳. Gulcin ۴. Velickovic ۵. Digrak

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

گزارش‌هایی در مورد خاصیت آنتی اکسیدانی برگ و ریشهٔ نوروزك وجود دارد. همچنین ارتباط این خاصیت با وجود ماده بوتئین از ترکیبات فلاونوئیدی (چالکونی) به اثبات رسیده است [۸]،[۹]. تحقیقات نشان داده است که برخی چالکون‌ها دارای‌خواص دارویی، از جمله فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی هستند[۲۴]. بنا بر این احتمال دارد که خاصیت ضد میکروبی برگ این گیاه مربوط به وجود ترکیبات فلاونوئیدی در آن باشد. گزارش‌هایی دال بر تأثیر بازدارندگی قوی ترکیبات فلاونوئیدی بر روی باکتری‌های گرم مثبت وجود دارد[۲۵]. همچنین حبیبی وهمکاران در سال۱۳۷۷ ترکیب فلاونوئیدی ۵-هیدروکسی ۴ و۶و۷-تری‌متوکسی فلاون(I) را از نوروزك استخراج و ساختار آن را شناسایی کرده‌اند[۲۶]. بنا بر این تأثیر عصاره‌های برگ برروی باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus*) منطقی به‌نظر می‌رسد. اثر بازدارندگی قوی بر باکتری‌های گرم‌مثبت می‌تواند ناشی از آن باشد که ساختمان دیوارهٔ سلولی باکتری‌های گرم منفی در قسمت خارجی شامل یك لایه پلی‌ساکارید و پروتئین است که با جاذبهٔ هیدروفوبیکی اتصال دارند، در حالی‌که باکتری‌های گرم‌مثبت فاقد این ساختمان هستند[۱۵]. تغییر خاصیت ضد میکروبی برگ در مراحل مختلف رشد ونمو می‌تواند به دلیل تغییر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی یا اشکال فعال آن‌ها از نظر خاصیت ضد میکروبی باشد به این ترتیب احتمالاً در مرحلهٔ رویشی در برگ ترکیبات فلاونوئیدی و یا سایر ترکیبات ضد میکروبی ناچیز است و به تدریج تا رسیدن به مرحلهٔ گل‌دهی مقدار این ترکیبات به حداکثر خود می‌رسد و سپس در طی رسیدگی بذر مجدداً کاهش می‌یابد. این کاهش می‌تواند ناشی از تجزیه متابولیت‌های ثانویه به حد واسطهای متابولیك ساده اولیه باشد[۲۷]. از آن‌جا که برگ در مرحلهٔ رویش تأثیر بازدارندگی زیادی روی دو باکتری (*P. mirabilis* و *E. coli*) داشته است و از طرف دیگر اثبات شده است که برگ در این مرحله فاقد خواص آنتی‌اکسیدانی است[۲۸]، بنا بر این احتمالاً مواد ناشناختهٔ دیگری که فاقد خواص آنتی‌اکسیدانی ولی واجد خواص ضد میکروبی هستند، در برگ این گیاه وجود دارند که تا مرحلهٔ گل‌دهی افزایش می‌یابند ولی در مرحلهٔ رسیدگی بذر کاهش چشمگیری پیدا می‌کنند. بر اساس نتایج تحقیق حاضر به‌نظر می‌رسد که بهترین زمان بهره‌برداری از خاصیت ضدمیکروبی برگ نوروزك مرحله گل‌دهی (اواخر فروردین تا اوایل اردیبهشت) باشد.

از سوی دیگر در این بررسی مشخص شد که سویه‌های وحشی بررسی شده که مستقیما از بیماران تهیه شده بودند، نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌های بررسی شده مقاوم هستند، برای مثال پنی‌سیلین و تتراسایکلین بر روی (*E.coli*) و پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین بر روی (*K. pneumonia*) بی‌اثر بودند و همچنین هر سه آنتی‌بیوتیک مذکور بر(*P. aeruginosa*) هیچ تأثیری نداشتند، در حالی که عصارهٔ برگ که در مرحلهٔ گل‌دهی برداشت شده بود بر روی این باکتری کاملا مؤثر بود. بنا بر این به‌نظر می‌رسد که با توجه به فرایند مقاوم شدن برخی سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی رایج، لزوم استفاده از ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی که برای مثال در عصارهٔ برگ

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

مرحلهٔ گل‌دهی این گیاه وجود دارد، ارزشمند باشد، که البته این امر پژوهش‌های دقیق‌تر وکامل‌تری را ایجاب می‌کند.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر تأمین هزینه مالی این پژوهش وهمچنین از همکاری سرکار خانم پردلی در آزمایشگاه میکروبیولوژی تشکر وقدردانی می‌شود.

منابع

1. K.H. Rechinger. Flora Iranica. N.150,*Academishe Druk.u.Verlag sustalt* Gratz (1982) 439.

2. H. Hosseinzadeh and P. Lary, *The effect of Salvia leriifolia Benth root extracts on morphine dependence in mice.* Phytotherapy Research, 14(5) (2000) 384-387.

3. H. Hosseinzadeh and M.Yavary, *Anti-inflammatory effect of Salvia leriifolia Benth leaf extract in mice and rat*.Pharmaceutical and Pharmacological Letters, 9(2)(1999) 60-61.

٤-حسین شکوهی زاده، *مطالعه اثرات پایین آورندگی قند خون برگ ودانه نوروزك بر موش سفید کوچك*، پایان‌نامه برای دریافت دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی, دانشگاه علوم پزشکی مشهد(١٣٧٥).

5. H. Hosseinzadeh, M.H. Haddad Khodaparast and E.Hosseini, *Anti-ulcer effect of Salvia leriifolia Benth leaf extract in mice*. Pharmaceutical and Pharmacological Letters, 10(2) (2000) 63-64.

6. H.R. Sadeghnia, M. Nassiri Asl, M.H. Haddad Khodaparast and H. Hosseinzadeh, *The effect of Salvia leriifolia Benth root extracts on lipid peroxidation during global ischemic-reperfusion in rats*. Journal of Medicinal Plants (2003) 7: 19-28.

٧. فروزان طباطبائی یزدی، *بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس وعصاره برگ گیاه نوروزك و شناسایی فیتوشیمیایی آن*. پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته شیمی (١٣٧٤) ٧٨ -٧٥.

8. M.H. Hadad Khodaparast, A. Haghdoost, A.H. Elhami-Rad, G. Movahhed and H. Karazhi-yan, *Antioxidant activity and thermal Properties of salvia leriifolia (Norozak) root extract*. Proceedings of the international conference on Innovations in Food and Bioprocess Technologies, 12-14 December 2006, AIT, Pathumthani, Thailand, (2006) 378.

٩. رضا فرهوش، *استخراج، تخلیص و شناسایی فراکسیون عمده آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه نوروزک و بررسی خصوصیات آن*. پایان نامه دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد(١٣٨٢).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

10. R.J. Anto, K. Sukumaran, G. Kutta, M.N.A. Rao, V.Subbaraju, and R. Kuttan, *Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds*. Cancer Letters, 9 (1995) 33-37.

11. L. Larson, *The antioxidants of higher plants.* Phytochemistry, 27(1998) 969-978.

۱۲. نرگس باغی، *بررسی اثرات ضد میکروبی گیاه نوروزك*. پایان‌نامه برای دریافت دکترای داروسازی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، (۱۳۷۵)۳٤-۳۱.

۱۳. مهنوش جبارزاده، *بررسی خواص ضد میکروبی عصاره‌های ریشه و دانهٔ گیاه نوروزك*. پایان‌نامه برای دریافت دکترای داروسازی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد،(۱۳۷۸)٥٦-٥٤.

14. J.W. Wu, M.H. Lee, C.T. Ho, and S.S. Chang, *Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary*. Journal of American Oil Chemistries Society, 59 (1982) 339-345.

15. E.Jawetz and J.L. Melnick. *Medical microbiology*. 19th ed. (1991)145-155.

16. E.L. Eakany, M. Abdalla, K.M. Abdel, N.N. Abri, R.Frank and Z. Stermit, *Lanigerola new antimicrobial icetexane diterpen from Salvia lanigera*. Planta med. Vol. 61(1995) 559-560.

17. S.U. Savelev, E.J. Okeiio, and E.K. Perry, *Butyryl and acetyl-cholinesterase inhibitory activities inessential oils of Salvia species and their constituents*. Phytotherapy Res. Vol.18 (2004) 315-324.

18.T. Gulcin, I. Uguz, M.M. Oktay, S. Beydemiv and O.I. Kufrevioglu, *Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of alary sage (Salvia sclarea L.),*Turk. J. Agric. Vol.28 (2004) 25-33.

19. S. Weckesser, E. Engel, B. Simon-Haarhaus, A. Wittmer, K. Pelz, CM. Schmepp. *Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance*. Phytomedicine.Vol.14 (2007) 7-8.

20. B. Bozin, N. Mimica-Dukic, I. Samojlik, J, Emilija, *Antimcrobial and antioxidant properties of rosmary and sage rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae) Essential oils*. J Agric Food Chem.Vol. 19(2007) 7879-7885.

21. D. MITIĆ, B. VUKOVIĆ-GAČIĆ, J. KNEŽEVIĆ-VUKČEVIĆ, S. STANKOVIĆ and D. SIMIĆ, *Comparative study on the antibaCterial aCtivity of volatiles from sage (Salvia officinaliS.L)*. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 57 (2005) 173-178.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]

22. D.T. Velickovic, M.S. Ristic and A.S. Velickovic, *Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol extract of Salvia pratensis L., Salvia glutinosa L. and Salvia aethiopis L.*, J Serb. Chem. soc. Vol. 67(2002) 639-646.

23. M. Digrak, A. Ilcim, M. H Alma and S. Sen, *Antimicrobial activities of the extract of varius plants (valex, mimosa bark, gallnut powder, Salvia sp. and Phlomis sp.)*Tr.j.Biology. Vol.23 (1999) 241-248.

24. S. Keiichi, T. Tetsuya, H. Fumio and S.Yusuke, In vitro propagation of sterile mutant strains in Japanese morning glory by sub-culturing embroils derived from an immature embryo. J of the Japanese Society for Horticultural Science. Vol. 74 (2005) 311-317.

25. R. Inatani, N. Nakatani and H. Fuwa, *Antioxidant effect of the constituents of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) and their derivatives*. Agric. Biol. Chem. Vol. 47(1983) 521-528.

۲۶. زهره حبیبی، عبدالحسین روستائیان، *بررسی شیمیایی سالویا لریفولیا*. مجموعهٔ خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره شیمی ومهندسی شیمی ایران – شیمی آلی، دانشگاه تهران (۱۳۷۷) ۲۵.

۲۷. ل. تایز و ا. زایگر. *فیزیولوژی گیاهی* جلد دوم. ترجمه محمد کافی. و اسکندر زند(۱۳۷۹)۸٤.

۲۸. معصومه مدرس، *مطالعه رویدادشناسی (phenology) و برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نوروزک (salvia leriifolia Benth)*. پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد(۱۳۸۶).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-23]