

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، ضد درد، ضد التهاب، آرام بخش، کاهش دهنده قند خون و آنتی اکسیدان است. این تحقیق به منظور تعیین بهترین مرحله رشد و نمو برای استفاده بهینه از خواص ضد باکتریایی برگ گیاه دارویی نوروزک^۱، اجرا شد. برگ گیاه در سه مرحله مختلف از رشد و نمو (مرحله رویش، مرحله گل دهی و مرحله رسیدگی بذر) جمع آوری و خشک شد. سپس عصاره متانولی برگ در دستگاه تقطیر در خلأ خشک شد. غلظت های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر از آن تهیه و به روش دیسک دیفوزیون^۳ بر روی باکتری های اسریشیا کولی^۴، پseudomonas آروجینوس^۵، استافیلوکوکوس آرنوس^۶، کلبسیلا پنومونی^۷ و پروتئوس میرابیلیس^۸ اثر داده شد. پس از ۲۴ ساعت، قطر هاله ممانعت از رشد اندازه گیری و اثر بازدارندگی این عصاره ها با یکدیگر و با آنتی بیوتیک های تتراسایکلین، پنی سیلین و آمپی سیلین مقایسه شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار JMP و بر اساس آزمون HSD در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد. بیشترین فعالیت ضد باکتریایی برگ در مرحله گل دهی مشاهده شد و در بیشترین موارد تفاوت معنی داری بین مرحله گل دهی و دو مرحله دیگر وجود داشت. از سوی دیگر در مورد بعضی از باکتری ها تأثیر ضدمیکروبی عصاره برگ به ویژه در مرحله گل دهی به طور معنی داری بیش تر از تأثیر آنتی بیوتیک های مذکور و در مواردی مشابه با تأثیر آن ها بود. بنا بر این به نظر می رسد که بهترین زمان برای بهره برداری از خاصیت ضد باکتریایی برگ، مرحله گل دهی است. همچنین با توجه به فرایند مقاوم شدن برخی سویه ها به آنتی بیوتیک های سنتزی رایج، لزوم استفاده از ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی می تواند ارزشمند باشد که البته این امر پژوهش های دقیق تری را ایجاب می کند.

مقدمه

نوروزک گیاهی است از تیره نعناع که بومی استان خراسان و سمنان است [۱]. گزارش های مختلفی در ارتباط با خواص درمانی گیاه نوروزک وجود دارد. برای مثال، عصاره آبی برگ آن خواب آور بوده و دارای اثر شل کننده عضلانی است و از این نظر با دیازپام قابل مقایسه است [۲]. همچنین تأثیر ضد التهابی جوشانده برگ

واژه های کلیدی: نوروزک، *Salvia leriifolia*، ضد باکتریایی، برگ.

دریافت ۸۸/۲/۷

پذیرش ۸۸/۸/۲۷

^۱. *Salvia leriifolia* Benth

^۲. *Lamiaceae*

^۳. disc diffusion

^۴. *Escherichia coli*

^۵. *Pseudomonas aeruginosa*

^۶. *Staphylococcus aureus*

^۷. *Klebsiella pneumonia*

^۸. *Proteus mirabilis*

گیاه، از نظر کارایی مشابه با داروی دیکلوفناک است [۳]. از سوی دیگر عصاره‌های 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 ریشه 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 از جمله ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و آلکالوئیدها است [۷]. خاصیت آنتی‌اکسیدان برگ و ریشه گیاه نوروزک نیز در ارتباط با حضور متابولیت ثانویه از نوع چالکون‌ها به نام بوتنین است [۸]، [۹].

چالکون‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویه 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 عصاره برگ و ریشه نوروزک وجود دارد. اثر ضد میکروبی اسانس و عصاره برگ نوروزک بر میکروارگانیسم‌های (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*)، (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*) بررسی شده است. در این بررسی عصاره برگ بر (*Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*) تأثیر بازدارندگی داشته است. همچنین تأثیر اسانس 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 نوروزک نیز بر همین 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 و نمو 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 مرحله 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

مواد و روش‌ها

۱. **تهیه نمونه گیاهی:** جمع‌آوری گیاه در سه مرحله مختلف از رشد و نمو، یعنی مرحله رشد رویشی (مرحله ۱)، مرحله گل‌دهی (مرحله ۲) و مرحله رسیدگی بذر (مرحله ۳) به‌ترتیب در زمان‌های ۲۷ اسفند ۱۳۸۴، ۲۷ فروردین و ۲۶ اردیبهشت ۱۳۸۵ از منطقه کیودان واقع در شمال شهرستان بردسکن (استان خراسان رضوی) که دور از دسترس دام بود، انجام شد و شناسایی گونه با هر بار یوم دانشگاه فردوسی مشهد تأیید شد. بعد از هر بار جمع‌آوری، برگ‌ها به‌طور جداگانه در سایه خشک شدند و تا زمان انجام آزمایش در کیسه کتان نگهداری و سپس با آسیاب پودر شدند.

۲. **استخراج عصاره گیاهی:** برای استخراج عصاره گیاهی از روش خیساندن^۱ استفاده شد. برگ‌های خردشده نوروژک در مدت یک شبانه‌روز با متانول خالص به نسبت ۱:۱۰ (وزنی: حجمی) روی شیکر در دمای اتاق عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل با کاغذ واتمن شماره ۴۲ صاف شد. بقایای گیاهی مجدداً با متانول به مدت یک شبانه‌روز دیگر با همان شرایط قبل تحت عملیات استخراج قرار گرفت و محلول صاف شده به عصاره اولیه اضافه شد. عصاره 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 شماره ۴۲ صاف شد تا محلول شفافی به رنگ قهوه‌ای به دست آید. عصاره متانولی سپس به نسبت ۱:۷ تحت خلأ و دمای کمتر از ۴۰°C با دستگاه تبخیرگردان تغلیظ و سپس در دمای کمتر از ۴۰°C و زیر هود تا حد خشکی تبخیر شد [۱۴].

۳. **تهیه سوسپانسیون میکروبی:** میکروب‌های آزمایش شده از کشت‌های باکتری‌های تازه تهیه شده از بیماران بیمارستان امام‌رضا واقع در شهر مشهد تهیه شدند. باکتری‌های (*Klebsiella pneumoniae*)، که در بیمارستان بر روی محیط‌های اختصاصی (E.M.B و Blood Agar) خالص‌سازی شده بودند، استفاده شدند. باکتری‌های خالص‌سازی شده برای به‌دست آوردن کلنی تک در محیط کشت (Nutrient Agar) کشت شده و به مدت ۲۴ 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 ۲۴ ساعته تهیه شد. برای این کار یک لوپ از هر میکروب در ۵cc محلول محیط کشت فوق تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفت. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی با پپیت پاستور استریل، مقداری از این سوسپانسیون به لوله‌های در پیچ‌دار استریل منتقل شد و سپس با افزودن نرمال سالین ۹/۰٪ و مقایسه کدورت آن با محلول ۰/۵ مك فارلند، سوسپانسیونی با غلظت تقریبی ۱۰^۸ میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر

^۱. maceration

بعدست آمد که از آن برای تلقیح استفاده شد [۱۵]. سپس دانسیته عصاره‌ها از طریق اندازه‌گیری وزن عصاره خشک با ترازوی با دقت ۰.۱ میلی‌گرم و تقسیم بر حجم محلول عصاره اندازه‌گیری شد و pH هر کدام از آن‌ها با pH متر تعیین شد.

۴. **عملیات کشت و تهیه تیمارهای مختلف از عصاره‌ها:** باکتری‌های آزمایش شده در محیط کشت مولر-هینتون آگار کشت یکنواخت شدند برای بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های حاصل از برگ در سه مرحله مختلف از رشد و نمو از روش دیسک دیفوزیون استفاده شد. غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر از عصاره خشک با کمک آب مقطر استریل تهیه شد. در غلظت ۲۰ گرم در لیتر pH عصاره در مراحل رویشی، گلدهی و رسیدگی بذر به ترتیب ۴/۹۲، ۵/۱۲ و ۵/۳۴ و دانسیته آن‌ها نیز به ترتیب ۰/۹۸۴، ۰/۹۸۲ و ۰/۹۸۵ بود. سپس دیسک‌های بلانک با قطر ۶/۵ میلی‌متر به مدت نیم ساعت در محلول عصاره در شرایط استریل خیس‌انده شدند و روی کشت باکتری‌ها قرار گرفتند. از دیسک‌های خیس‌انده شده در آب مقطر به عنوان شاهد منفی و از دیسک‌های آماده آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین (غلظت ۳۰ میکروگرم)، پنی‌سیلین (غلظت ۱۰ واحد) و آمپی‌سیلین (غلظت ۱۰ میکروگرم) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. پتری‌ها ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفتند و سپس قطر هاله ممانعت از رشد میکروب‌ها اندازه‌گیری شد.

۵. **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 هاله ممانعت از رشد حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره برگ (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر) که در سه مرحله مختلف از دوره زندگی گیاه برداشت شد، مشاهده می‌شود (جدول‌های ۱ تا ۳).

بررسی قطر هاله ممانعت از رشد حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره برگ در هر یک از مراحل رشد و نمو بر روی هر باکتری و سپس مقایسه باکتری‌ها با هم نشان داد که غلظت ۱۵ گرم در لیتر مناسب‌ترین غلظت برای بازدارندگی از رشد برای همه باکتری‌ها است. بنا بر این در مراحل بعد برای مقایسه اثر بازدارندگی عصاره بین باکتری‌های مختلف این غلظت استفاده شد.

جدول ۱. مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد پنج باکتری مختلف که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف از عصاره برگ در مرحله رویشی ایجاد شدند. داده‌های دارای حروف مشترک برای هر باکتری از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند (داده‌ها میانگین سه تکرار است)

قطر هاله ممانعت از رشد (mm)					عصاره برگ در مرحله رویشی g/l
<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. aureus</i>	
^a ۸/۳	^a ۶/۵	^a ۷/۳	^b ۷/۳	^a ۸/۳	۵
^a ۹	^a ۶/۵	^a ۷/۶	^a ۱۰/۶	^a ۹/۶	۱۰
^a ۸/۳	^a ۶/۵	^a ۸	^a ۱۱	^a ۹/۵	۱۵
^b ۶/۵	^a ۶/۵	^a ۷	^a ۱۰/۱	^a ۹/۶	۲۰
^a ۶/۵	^a ۶/۵	^a ۶/۵	^a ۶/۵	^a ۶/۵	شاهد متانول

جدول ۲. مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد پنج باکتری مختلف که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف از عصاره برگ در مرحله گل‌دهی ایجاد شدند. داده‌های دارای حروف مشترک برای هر باکتری از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند (داده‌ها میانگین سه تکرار است)

قطر هاله ممانعت از رشد (mm)					عصاره برگ در مرحله گل‌دهی (g/l)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. aureus</i>	
^a ۸ ^b	^a ۶/۵ ^b	^a ۹/۳ ^a	^a ۹/۳ ^b	^a ۱۰/۱ ^a	۵
^a ۹/۳ ^b	^a ۹ ^a	^a ۸/۶ ^a	^a ۱۲/۲ ^a	^a ۱۳/۲ ^a	۱۰
^a ۱۰/۶ ^a	^a ۸/۳ ^a	^a ۹/۳ ^a	^a ۱۱/۳ ^a	^a ۱۵/۴ ^b	۱۵
^a ۱۲/۳ ^a	^a ۸/۶ ^a	^a ۹/۶ ^a	^a ۱۳/۳ ^a	^a ۱۶/۵ ^b	۲۰
^a ۶/۵ ^a	^a ۶/۵ ^a	^a ۶/۵ ^a	^a ۶/۵ ^a	^a ۶/۵ ^a	شاهد متانول

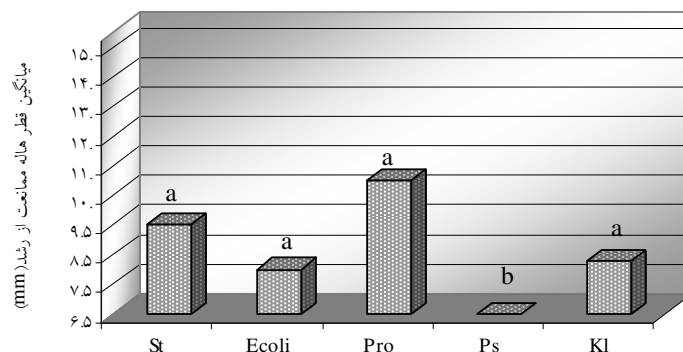
جدول ۳. مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد پنج باکتری مختلف که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف از عصاره برگ در مرحله رسیدگی بذر ایجاد شدند. داده‌های دارای حروف مشترک برای هر باکتری از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند (داده‌ها میانگین سه تکرار است)

قطر هاله ممانعت از رشد (mm)					عصاره برگ در مرحله رسیدگی بذر (g/l)
<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. aureus</i>	
^a ۶/۵ ^a	^a ۶/۵ ^a	^a ۷ ^a	^a ۸/۳ ^a	^a ۸/۶ ^b	۵
^a ۶/۵ ^a	^a ۶/۵ ^a	^a ۷/۳ ^a	^a ۸/۶ ^a	^a ۹ ^b	۱۰
^a ۶/۵ ^a	^a ۶/۵ ^a	^a ۷ ^a	^a ۸ ^a	^a ۸/۳ ^b	۱۵
^a ۶/۵ ^a	^a ۶/۵ ^a	^a ۷ ^a	^a ۸ ^a	^a ۱۲/۳ ^a	۲۰
^a ۶/۵ ^a	^a ۶/۵ ^a	^a ۶/۵ ^a	^a ۶/۵ ^a	^a ۶/۵ ^a	شاهد متانول

ب) مقایسه اثر ممانعت از رشد عصاره برگ (۱۵ گرم در لیتر) در مرحله رویش بر پنج باکتری مختلف با یکدیگر: آنالیز داده‌ها نشان داد که غلظت ۱۵ گرم در لیتر از عصاره برگ در مرحله 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 (جدول ۱ و نمودار ۱). 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*

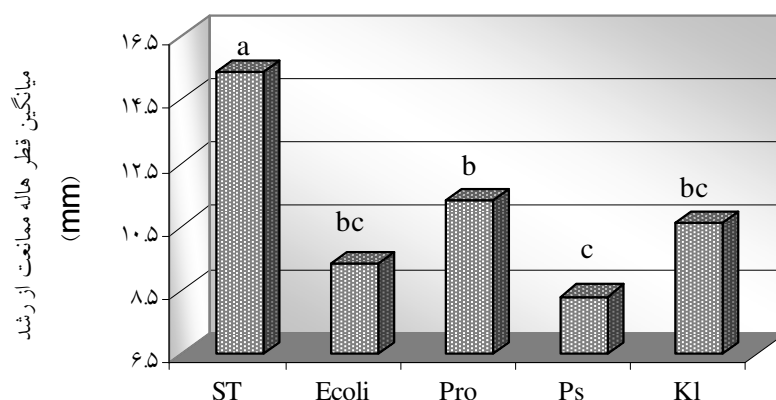
به‌طور کلی حساس‌ترین باکتری به غلظت ۱۵ گرم در لیتر از عصاره برگ در این مرحله اس. آئروس و مقاوم‌ترین پ. آئروجنیوسا است.



نمودار ۱. مقایسه اثر باز دارندگی عصاره برگ (غلظت ۱۵۰۰) در مرحله رویشی برپنج باکتری مختلف با یکدیگر (ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند).

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

پ) مقایسه اثر ممانعت از رشد عصاره برگ (۱۵ گرم در لیتر) در مرحله گل‌دهی بر پنج باکتری مختلف با یکدیگر: مقایسه میانگین‌های قطر هاله ممانعت از رشد و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها مشخص کرد اثر بازدارندگی غلظت ۱۵ گرم در لیتر از عصاره برگ در مرحله 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 (جدول ۲ و نمودار ۲).



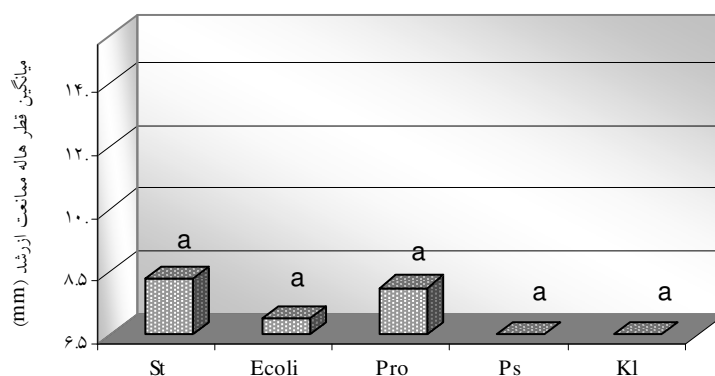
نمودار ۲: مقایسه اثر باز دارندگی عصاره برگ (غلظت ۱۵۰۰) در مرحله گل‌دهی برپنج باکتری مختلف با یکدیگر (ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند).

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

با توجه به آنالیز آماری داده‌ها اثر بازدارنده عصاره برگ در مرحله گل‌دهی بر رشد اس. آئروس بیش‌تر از دیگر باکتری‌ها بوده است.

به‌طور کلی حساس‌ترین باکتری به غلظت ۱۵ گرم در لیتر از عصاره برگ در این مرحله اس. آنروس و مقاوم‌ترین پ. آنروجینوسا است.

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

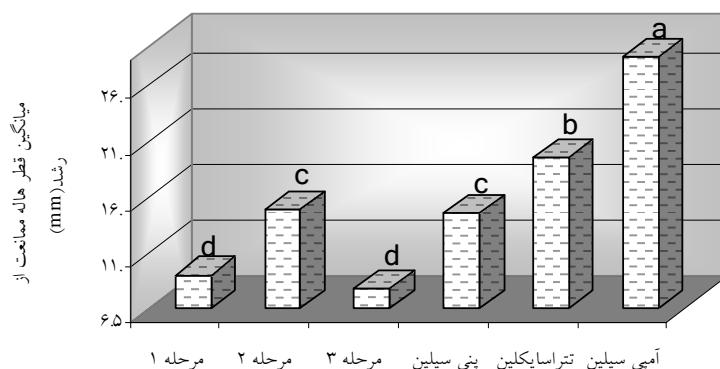


نمودار ۳: مقایسه اثر باز دارندگی عصاره برگ (غلظت ۱۵۰۰) در مرحله رسیدگی بذر بر پنج باکتری مختلف با یکدیگر (ستون‌های دارای حروف مشترك از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).

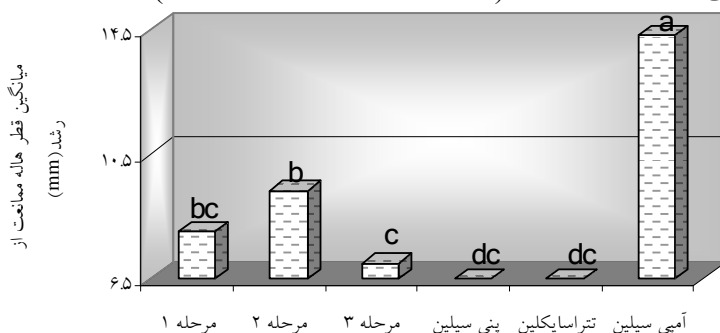
Kl=*K. Pneumoniae* Ps=*P. aeruginosa* Pro =*P.mirabilis* St=*S. aureus*

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

ج) مقایسه تأثیر ضد باکتریایی عصاره برگ در مراحل مختلف رشد و نمو با تأثیر بازدارنده آنتی بیوتیک‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که اثر بازدارندگی عصاره برگ در مرحله گل‌دهی بر (*S.aureus*) با اثر بازدارندگی پنیسیلین مشابه بود (نمودار ۴).



نمودار ۴: مقایسه اثر بازدارندگی عصاره برگ (ppm غلظت ۱۵۰۰) در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی بیوتیک‌ها بر رشد باکتری (*S. Aureus*) (ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند).
در مورد باکتری (*E. coli*)، تأثیر بازدارنده عصاره برگ در مرحله 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، ۳ و ۴ و نمودار ۵).



نمودار ۵: مقایسه اثر بازدارندگی عصاره برگ (غلظت ۱۵ گرم در لیتر) در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی بیوتیک‌ها بر رشد باکتری (*E. coli*) (ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند)

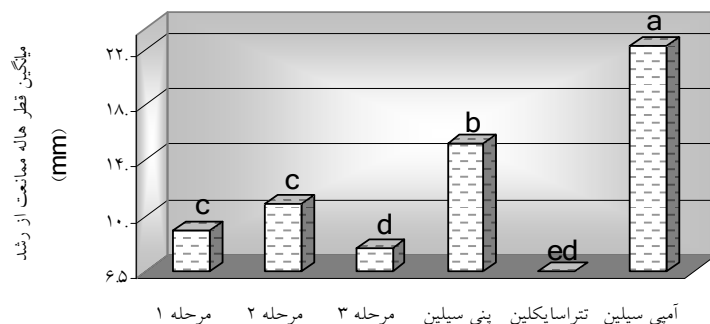
جدول ۴- میانگین قطر هاله ممانعت از رشد باکتری‌ها در اثر آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین، آمپی سیلین و تتراسایکلین (داده‌ها میانگین سه تکرار است)

قطر هاله ممانعت از رشد (mm)					نوع آنتی بیوتیک
<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. aureus</i>	
۶/۵	۶/۵	۶/۵	۱۵/۶۷	۱۵	پنی سیلین
۶/۵	۶/۵	۱۴/۳۳	۲۲/۶۷	۲۹	آمپی سیلین
۱۳/۲۵	۶/۵	۶/۵	۶/۵	۲۰	تتراسایکلین

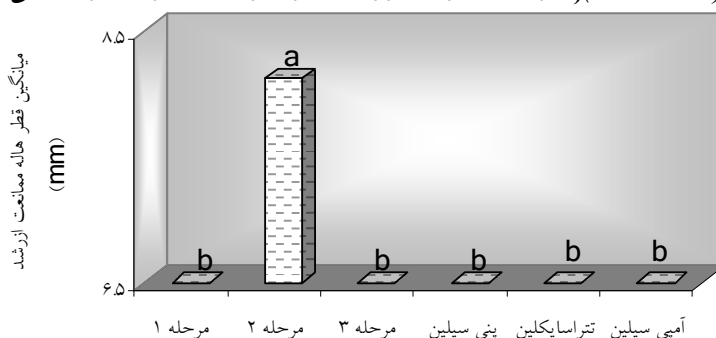
برای باکتری (*P. mirabilis*) اثر بازدارندگی آمپی‌سیلین و پنی سیلین به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از عصاره برگ در مرحله رویش و گل‌دهی بود، در حالی که اثر بازدارندگی عصاره برگ در این دو مرحله از اثر تتراسایکلین که بر این باکتری اثری نداشت، بیش‌تر بود (جدول‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ و نمودار ۶).

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

اثر بازدارندگی داشت. عصاره مرحله رویشی و مرحله رسیدگی بذر اثر بازدارندگی بر این باکتری نداشتند. همچنین هیچیک از آنتی بیوتیک‌ها اثر بازدارندگی بر این باکتری نداشتند. (جدول‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ و نمودار ۷).

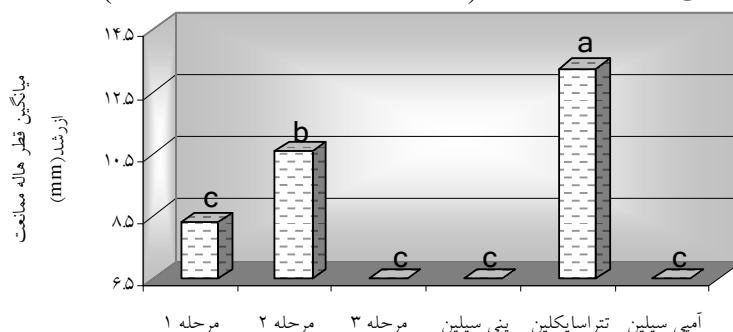


نمودار ۶: مقایسه اثر بازدارندگی عصاره برگ (غلظت ۱۵ گرم در لیتر) در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی بیوتیک‌ها بر رشد باکتری (*P. mirabilis*) (ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند).



نمودار ۷: مقایسه اثر بازدارندگی عصاره برگ (غلظت ۱۵ گرم در لیتر) در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی بیوتیک‌ها بر رشد باکتری (*P. aeruginosa*) (ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند).

عصاره برگ در مرحله رویشی و مرحله گل‌دهی روی (*K. Pneumoniae*) اثر بازدارندگی داشت. ولی در مرحله رسیدگی بذر بر این باکتری اثری نداشت. اثر بازدارندگی تتراسایکلین از عصاره برگ در همه مراحل رشد و نمو به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. ولی تأثیر عصاره برگ در مرحله گل‌دهی از پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین که بر این باکتری اثر بازدارندگی نداشتند، بیشتر بود. (جدول‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ و نمودار ۸).



نمودار ۸: مقایسه اثر بازدارندگی عصاره برگ (غلظت ۱۵ گرم در لیتر) در مراحل مختلف رشد نمو و آنتی بیوتیک‌ها بر رشد باکتری (*K. pneumoniae*) (ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند)

بحث

در زمینه خواص ضد میکروبی جنس *سالویا*^۱ گزارش‌های متعددی وجود دارد. برای مثال *اس. لانیژرال*^۲ به علت داشتن ماده‌ای به نام لانیژرال دارای اثر ضد میکروبی بر باکتری‌های گرم مثبت است [۱۶]. فعالیت ضد میکروبی برای عصاره 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 *نوروزک* 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 عصاره برگ در مرحله گل‌دهی بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر تمام باکتری‌های آزمایش شده داشت که در بیش‌تر موارد با عصاره برگ در مرحله رویش و رسیدگی بذر تفاوت کاملاً معنی‌داری را نشان داد. تأثیر عصاره برگ در همه مراحل بر *اس. آئروس* شدیدتر بود و اثر بازدارندگی عصاره برگ در مرحله گل‌دهی بر *اس. آئروس* با تأثیر آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین قابل قیاس بود. همچنین این عصاره بر *پ. آئروجنیوسا* اثر بازدارندگی داشت در حالی‌که هیچ یک از آنتی‌بیوتیک‌ها تأثیری بر آن نداشتند. اثر بازدارندگی عصاره برگ بر روی باکتری‌ها با تحقیق ولیکویک^۴ [۲۲] مطابقت دارد. بر اساس تحقیقات وی با استفاده از روش دیسک دیفیوژین عصاره برگ (*S. officinalis*) روی گونه (*S. aucheri*) دیگر اک^۵ در سال ۱۹۹۹ [۲۳] اثر ضدباکتریایی آن روی (*P. mirabilis* و *S. aureus*) گزارش کرد در صورتی‌که بر (*E. coli* و *P. aeruginosa* و *K. pneumonia*) اثری نداشت. باغی (۱۳۷۵) نیز گزارش داد که برگ *نوروزک* روی (*E. coli* و *S. aureus*) اثر بازدارنده دارد.

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

۱. Salvia

۲. S. lanigeral

۳. Gulcin

۴. Velickovic

۵. Digrak

گزارش‌هایی در مورد خاصیت آنتی اکسیدانی برگ و ریشه نوروژک وجود دارد. همچنین ارتباط این خاصیت با وجود ماده بوتنین از ترکیبات فلاونوئیدی (چالکونی) به اثبات رسیده است [۸]، [۹]. تحقیقات نشان داده است که برخی چالکون‌ها دارای خواص 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 و همکاران در سال ۱۳۷۷ ترکیب فلاونوئیدی ۵-هیدروکسی ۴ و ۶-تری‌متوکسی فلاون (I) را از نوروژک استخراج و ساختار آن را شناسایی کرده‌اند [۲۶]. بنا بر این تأثیر عصاره‌های برگ بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus*) منطقی به نظر می‌رسد. اثر بازدارندگی قوی بر باکتری‌های گرم مثبت می‌تواند ناشی از آن باشد که ساختمان دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی در قسمت خارجی شامل یک لایه پلی‌ساکارید و پروتئین است که با جاذبه هیدروفوبیکی اتصال دارند، در حالی که باکتری‌های گرم مثبت فاقد این ساختمان هستند [۱۵]. تغییر خاصیت ضد میکروبی برگ در مراحل مختلف رشد و نمو می‌تواند به دلیل تغییر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی یا اشکال فعال آن‌ها از نظر خاصیت ضد میکروبی باشد به این ترتیب احتمالاً در مرحله رویشی در برگ ترکیبات فلاونوئیدی و یا سایر ترکیبات ضد میکروبی ناچیز است و به تدریج تا رسیدن به مرحله 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 واسطه‌های متابولیک ساده اولیه باشد [۲۷]. از آنجا که برگ در مرحله رویش تأثیر بازدارندگی زیادی روی دو باکتری (*E. coli* و *P. mirabilis*) داشته است و از طرف دیگر اثبات شده است که برگ در این مرحله فاقد خواص آنتی‌اکسیدانی است [۲۸]، بنا بر این احتمالاً مواد ناشناخته دیگری که فاقد خواص آنتی‌اکسیدانی ولی واجد خواص ضد میکروبی هستند، در برگ این گیاه وجود دارند که تا مرحله گل‌دهی افزایش می‌یابند ولی در مرحله رسیدگی بذر کاهش چشم‌گیری پیدا می‌کنند. بر اساس نتایج تحقیق حاضر به نظر می‌رسد که بهترین زمان بهره‌برداری از خاصیت ضد میکروبی برگ نوروژک مرحله گل‌دهی (اواخر فروردین تا اوایل اردیبهشت) باشد.

از سوی دیگر در این بررسی مشخص شد که سویه‌های وحشی بررسی شده که مستقیماً 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 عصاره برگ که در مرحله گل‌دهی برداشت شده بود بر روی این باکتری کاملاً مؤثر بود. بنا بر این به نظر 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 عصاره برگ

مرحله گل‌دهی این گیاه وجود دارد، ارزشمند باشد، که البته این امر پژوهش‌های دقیق‌تر و کامل‌تری را ایجاب می‌کند.

تشکر و قدردانی

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

منابع

1. K.H. Rechinger. Flora Iranica. N.150, *Academische Druck- u. Verlagsanstalt Graz* (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.
- ۴- حسین شکوهی زاده، مطالعه اثرات پایین آورندگی قند خون برگ و دانه نوروزک بر موش سفید کوچک، پایان‌نامه برای دریافت دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد (۱۳۷۵).
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.
۷. فروزان طباطبائی یزدی، بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اسانس و عصاره برگ گیاه نوروزک و شناسایی فیتوشیمیایی آن. پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته شیمی (۱۳۷۴) ۷۸-۷۵.
8. M.H. Hadad Khodaparast, A. Haghdooost, A.H. Elhami-Rad, G. Movahhed and H. Karazhiyan, *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.
۹. رضا فرهوش، استخراج، تخلیص و شناسایی فراکسیون عمده آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه نوروزک و بررسی خصوصیات آن. پایان‌نامه دکترای، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد (۱۳۸۲).

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 نوروزک. پایان‌نامه برای دریافت دکترای داروسازی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، (۱۳۷۵) ۳۴-۳۱.
۱۳. مهنوش جبارزاده، بررسی خواص ضد میکروبی عصاره‌های ریشه و دانه گیاه نوروزک. پایان‌نامه برای دریافت دکترای داروسازی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، (۱۳۷۸) ۵۶-۵۴.
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, *Antimicrobial and antioxidant properties of rosmar 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.

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 embryos 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. مجموعه خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره شیمی و مهندسی 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) ۸۴.
۲۸. معصومه مدرس، مطالعه رویدانشناسی (phenology) و برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نوروزک (*salvia leriifolia Benth*). پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد (۱۳۸۶).