

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های مریم گلی ایرانی و مریم گلی آذربایجانی بر شش سوش میکروبی گرم مثبت و گرم منفی

دکتر محمدحسن مصحفی^۱، دکتر میترا مهربانی^۲ و دکتر حکیمه ذوالحسب^۳

خلاصه

در این تحقیق اثرات ضد میکروبی اسانس مریم گلی ایرانی و مریم گلی آذربایجانی بر روی شش سوش میکروبی استاندارد گرم مثبت و گرم منفی به روش‌های بیواتوگرافی تعلیقی، سیلندر- پلیت و رقت - لوله مورد بررسی قرار گرفت. در روش بیواتوگرافی تعلیقی اسانس مریم گلی ایرانی و آذربایجانی به طریقه تقطیر با آب تهیه شد و اجزاء متشکله آنها توسط سیستم حلال تولوئن - اتیل استات (۷-۹۳) بر روی پلیت‌های آماده سیلیکاژل به روش TLC مجزا گردید. در روش سیلندر- پلیت و رقت- لوله، عصاره آبی و متانولی گیاهان فوق را به روش خیساندن تهیه نموده و پس از تبخیر حلال، عصاره‌ها با غلظت‌های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵ و ۱/۵۶۲ میلی گرم در میلی لیتر با کمک حلال آب مقطر تهیه شد. آنگاه اثرات ضد میکروبی بررسی شد. با استفاده از روش بیواتوگرافی، اسانس مریم گلی ایرانی روی اشرشیاکلی، استافیلوکوک طلائی، کلبسیلا پنومونیه، پسودومونا آئروژینوزا، باسیلوس سابتیلیس و اسانس مریم گلی آذربایجانی روی اشرشیاکولی، استافیلوکوک طلائی، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و باسیلوس سابتیلیس اثرات ضد میکروبی نشان دادند. MICهای به دست آمده بر حسب mg/ml عصاره در مورد اشرشیاکولی، استافیلوکوکوس آرئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، کلبسیلا پنومونیه، پسودومونا آئروژینوزا و باسیلوس سابتیلیس به ترتیب در عصاره آبی مریم گلی ایرانی عبارت بود از ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۲۵، ۶/۲۵، ۵۰، ۶/۲۵ و در مورد عصاره متانولی آن به ترتیب ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۳/۱۲۵ بود. در مورد عصاره آبی مریم گلی آذربایجانی ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، بی اثر، بی اثر، ۳/۱۲۵ و در مورد عصاره متانولی آن به ترتیب ۳/۱۲۵، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، بی اثر، بی اثر و ۳/۱۲۵ بود. انواع عصاره و اسانس مریم گلی آذربایجانی هیچ اثر ضد میکروبی روی کلبسیلا پنومونیه و پسودومونا آئروژینوزا از خود نشان ندادند. در حالی که مریم گلی ایرانی روی پسودومونا آئروژینوزا اثر ضد میکروبی داشت.

واژه‌های کلیدی: مریم گلی ایرانی، مریم گلی آذربایجانی، اثر ضد میکروبی، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد، بیواتوگرافی تعلیقی، سیلندر- پلیت، رقت - لوله

۱- استادیار میکروبیولوژی، ۲- استادیار فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان، ۳- دکتر داروساز

دریافت مقاله: ۱۳۸۱/۹/۱۷ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۲/۹/۱۲ پذیرش مقاله: ۱۳۸۲/۱۱/۱

مقدمه

گیاهان قسمت اعظم طبیعت اطراف آدمی را تشکیل می‌دهند. بنابراین به عنوان اولین انتخاب برای حل مشکلات زندگی از آنها کمک گرفته شده است. تا چند دهه گذشته آنچه که به عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گرفت، از منابع طبیعی و بطور عمده از گیاهان به دست می‌آمد. پیشرفت علم از یک سو و مسائل اقتصادی از سوی دیگر باعث کاهش مصرف گیاهان دارویی شده است و داروهای صنعتی در بسیاری از موارد جایگزین داروهای گیاهی شده‌اند (۳). مصرف روزافزون داروهای شیمیایی روز به روز مشکلات حادثی از قبیل پدیده خودایمنی بر اثر مصرف مداوم و بی‌رویه و بدون توجه به طریقه خاص مصرف دارو و عوارض جانبی که برخی از خود بیماری خطرناک‌تر هستند را به وجود می‌آورند. به دلیل مشکل مقاومت میکروارگانیسم‌ها به داروهای شیمیایی و عوارض جانبی و ناخواسته آنها، استفاده از عصاره‌های گیاهی و گیاهانی که فعالیت ضد میکروبی از خود نشان می‌دهند در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. از ۳۵۰ هزار گونه گیاهی که در روی کره زمین شناسایی شده، حدود ۱۰ هزار گونه از نظر مواد متشکله بررسی گردیده‌اند که برخی دارای اثرات دارویی هستند و هنوز زمان زیادی مانده تا منابع جدید و با ارزش گیاهی کشف گردند (۵).

کشور ایران به واسطه سابقه تمدن چند هزار ساله که حدود ۱۴۰۰ سال آن با فرهنگ غنی اسلام درآمیخته و نیز به دلیل موقعیت خاص جغرافیایی و شرایط اقلیمی و آب و هوایی متنوع که سبب رشد انواع گوناگونی از گیاهان گردیده و باعث اطلاق نام طلای سبز به فلور طبیعی ایران شده است، از جهت طب سنتی و گیاه درمانی غنی می‌باشد (۲).

مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی دو گیاه اسانس‌دار از خانواده نعناع و بومی ایران می‌باشند که در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

مریم‌گلی ایرانی (*Saliva mirzayanii*): گیاهی گلدار، نهاندانه، دولپه‌ای، پیوسته گلبرگ، از راسته توبی فلورال، راسته فرعی شاه‌پسند، تیره نعناع و جنس سالویا است (۱۹، ۴). این نوع مریم‌گلی در محل جمع‌آوری به نام مورپرزو (*Mour porzoo*) نامیده می‌شود.

مریم‌گلی ایرانی دارای فلاونوئیدهای آپی‌ژنین، اسکوتلارترین ۶ و ۷- دی‌متیل‌اتر، اسکوتلارترین ۶ و ۷ و ۴'-تری‌متیل‌اتر، لوتئولین ۳-متیل‌اتر، ۶ و ۷ و ۴' تترامتیل‌اترهای هیدروگزایلوئتولین و تانن می‌باشد (۷).

یک ترپنوئید جدید از دسته سس‌ترین‌ها به نام سالویا میرزاکولید نیز از قسمت‌های هوایی گیاه به دست آمده است (۱۴). گیاه دارای ۲-۱/۵ درصد اسانس بوده که پس از آنالیز توسط دستگاه طیف‌سنجی جرمی - گاز کروماتوگرافی (GC-MS) مشخص گردیده درصد عمده مواد متشکله آن ۱ و ۸- سینثول (۱۷/۴٪) و آلفا‌ترپینیل استات (۲۱/۲۵٪) می‌باشند (۷).

مریم‌گلی آذربایجانی (*Saliva atropatana*): گیاهی است گلدار، نهاندانه، دولپه‌ای، از راسته توبی فلورال، راسته فرعی شاه‌پسند، تیره نعناع، جنس سالویا (۱۹، ۴).

این گیاه دارای نام‌های عمومی مریمی، مریمیه و شالبیه بوده و *Garden sage* نیز خوانده می‌شود (۶). گیاه دارای ۱/۰٪ اسانس زردرنگ سبک‌تر از آب بوده، مواد عمده اسانس آن با آنالیز توسط دستگاه طیف‌سنجی جرمی - گاز کروماتوگرافی، بتا - کاربوفیلین (۱۶/۳٪)، اسکالارثول (۱۳/۳٪)، هگزیل اکتانوات (۱۲/۲٪) گزارش

شده‌اند (۱۵). هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات ضد میکروبی دو گیاه مذکور به طریقه *In vitro* بوده است.

مواد و روش‌ها

۱- گیاهان مورد استفاده

مریم‌گلی ایرانی از منطقه غرب اسفندقه واقع در استان کرمان در خرداد ماه جمع‌آوری گردید و پس از خشک کردن پودر شد.

مریم‌گلی آذربایجانی از اطراف اصفهان در اردیبهشت ماه جمع‌آوری گردید و پس از خشک کردن پودر شد.

۲- تهیه عصاره‌های گیاهی به روش خیساندن

دلیل استفاده از روش خیساندن، عدم آسیب به تمام مواد موجود در عصاره تهیه شده از گیاهان می‌باشد (۴).

جهت تهیه عصاره آبی و متانولی هر گیاه به طور جداگانه، به حدود ۳۰ گرم پودر گیاه ۱/۵ برابر حجم آن آب مقطر و یا متانول ۸۰ درجه افزوده شده و به مدت ۴۸ ساعت مرتباً تکان داده شد و پس از صاف شدن توسط دستگاه تقطیر در خلأ چرخان در حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و در آون ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کاملاً خشک گردید (۹،۲۰).

۳- تهیه اسانس به روش تقطیر با آب

۱۰۰ گرم از پودر هر گیاه توسط دستگاه اسانس‌گیری تقطیر با آب (Clevenger apparatus) به طور جداگانه اسانس‌گیری شد. اسانس‌ها بعد از آب‌گیری توسط سولفات سدیم انیدر، تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری گردید.

۴- میکروارگانیزم‌های مورد استفاده

در این بررسی از میکروارگانیزم‌های زیر که از مرکز پژوهش‌های علمی - صنعتی ایران خریداری شد، استفاده گردید:

استافیلوکوک طلایی (PTCC = ۱۱۱۲)، استافیلوکوک اپیدرمیدیس (PTCC=۱۱۱۴)، اشرشیاکولی (PTCC=۱۳۳۰)، کلبسیلاپنومونیه (PTCC=۱۰۵۳)، پسودومونا آئروژینوزا (PTCC=۱۰۷۴) و باسیلوس سابتیلیس (PTCC=۱۰۲۳).

۱-۴- تهیه سوسپانسیون میکروبی

برای کشت میکروارگانیزم‌ها، پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی با استفاده از محیط کشت مایع سوی‌بین کازئین هضم شده (Soybean caseine digest borth) و انتقال به آگار مغذی (Nutrient Agar)، محیط کشت حاصل به مدت یک شب در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت رشد میکروب قرار داده شد (۸).

۵- روش آزمایش

۱-۵- روش بیواتوگرافی تعلیقی

به منظور جداسازی عوامل ضد میکروبی موجود در اسانس مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی از روش بیواتوگرافی تعلیقی استفاده گردید (۱۱).

مراحل مختلف و متوالی آن عبارتند از:

اسانس مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی با ۹ برابر حجم خودشان با حلال پنتان مخلوط گردیدند.

- جداسازی ترکیبات موجود در اسانس مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی با سیستم حلال تولوئن - اتیل‌استات (۷-۹۳) با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) به کمک صفحات کروماتوگرافی Silicagel GF254

شدند. در خاتمه حضور ترکیب ضد میکروبی به صورت لکه‌های بی‌رنگ در زمینه قرمز ارغوانی مشخص شد. پس از مقایسه کروماتوگرام‌های تلقیح شده که با معرف دهیدروژناز اسپری شدند با کروماتوگرام شاهد که معرف وانیلین - اسیدسولفوریک (وانیلین ۱٪ الکلی - اسیدسولفوریک ۵٪ الکلی) به سطح آنها پاشیده شده بود و تطابق با Rf (relative factor) لکه مربوطه به ترکیب ضد میکروبی با Rf ترکیب مشابه در کروماتوگرام‌های شاهد انجام شد (۱،۲).

$$Rf = \frac{\text{فاصله خط بستر تا جایی که حلال بالا رفته}}{\text{فاصله خط بستر تا جایی که لکه قرار گرفته است}}$$

مکانیسم عمل معرف‌های دهیدروژناز: میکروب‌های زنده آنزیم دهیدروژناز را در محیط تولید می‌کنند که این آنزیم در صورت وجود معرف دهیدروژناز در محیط، یک باند دوگانه به فرمول معرف اضافه می‌کند که این باند به طول سیستم گنتوگه ملکول می‌افزاید و رنگ محیط را ارغوانی می‌کند. در واقع یک واکنش اکسیداسیون صورت می‌گیرد.

۲-۵- روش سیلندر - پلیت

با قرار دادن ۶ سیلندر در اطراف و یک سیلندر در مرکز به عنوان شاهد منفی (در مورد عصاره‌های آبی، از حلال آب مقطر و در مورد عصاره‌های متانولی از حلال متانول ۸۰ درجه) و در سیلندره‌های محیطی، به ترتیب شش غلظت از عصاره‌های مورد نظر (۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶۲) افزوده و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب قرار داده شد.

پشت آلومینیومی ساخت شرکت MERCK (۲×۷/۵cm) انجام شد (۲۳).

- خارج کردن کروماتوگرام از تانک کروماتوگرافی و صرف زمان لازم برای تبخیر حلال از سطح TLC و همزمان تابانیدن پرتو فرابنفش جهت از بین رفتن آلودگی سطحی احتمالی.

- انتقال صفحات کروماتوگرافی به درون پلیت‌هایی که از قبل اندکی محیط کشت مولر هینتون آگار (حدود ۵ میلی لیتر) کف آنها ریخته شده بود، در این حال صفحات کروماتوگرافی به کف پتری دیش‌ها چسبیده‌اند. باید توجه داشت که هیچ‌گونه جابجایی از هوا در زیر TLC قرار نگیرد.

- افزودن حدود ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت مولر هینتون آگار مذاب در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد روی سطح صفحات کروماتوگرافی درون پلیت‌ها به صورتی که لایه‌ای نازک و یکنواخت روی آنها را پوشانیده و منعقد گردد. محیط کشت مذکور قبل از آن با سوسپانسیون میکروب‌ها تلقیح شده بود. برای این منظور حدود ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروب (با کدورت مطابق با استاندارد نیم مک فارلند (۱/۵×۱۰^۸ cfu/ml) به ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت (۵۰ درجه سانتی‌گراد) افزوده و سپس به آرامی تکان داده شد.

- انکوباسیون پلیت‌ها حاوی کروماتوگرام و محیط کشت تلقیح شده در شرایط مناسب برای باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت.

- پس از طی زمان انکوباسیون معرف دهیدروژناز (محلول آبیکی ۲ درصد ماده ۳- (۴- یدوفنیل) - ۲- (۴- نیتروفنیل) - ۵- فنیل ۲H تترازولیوم کلراید خریداری شده از شرکت MERCK به سطح داخل پلیت‌ها اسپری گردیده و آنگاه پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت داخل انکوباتور گذاشته

پس از انجام آزمایشات مربوطه اثر ضد میکروبی در $Rf=0.1/0.85$ روی اشرشیاکولی و در $Rf=0.4/0$ روی استافیلوکوک طلایی و در $Rf=0.3/0.2$ روی کلبسیلاپنومونیه و در $Rf=0.69/0.65$ روی باسیلوس سابتیلیس و در $Rf=0.1/0$ روی پseudomonas آئروژینوزا مشاهده گردید (جدول ۱).

۲- اسانس مریم گلی آذربایجانی

اثر ضد میکروبی در $Rf=0.22/0$ روی اشرشیاکولی و در $Rf=0.13/0$ و $Rf=0.77/0.66$ روی استافیلوکوک طلایی و در $Rf=0.1/0$ و $Rf=0.55/0.44$ روی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و $Rf=0.55/0.48$ روی باسیلوس سابتیلیس آشکار شد. این اسانس روی کلبسیلاپنومونیه و پseudomonas آئروژینوزا اثر ضد میکروبی نشان نداد (جدول ۱).

روش سیلندر - پلیت

۱- عصاره آبی مریم گلی ایرانی

پس از انجام آزمایش در غلظت $1/562 \text{ mg/ml}$ اثر ضد میکروبی روی هیچ میکروبی دیده نشد.

در مورد این عصاره در غلظت $3/125 \text{ mg/ml}$ قطر هاله عدم رشد فقط روی استافیلوکوک طلایی به میزان ۱۰ میلی متر به دست آمد. قطر هاله عدم رشد در غلظت $6/25$ روی اشرشیاکولی $7/5$ میلی متر و روی کلبسیلاپنومونیه $8/2$ میلی متر و روی باسیلوس سابتیلیس ۱۰ میلی متر اندازه گیری شد. در غلظت 25 mg/ml قطر هاله عدم رشد روی استافیلوکوک اپیدرمیدیس $8/4$ میلی متر مشاهده شد. پseudomonas آئروژینوزا فقط در غلظت 50 mg/ml هاله ای به میزان $8/5$ میلی متر را نشان داد و در این غلظت

بعد از طی مدت انکوباسیون، منطقه عدم رشد (Inhibition zone) در محیط اطراف سیلندرها با خط کش میلی متری اندازه گیری شد. قابل ذکر است که اثر ضد میکروبی هر عصاره بر روی هر سوش به روش فوق سه بار مورد آزمایش قرار گرفت. در این روش از آنتی بیوتیک جنتامایسین به عنوان شاهد مثبت در غلظت های مختلف استفاده شد (۱۸).

۳-۵- روش رقت - لوله

در این روش با استفاده از هشت رقت متوالی عصاره گیاه در محیط کشت مایع و افزودن سوسپانسیون میکروبی برای شش میکروب به طور جداگانه و قرار دادن شاهد مثبت و منفی اثرات ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظت ماده ضد میکروبی که از رشد باکتری جلوگیری کرده و در مقایسه با کنترل منفی به طور ظاهری کدورتی نداشت به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (Minimum Inhibition Concentration) MIC تعیین گردید (۱۰، ۱۲).

نتایج

در این قسمت به بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس مریم گلی ایرانی و مریم گلی آذربایجانی به روش بیواتوگرافی تعلیقی، عصاره های آبی و متانولی گیاهان فوق در غلظت های مختلف بر روی میکروارگانیسم های مورد نظر به روش سیلندر - پلیت و رقت - لوله می پردازیم.

روش بیواتوگرافی تعلیقی

۱- اسانس مریم گلی ایرانی

بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد بر روی استافیلوکوک طلائی به اندازه ۱۷/۱ میلی‌متر بود (جدول ۲).

جدول ۱: بررسی Rf ترکیبات ضد میکروبی موجود در گیاهان مورد نظر به روش بیواتوگرافی تعلیقی

گیاه	سوش	اشرشیا کولی	استافیلوکوک طلائی	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	کلبسیلا پنومونیه	پسودومونا آئروژینوزا	باسیلوس سابتیلیس
اسانس مریم گلی ایرانی	۰/۸۵-۱/۰	۰-۰/۴۰	—	—	۰/۲۰-۰/۳۰	۰-۰/۱۰	۰/۶۵-۰/۶۹
اسانس مریم گلی آذربایجانی	۰-۰/۲۲	۰-۰/۱۳ ۰/۶۶-۰/۷۷	۰-۰/۱۰ ۰/۴۴-۰/۵۵	—	—	—	۰/۴۸-۰/۵۵

جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) عصاره آبی گیاهان مورد نظر روی میکروارگانیسم‌های مورد

آزمایش به روش سیلندر - پلیت پس از سه بار آزمایش

نام گیاه	سوش غلظت mg/ml	اشرشیا کولی	استافیلوکوک طلائی	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	کلبسیلا پنومونیه	پسودومونا آئروژینوزا	باسیلوس سابتیلیس
مریم گلی ایرانی	۱/۵۶۲	—	—	—	—	—	—
	۳/۱۲۵	—	۱۰/۰±۰/۶۳	—	—	—	—
	۶/۲۵	۷/۵±۰/۵۷	۱۱/۸±۰/۵۰	—	۸/۲±۰/۶۶	—	۱۰/۰±۰/۶۵
	۱۲/۵	۸/۵±۰/۴۴	۱۳/۵±۰/۴۳	—	۹/۴±۰/۶۲	—	۱۱/۹±۰/۴۴
	۲۵	۹/۶±۰/۵۵	۱۵/۳±۰/۷۴	۸/۴±۰/۵۷	۱۱/۰±۰/۵۲	—	۱۳/۸±۰/۷۰
	۵۰	۱۰/۷±۰/۵۶	۱۷/۱±۰/۶۶	۱۰/۱±۰/۶۸	۱۲/۵±۰/۷۰	۸/۵±۰/۷۳	۱۵/۸±۰/۷۲
مریم گلی آذربایجانی	۱/۵۶۲	—	—	—	—	—	—
	۳/۱۲۵	—	۹/۴±۰/۵۲	—	—	—	۸/۸±۰/۸۳
	۶/۲۵	۷/۷±۰/۵۶	۱۱/۲±۰/۵۴	۹/۱±۰/۵۱	—	—	۱۰/۴±۰/۷۲
	۱۲/۵	۹/۳±۰/۵۹	۱۳/۰±۰/۷۲	۱۰/۹±۰/۸۳	—	—	۱۱/۹±۰/۵۵
	۲۵	۱۱/۰±۰/۶۰	۱۴/۷±۰/۵۷	۱۲/۶±۰/۴۸	—	—	۱۳/۴±۰/۶۶
	۵۰	۱۲/۷±۰/۶۷	۱۶/۵±۰/۴۰	۱۴/۳±۰/۴۰	—	—	۱۴/۹±۰/۷۰
جنتامایسین ۱/۲۵μg/ml		۲۷/۶±۰/۵۸	۲۶/۲±۰/۴۱	۲۲/۳±۰/۵۹	۲۷/۸±۰/۴۸	۱۷/۲±۰/۶۳	۳۴/۰±۰/۶۹

جدول ۳: میانگین قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی متر) عصاره متانولی گیاهان موردنظر و مقایسه با جنتامایسین

روی میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش به روش سیلندر - پلیت پس از سه بار آزمایش

نام گیاه	سوش	غلظت mg/ml					
		اشرشیاکولی	استافیلوکوک طلائی	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	کلبسیلا پنومونیه	پسودومونا آئروژینوزا	باسیلوس سابتیلیس
مریم گلی ایرانی	۱/۵۶۲	—	—	—	—	—	
	۳/۱۲۵	—	۱۲/۰±۰/۴۸	—	—	۷/۵±۰/۷۰	
	۶/۲۵	۷/۸±۰/۷۳	۱۴/۶±۰/۷۵	۷/۰±۰/۶۲	۱۱/۰±۰/۸۱	۹/۶±۰/۴۶	
	۱۲/۵	۱۰/۸±۰/۴۰	۱۷/۱±۰/۶۳	۹/۴±۰/۶۶	۱۲/۲±۰/۸۳	۷/۱±۰/۸۱	
	۲۵	۱۳/۰±۰/۵۵	۱۹/۶±۰/۵۷	۱۱/۸±۰/۵۵	۱۳/۵±۰/۷۸	۷/۸±۰/۵۴	
	۵۰	۱۵/۱±۰/۵۸	۲۲/۱±۰/۷۰	۱۴/۲±۰/۷	۱۴/۸±۰/۵۸	۸/۶±۰/۴۰	
مریم گلی آذربایجانی	۱/۵۶۲	—	—	—	—	—	
	۳/۱۲۵	۷/۲±۰/۶	۱۲/۵±۰/۷۱	—	—	۱۰/۱±۰/۵۱	
	۶/۲۵	۹/۷±۰/۷۳	۱۴/۸±۰/۵۳	۱۱/۵±۰/۵۹	—	۱۲/۴±۰/۴۴	
	۱۲/۵	۱۲/۲±۰/۴۰	۱۷/۰±۰/۵۳	۱۴/۷±۰/۴۰	—	۱۴/۶±۰/۵۹	
	۲۵	۱۴/۶±۰/۸۳	۱۹/۱±۰/۷۴	۱۷/۶±۰/۷۵	—	۱۶/۹±۰/۸۳	
	۵۰	۱۷/۱±۰/۴۴	۲۱/۲±۰/۷۰	۲۰/۷±۰/۸۰	—	۱۹/۱±۰/۴۰	
جنتامایسین ۱/۲۵μg/ml		۲۷/۶±۰/۵۸	۲۶/۲±۰/۴۱	۲۲/۳±۰/۵۹	۲۷/۸±۰/۴۸	۱۷/۲±۰/۶۳	۳۴/۰±۰/۶۹

۲- عصاره متانولی مریم گلی ایرانی

پس از انجام آزمایش در غلظت ۱/۵۶۲mg/ml هاله عدم رشد مشاهده نشد. در غلظت ۳/۱۲۵mg/ml قطر هاله عدم رشد روی استافیلوکوک طلائی و باسیلوس سابتیلیس به ترتیب ۱۲/۰ و ۷/۵ میلی متر به دست آمد. قطر هاله عدم رشد در غلظت ۶/۲۵mg/ml روی اشرشیاکولی ۷/۸ میلی متر و روی کلبسیلا پنومونیه ۱۱/۰ میلی متر و روی استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۷/۰ میلی متر و در غلظت ۱۲/۵mg/ml روی پسودوموناس آئروژینوزا ۷/۱ میلی متر بدست آمد. در غلظت ۵۰mg/ml بزرگ ترین قطر هاله عدم رشد بر روی استافیلوکوک طلائی ۲۲/۱ میلی متر مشاهده شد (جدول ۳).

۳- عصاره آبی مریم گلی آذربایجانی

در غلظت ۱/۵۶۲mg/ml روی میکروارگانیسم‌ها اثر ضد میکروبی پدیدار نشد. میزان قطر هاله عدم رشد در غلظت ۳/۱۲۵ mg/ml روی استافیلوکوک طلائی ۹/۴ میلی متر و باسیلوس سابتیلیس ۸/۸ میلی متر و در غلظت ۶/۲۵mg/ml روی اشرشیاکولی ۷/۷ میلی متر و استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۹/۱ میلی متر بود. این عصاره بر روی دو سوش میکروبی کلبسیلا پنومونیه و پسودومونا آئروژینوزا تأثیر نداشت. در غلظت ۵۰ mg/ml روی استافیلوکوک طلائی بزرگ ترین قطر هاله عدم رشد مشاهده شد که ۱۶/۵ میلی متر بود (جدول ۲).

قطر ۷/۲ میلی متر، استافیلوکوک طلائی به قطر ۱۲/۵ میلی متر و باسیلوس سابتیلیس به قطر ۱۰/۱ میلی متر

۴- عصاره متانولی مریم گلی آذربایجانی

در غلظت ۱/۵۶۲ mg/ml روی هیچ کدام از میکروارگانیسم‌ها اثر ضد میکروبی مشاهده نشد. این عصاره در غلظت ۳/۱۲۵ mg/ml اثر ضد میکروبی خود را با بروز هاله عدم رشد روی سه میکروب اشرشیاکولی به

جدول ۴: حداقل غلظت عصاره‌های آبی و متانولی دو گیاه مریم گلی ایرانی و آذربایجانی برای ممانعت از رشد ۶ میکروارگانیسم

مورد آزمایش به روش رقت - لوله

گیاه	سوش عصاره	اشرشیاکولی	استافیلوکوک طلائی	استافیلوکوک اپیدرمیدیس	کلبسیلا پنومونیه	پسودومونا آئروژینوزا	باسیلوس سابتیلیس
مریم گلی	عصاره آبی	۶/۲۵	۶/۲۵	۲۵	۶/۲۵	۵۰	۶/۲۵
ایرانی	عصاره متانولی	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۳/۱۲۵
مریم گلی	عصاره آبی	۶/۲۵	۳/۱۲۵	۳/۱۲۵	>۵۰	>۵۰	۶/۲۵
آذربایجانی	عصاره متانولی	۳/۱۲۵	۳/۱۲۵	۶/۱۲۵	>۵۰	>۵۰	۳/۱۲۵

تمامی غلظت‌ها بر حسب mg/ml می‌باشند.

۲- عصاره متانولی مریم گلی ایرانی

MIC عصاره متانولی گیاه مریم گلی ایرانی بر روی شش سوش میکروبی در جدول ۴ آمده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود MIC این عصاره روی اشرشیاکولی، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و کلبسیلا پنومونیه برابر ۶/۲۵ mg/ml بوده است. در حالی که روی استافیلوکوک طلائی و باسیلوس سابتیلیس ۳/۱۲۵ mg/ml و روی پسودومونا آئروژینوزا برابر ۱۲/۵ mg/ml بود.

۳- عصاره آبی مریم گلی آذربایجانی

با توجه به جدول ۴، MIC عصاره آبی این گیاه روی اشرشیاکولی و استافیلوکوک اپیدرمیدیس برابر ۶/۲۵ mg/ml و روی استافیلوکوک طلائی و باسیلوس سابتیلیس ۳/۱۲۵ mg/ml و روی کلبسیلا پنومونیه و پسودومونا آئروژینوزا اثر ضد میکروبی ظاهر نداشت.

آشکار کرد. در غلظت ۶/۲۵ mg/ml هاله عدم رشد روی استافیلوکوک اپیدرمیدیس ۱۱/۵ میلی متر بود. این عصاره بر روی کلبسیلا پنومونیه و پسودومونا آئروژینوزا اثر ضد میکروبی نداشت. در غلظت ۵۰ mg/ml بزرگترین قطر هاله عدم رشد روی استافیلوکوک طلائی مشاهده گردید و ۲۱/۲ میلی متر بود. (جدول ۳).

روش رقت - لوله

۱- عصاره آبی مریم گلی ایرانی

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود MIC این عصاره بر روی اشرشیاکولی، استافیلوکوک طلائی، کلبسیلا پنومونیه و باسیلوس سابتیلیس برابر ۶/۲۵ mg/ml و روی استافیلوکوک اپیدرمیدیس برابر ۲۵ mg/ml بود در حالی که روی پسودومونا آئروژینوزا برابر ۱۲/۵ mg/ml بوده است.

۴- عصاره متانولی مریم‌گلی آذربایجانی

با توجه به جدول ۴، MIC عصاره متانولی این گیاه روی اشرشیاکولی، استافیلوکوک طلائی و باسیلوس سابتیلیس برابر ۳/۱۲۵ mg/ml و روی استافیلوکوک اپیدرمیس ۶/۲۵ mg/ml بود، در حالی که روی کلبسیلاپنومونیه و پسودومونا آئروژینوزا هیچگونه اثر ضد میکروبی نشان نداد.

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، ۸۰٪ از مردمی که در کشورهای توسعه یافته زندگی می‌کنند کم و بیش برای درمان از گیاهان دارویی نیز استفاده می‌نمایند. این مسئله سبب می‌گردد تا بررسی دقیق‌تری در مورد اثرات درمانی و بی‌خطر بودن مصرف گیاهان دارویی، انجام شود. در این میان ایجاد مقاومت میکروبی روزافزون نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موجود سبب می‌گردد در جهت یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید، گیاهان نیز مورد بررسی قرار گیرند.

گیاهان دارای اثرات ضد میکروبی با مکانیسم‌های مختلف و حتی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها رشد باکتری‌ها را مهار می‌کنند و این امر لزوم تحقیقات جامع‌تر در حیطه گیاهان دارویی را گوشزد می‌نماید. این مسئله افزایش روزافزون مقالات انتشار یافته در زمینه خصوصیات ضد میکروبی گیاهان را توجیه می‌کند (۱۱).

گیاهان خانواده نعناع و علی‌الخصوص جنس *Saliva* (مریم‌گلی) به سبب وجود ترکیبات ترپنوئیدی گوناگون، اسانس و ترکیبات فنلی به خصوص فلاونوئیدها از لحاظ اثرات ضد میکروبی بسیار مورد توجه می‌باشند. برای مثال در بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره فلاونوئیدی گیاه *S.palaestina* فلاونوئید *Cirsimaritin* آن، اثرات ضد میکروبی

بالایی روی استافیلوکوک آرتوس، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، اشرشیاکولی، کلبسیلاپنومونیه، پروتئوس ولگاریس و پسودومونا آئروژینوزا داشته است (۱۶). اسانس *S.ringens* که درصد بالای از ۱ و ۸ - سینئول و آلفاپینن دارد روی ۶ سوش میکروبی معمول و ۳ سوش قارچ بیماری‌زا اثرات ضد میکروبی قابل توجهی نشان داده (۲۱) و اسانس *S.tomentosa* با دارابودن درصد بالای از ۱ و ۸- سینئول (۱۷٪)، روی باکتری‌های معمول گرم مثبت و گرم منفی غیر از پسودومونا آئروژینوزا اثرات مهار رشد قابل ملاحظه‌ای ظاهر ساخته (۱۳) و اسانس *S.slarea* و *S.desoleana* که به ترتیب دارای بالاترین درصد مونوترپن‌های استری و مونوترپن‌های الکلی می‌باشند به شکل فرآورده موضعی، در حیوانات آزمایشگاهی اثر ضد میکروبی بهتری روی عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک طلائی، استافیلوکوک اپیدرمیدیس و کاندیدا آلبیکنس نشان داده‌اند (۱۷).

ترکیبات مختلف موجود در عصاره استونی گیاه *S.sclarea* شامل اسانس و دی‌ترپن‌ها روی استافیلوکوک طلائی، کاندیدا آلبیکنس و پروتئوس میرابلیس، اثر ضد میکروبی داشته‌اند (۲۲)، در حالیکه عصاره آبی *S.triloba* به روش دیسک دیفوزیون، هیچ اثر ضد میکروبی روی میکروارگانیزم‌های معمول نداشته است (۲۴).

دو گیاه بررسی شده یعنی *S.mirzayanii* و *S.atropatana* از لحاظ اثرات ضد میکروبی اسانس به روش بیواتوگرافی تعلیقی و عصاره آبی که حاوی ترکیبات قطبی گیاه و عصاره متانولی که حاوی تمام مواد موجود در گیاه است، به روش سیلندر - پلیت و سپس جهت تعیین MIC، به روش رقت - لوله روی باکتری‌های استاندارد که عمدتاً مسئول بیماری‌های عفونی در انسان محسوب می‌شوند

دو گیاه بوده و این مسئله توسط روش بیواتوگرافی تعلیقی اسانس این دو گیاه نیز تأیید شده است.

جهت تأیید نتایج حاصل از روش سیلندر - پلیت و همچنین تعیین MIC عصاره های مذکور از روش رقت - لوله در مورد عصاره آبی و متانولی هر دو گیاه استفاده شد و مشخص گردید عصاره متانولی مریم گلی ایرانی با حداقل غلظت $3/125 \text{mg/ml}$ روی باسیلوس سابتیلیس و عصاره متانولی مریم گلی آذربایجانی با حداقل غلظت $3/125 \text{mg/ml}$ روی اشرشیاکولی و باسیلوس سابتیلیس و استافیلوکوک طلائی مؤثر است. در همین غلظت عصاره آبی مریم گلی آذربایجانی نیز روی این دو میکروارگانیسم و باسیلوس سابتیلیس مؤثر می‌باشد که این اثر علاوه بر اینکه می‌تواند مربوط به ترکیبات اسانسی با حلالیت بیشتر در آب (لکه‌های ذکر شده با Rf بالاتر در سیستم حلال غیرقطبی اسانس در روش بیواتوگرافی، یعنی Rf محدود $0/66-0/77$ و $0/44-0/55$) باشد می‌توان آن را مربوط به ترکیبات فنلی قطبی موجود در عصاره آبی این گیاه نیز دانست.

اثرات ضد میکروبی در هر سه روش همدیگر را تأیید نموده‌اند. با این تفاوت که در روش بیواتوگرافی علاوه بر سرعت کار، تا حدودی می‌توان با جداسازی و استخراج ماده در Rf مورد نظر کار را اختصاصی‌تر نمود. مقایسه هاله‌های عدم رشد غلظت $1/25 \mu\text{g/ml}$ جنتامایسین با عصاره‌های هر دو گیاه به وضوح نشان می‌دهد که اثر این دو گیاه به صورت عصاره تام که مخلوط بی‌شماری از مواد است بسیار کمتر از جنتامایسین است و اگر ترکیب با اثر ضد میکروبی موجود در این عصاره‌ها جداسازی و خالص گردد، اثر قابل مقایسه‌تری با جنتامایسین خواهد داشت.

(استافیلوکوک طلائی، استافیلوکوک اپیدرمیدیس، کلبسیلا پنومونیه، پسودومونا آئروژینوزا، باسیلوس سابتیلیس و اشرشیاکولی) مورد مطالعه قرار گرفتند.

نتایج حاصله از بررسی اسانس این دو گیاه در مقایسه با سایر گیاهان جنس *Salvia* حاکی از این است که اکثر اسانس‌های گیاهان مذکور روی پسودومونا آئروژینوزا اثر قابل ملاحظه‌ای ندارند. در عین حال اثر اسانس مریم گلی ایرانی روی کلبسیلا پنومونیه و پسودومونا آئروژینوزا برخلاف سایر گونه‌ها قابل ملاحظه است، هرچند که اثری روی استافیلوکوک اپیدرمیدیس ندارد.

بنابراین با توجه به Rf ترکیبات مؤثر بر هر یک از میکروارگانیسم‌های مربوطه، با شناسایی ساختمان این ترکیبات به راحتی می‌توان ترکیب با اثر ضد میکروبی مورد نظر را تحت بررسی قرار داد.

نتایج روش سیلندر - پلیت عصاره‌های آبی و متانولی دو گیاه مریم‌گلی ایرانی و مریم‌گلی آذربایجانی نشان می‌دهد که بر اساس روش آماری T-test با فرض احتمال خطای ۵٪ ($P < 0/05$) قطر هاله‌های عدم رشد عصاره‌های متانولی بیش از قطر هاله‌های عدم رشد عصاره‌های آبی است و این اختلاف معنی‌دار می‌باشد. بر طبق نتیجه حاصله، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که مواد با اثرات ضد میکروبی در هر گیاه وابسته به ساختمان خود می‌توانند قطبی یا غیرقطبی باشند و قطبیت حلال مورد استفاده برای استخراج مواد مؤثره گیاه بسیار مهم است (۱۱).

بنابراین عمده ترکیبات با اثرات ضد میکروبی این دو گیاه، قطبیت بسیار بالایی ندارند که بتوانند توسط حلالی مثل آب کاملاً استخراج شوند و به احتمال قوی چون ترکیبات اسانسی نیز توسط متانول استخراج می‌شوند اثرات ضد میکروبی مذکور، عمدتاً مربوط به ترکیبات اسانسی این

منابع

۱. اصیلی، جواد: بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه *Platycladus orientali* به روش بیواتوگرافی تعلیقی و رقت آگار. مقاله سمینار داروسازی مشهد، ۱۳۷۹.
۲. امامی، سیداحمد و اصیلی، جواد: بررسی فیتوشیمیایی مخروطیان بومی ایران و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس آنها. پایان نامه شماره ۶۴۴، دانشکده داروسازی مشهد، ۱۳۷۶.
۳. امین، غلامرضا: گیاهان دارویی سنتی ایران. نشر معاونت پژوهشی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، چاپ اول، جلد اول، ۱۳۷۰، ص ۳۱-۱.
۴. زرگری، علی: گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ چهارم، جلد سوم، ۱۳۶۹، ص ۵۳۸ و ۵۱۰.
۵. مجاب، فراز: چگونگی مطالعه و بررسی اثرات بیولوژیک گیاهان دارویی. ماهنامه دارویی رازی، ۱۳۷۲، شماره ۶، ص ۳۱-۲۴.
۶. مظفریان، ولی ا...: فرهنگ نام‌های گیاهان ایران. فرهنگ معاصر، تهران، ۱۳۷۵، ص ۱۹۸.
۷. مهربانی، میترا: بررسی فیتوشیمیایی گیاه *Salvia mirzayani*. پایان‌نامه شماره ۲۴۱، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، ۱۳۷۳.
۸. ناظم، محمد؛ راشد، طاهره و نادری نسب، محبوبه: باکتری‌شناسی آزمایشگاهی. مؤسسه چاپ و انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد، ۱۳۷۱.
9. Ali-Shytayeh MS, Yaghmour RM, Faide YR, Salem K and Al-Nuri MA. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J Ethnopharmacol* 1998; 60(3): 265-271.
10. Baran EJ and Finegold SM: Baily & Scott's diagnostic microbiology. 11th ed., St Louis, The CV mosby Company, 2002; PP 230-256.
11. Eloff JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants *J Ethnopharmacol* 1998; 60(1): 1-8.
12. Fabry W, Okemo PO, Ansorg R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1998; 60(1): 79-84.
13. Haznedaroglu MZ, Karabay NU and Zeybek U. Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. *Fitoterapia* 2001; 72(7): 829-831.
14. Moghaddam FM, Amiri R, Alam M, Hossain MB and Vander Helm D. Structure and absolute stereochemistry of salvimirzacolide, a new sesterterpene from *Salvia mirzayanii*. *J Nat Prod* 1998; 61(2): 279-281.
15. Mirza M and Ahmadi L. Composition of the essential oil of *Salvia atropatana* Bunge. *J Essent Oil Res* 2000; 12: 575-576.
16. Miski M, Ulubelen A, Johansson C and Mabry TJ. Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina*. *J Nat Prod* 1983; 46(6): 874-875.
17. Peana AT, Moretti MD and Juliano C. Chemical composition and antimicrobial action of the essential oils of *Salvia desoleana* and *S. sclerea*. *Planta Med* 1999; 65(8): 752-754.
18. Perumal-Samy R, Ignacimuthu S and Sen A. Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. *J Ethnopharmacol* 1998; 62(2): 173-182.
19. Rechinger KH: Flora Iranica. Austria, Akademische Druck – U, Verlag Sanstalt, 1987; P150
20. Rios JL, Recio MC and Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 1988; 23(2-3): 127-149.
21. Tzakou O, Pitarokili D, Chinou IB and Harvala C. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia ringens*. *Planta Med* 2001; 67(1): 81-83.
22. Ulubelen A, Topcu G, Eris C, et al. Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry* 1994; 36(4): 971-974.
23. Wagner H and Bladt S: Plant drug analysis. Berlin, Springer, 1996; P166.
24. Yildirim A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur OF and Bilaloglu V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of *Tilia argentea* Desf ex Dc), sage (*Salvia trilobal*) and black tea (*Camelia sinensis*). *J Agric Food Chem* 2000; 48(10): 5030-5034.