اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی مرزه بختیاری (Satureja bachtiarica) بر باکتری-های گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی

بهروز علیزاده بهبهانی*[۱]، فریده طباطبایی یزدی[۲] ، مریم حیدری سورشجانی[۱]، علی مرتضوی[۳]، فروزان طباطبایی یزدی[۴]

۱ . دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲ . دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳ . استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴ . عضو گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

* **نشانی برای مکاتبه:** behrooz66behbahani@gmail.com

دریافت مقاله: تیر نود و دو پذیرش برای چاپ: شهریور نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: *مرزه (Satureja) یکی از جنس‌های خانواده‌ی نعنا (Lamiaceae) می‌باشد، که حدود ۱۴گونه از آن در ایران گزارش شده است. هدف از این مطالعه تعیین اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی مرزه بختیاری بر Listeria monocytogenes PTCC 1297، Bacillus cereus PTCC 1154، Enterobacter aerogenes PTCC 1221،1237 Enterococcus faecalis و Salmonella typhi PTCC 1609 در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.*

روش کار: *اثر ضد میکروبی عصاره به دو روش پخش عصاره در سطح محیط کشت (تمام ظرف) و انتشار در آگار (دیسک) تعیین شد. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از روش رقت لوله‌ای تعیین گردید. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از برنامه آنالیز واریانس (ANOVA) انجام شد.*

یافته‌ها: *در روش انتشار در آگار همه غلظت‌های عصاره اتانولی بر Listeria monocytogenes، Bacillus cereus و Enterococcus faecalis اثر بازدارندگی داشت. MIC عصاره آبی و اتانولی برای Enterobacter aerogenes به ترتیب ۶۴ mg/ml و ۳۲ بود. MBC عصاره آبی و اتانولی نیز در خصوص Enterobacter aerogenes به ترتیب ۱۲۸ mg/ml و ۶۴ بود.*

نتیجه‌گیری: *عصاره اتانولی مرزه بختیاری در شرایط آزمایشگاهی دارای اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر Salmonella typhi و Enterobacter aerogenes به عنوان باکتری گرم منفی و Listeria monocytogenes، Bacillus cereus و Enterococcus faecalis به عنوان باکتری‌های گرم مثبت نشان داد. Enterobacter aerogenes بیشترین مقاومت را در برابر عصاره‌های آبی و اتانولی مرزه بختیاری نشان داد.*

واژگان کلیدی: ***مرزه بختیاری، عصاره آبی و اتانولی، اثر ضد میکروبی***

مقدمه

ترکیبات استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خاصیت ضد اکسایشی و ضد میکروبی ذاتی بوده و در برابر بسیاری از باکتری‌های عامل فساد و مسمومیت فعالیت ضد میکروبی طبیعی از خود نشان می‌دهند. ایجاد مقاومت در مقابل داروها و توانایی میکروارگانیسم‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد سبب شده است تا تمایل به بررسی اثر ضد میکروبی گیاهان دارویی ایجاد گردد. از همین رو تحقیقات زیادی در مورد اثر ضد میکروبی و نگهدارندگی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی انجام شده است(۱).

عصاره‌های گیاهی دارای ترکیباتی هستند که می‌توانند علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به کار روند که این آثار ضد میکروبی علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرهای عامل بیماری و عفونت اثبات شده است. ایران از لحاظ آب و هوا و موقعیت جغرافیایی در زمینه رشد گیاهان دارویی یکی از بهترین مناطق جهان محسوب می‌شود و از زمان‌های قدیم یکی از منابع تولید و مصرف گیاهان دارویی بوده است(۲).

مرزه (Satureja) از جنس‌های خانواده‌ی نعنا (Lamiaceae) می‌باشد که حدود ۱۴ گونه از آن در ایران گزارش شده است. گونه مرزه بختیاری دارای پراکندگی به نسبت وسیع در ایران است و در مناطق مختلف کشور مانند استان‌های چهارمحال و بختیاری، لرستان، خوزستان، ایلام، کرمانشاه، اصفهان، گیلان و بعضی نقاط دیگر می‌روید.

این گونه دارای برگ‌هایی است که در طول حالت تاخوردگی دارد و به شکل مستطیلی خطی بوده و به صورت مجتمع در طول ساقه قرار گرفته-اند(۳). مرزه بختیاری (Satureja bachtiarica) از نظر پزشکی در طب سنتی طبیعت نسبتا گرم و خشک، ضد نفخ و اشتها آور و برای تقویت نیروی جنسی مؤثر می‌باشد. هم چنین برای تسکین درد دندان از آن استفاده می‌شود و اگر با آب انجیر خورده شود برای سرفه و تنگی نفس اثر مفید دارد. مرزه بر ای معالجهی اسهال بسیار مفید است(۴). گونه‌های مختلف جنس مرزه از نظر میزان عصاره و نوع ترکیب‌های تشکیل دهنده تنوع زیادی دارند. در عصاره برخی از گونه‌ها، ترکیب‌های عمده پولگن و منتول هستند. درحالی که در عصاره بعضی دیگر از گونه‌ها ترکیب‌هایی مانند کارواکرول، گاما ترپینن و پارا سیمن ترکیب عمده عصاره را تشکیل می‌دهند. بدیهی است که بر حسب نوع و درصد اجزای تشکیل دهنده، کاربرد عصاره نیز متفاوت می‌شود(۵).

باکتری‌ها عمومی‌ترین عامل در ارتباط با مسمومیت‌ها و عفونت‌های غذایی هستند. سالمونلا از طریق آب و غذای آلوده وارد دستگاه گوارش می‌شود و به سطح سلول‌های اپیتلیوم مخاط روده متصل می‌گردد. سپس در واکوئل-های درون این سلول‌ها وارد می‌شود. اما گاهی نیز میان اتصالات میان سلولی وارد می‌گردد. باکتری در محل ورود تکثیر می‌شود و چون توانایی عبور از لامینا پروپریا را دارد از آنجا به گردش خون وارد می‌شود و به تمام قسمت‌های بدن منتشر شده و بخش‌های مختلف سیستم لنفاوی را آلوده می‌کند. در سلول‌های سیستم ماکروفاژ و رتیکلواندوتلیال وارد شده و به تکثیر خود ادامه می‌دهد. یکی از بیماری‌ها که از طریق سالمونلا ایجاد می‌شود تب تیفوئید یا همان حصبه می‌باشد(۶).

لیستریا منوسیتوژنز عامل بیماری لیستریوز است که در بزرگ سالان غیر باردار، مننژیت اولیه، انسفالیت، یا سپتی سمی ایجاد می‌کند. بیماران مسن‌تر یا افرادی که مستعد هستند و ایمنی سلولی آن‌ها پایین است، مانند گیرندگان پیوند اعضاء، مبتلایان به لنفوم و ایدز افرادی هستند که مشخصاً مستعد بیماری هستند. انتروباکتر آئروژنز به عنوان یک بیماری زای فرصت طلب شناخته شده است. آنترو باکتر آئروژنز عامل عفونت‌های رحمی و به ندرت عامل سندرم تورم پستان، تورم رحم است. استرپتوکوکوس یک گونهٔ مهم از باکتری‌های بیماری زای گرم مثبت و برون یاخته‌ای است. باسیلوس سرئوس مولد انتروتوکسین‌های مولد اسهال و تهوع بوده و قادر به ایجاد سندرم اسهال و سندرم تهوع است(۶).

هدف از این پژوهش تعیین اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ مرزه بختیاری علیه برخی از میکروارگانیسم‌های شاخص عفونت و مسمومیت در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

روش کار

این پژوهش در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی و فناوری های نوین دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. سویه های میکروبی مورد استفاده در این پژوهش شامل Listeria monocytogenes PTCC 1297، Bacillus cereus PTCC 1154، Enterobacter aerogenes PTCC 1221،1237 و Enterococcus faecalis PTCC 1609 Salmonella typhi بودند.

برگ مرزه بختیاری (Satureja bachtiarica) در مرحله قبل از گل دهی از استان چهار محال بختیاری (شهرکرد) جمع آوری گردید. برگ‌های مرزه بختیاری بعد از شناسایی و تایید نام علمی گیاه با استفاده از کلیدهای شناسایی و هماهنگی‌های لازم با هرباریوم و آزمایشگاه سیستماتیک گیاهی دانشکده علوم پایه و پژوهشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، در سایه خشک گردید و جهت تهیه عصاره با آسیاب مدل WARING پودر شد.

جهت تهیه عصاره‌های آبی و اتانولی، ۱۰۰ گرم از برگ‌های پودر شده گیاه به ارلن حاوی۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درجه و آب مقطر اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق روی دستگاه هم زن مغناطیسی به آرامی مخلوط شد تا استخراج عصاره به طور کامل انجام گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط کاغذ صافی از هم جدا شد تا عصاره‌های اولیه به دست آید. مایع رویی پس از جمع آوری با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، سپس از صافی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده و در نهایت وارد دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) شده و در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد حلال آن‌ها به مدت یک ساعت تبخیر شد و عصاره‌های تغلیظ شده به دست آمد. عصاره‌های تغلیظ شده در ظروف تیره استریل ریخته شد و تا زمان مصرف در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شدند(۷).

جهت استاندارد کردن روش و تکرار پذیری و به منظور مقایسه و ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره‌های استخراج شده به وسیله آب مقطر و اتانول، وزن خشک عصاره‌ها تعیین شد. بدین طریق که برای هر کدام از عصاره‌ها یک لوله آزمایش خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس وزن شد سپس از عصاره تغلیظ شده ۱ میلی لیتر به لوله اضافه و پس از۲۴ ساعت انکوباسیون در ۶۰ درجه سانتی گراد، عصاره ها به طور کامل خشک شد سرانجام لوله ها مجددا توزین و با کم کردن وزن لوله‌های خالی میانگین وزن خشک عصاره‌های آبی و اتانولی تعیین شد. وزن خشک عصاره اتانولی ۱۲ درصد و وزن خشک عصاره آبی ۷ درصد به دست آمد(۸).

بیست و چهار ساعت قبل از انجام آزمایش و با استفاده از محیط‌های کشت ذخیره مبادرت به تهیه کشت تازه‌ای شد(کشت ۲۴ ساعته). پس از رشد باکتری بر سطح شیب دار آگار با استفاده از محلول رینگر سوسپانسیون غلیظ میکروبی تهیه گردید. سپس کدورت سوسپانسیون حاصل توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شد و تا برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک فارلند (CFU) /ml (۱/۵×۱۰^{۸})، توسط محلول رینگر رقیق شد(۹،۱۰).

اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی مرزه بختیاری با استفاده از دو روش تمام ظرف (افزودن عصاره به محیط کشت) و روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی گردید. در روش تمام ظرف ۰/۲ گرم از عصاره به ۵ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و برای یک نواخت شدن به کمک دستگاه ورتکس هم زده شد. سپس ۱ میلی لیتر از این محلول به ظرف های پتری استریل اضافه گشت غلظت نهایی عصاره در این حالت ۲۰۰۰ µg/ml می باشد(۱۱). در مرحله بعد پس از اضافه کردن محیط کشت استریل مولر هیلتون آگار (مرک آلمان) به ظرف های پتری و بستن آن‌ها یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط‌ها کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت(۱۱). در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، ابتدا یک لوپ از کشت استاندارد هر سوش بر روی این محیط ها کشت داده شد سپس دیسک های کاغذی (جنس صافی واتمن و به قطر ۶ میلی متر) با غلظت‌های mg/ml ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ عصاره‌ها درآب مقطر استریل تهیه و با عصاره مرزه بختیاری آغشته گشت و توسط پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده شد و با کمی فشار روی محیط کشت ثابت گردید. بعد از گرم خانه گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با استفاده از خط کش به طور دقیق قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. تمامی آزمایشات با ۳ تکرار انجام گرفت(۱۲).

حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) عصاره‌های آبی و اتانولی مرزه بختیاری با استفاده از روش رقت لوله‌ای، تعیین گردید. برای تعیین MIC برای هر عصاره از یک سری ۷ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۶ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف هر عصاره و یک لوله نیز به عنوان کنترل بکار رفت. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. پس از گرم خانه گذاری لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند، پایین‌ترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید و کاملاً شفاف بود، به عنوانMIC در نظر گرفته شد(۱۳).

حداقل غلظت کشندگی(MBC) با استفاده از روش رقت لوله‌ای برای عصاره‌های آبی و اتانولی مرزه بختیاری تعیین گردید. برای تعیین MBC برای هر عصاره از یک سری ۹ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقت‌های مختلف از هر عصاره و یک لوله نیز به عنوان کنترل بکار رفت. پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. از تمام لوله‌های که هیچ رشدی در آن‌ها مشاهده نشده بود نمونه برداری و جهت تعیین MBC به روش Pour Plate Method کشت داده شد. لوله‌ای که حاوی کم-ترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوط به آن هیچ رشدی مشاهده نشده بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد این روش برای هر دو عصاره آبی و اتانولی و هر میکروارگانیسم ۳ بار تکرار گردید(۱۴)

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SPSS تحت نسخه ۱۷ استفاده شد، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) جهت مقایسه میانگین ها و از آزمون Duncan جهت بررسی اختلاف بین میانگین ها در سطح $p < 0/05$ استفاده گردید.

یافته ها

عصاره اتانولی درغلظت ۲۰۰۰ µg/ml برListeria monocytogenes ، Bacillus cereus و Enterococcus faecalis کاملا موثر بوده و از رشد آن‌ها روی محیط کشت جلوگیری به عمل آورد، اما عصاره آبی تنها بر Listeria monocytogenes ، Enterococcus faecalis اثر بازدارندگی داشت و هیچ اثر بازدارندگی برBacillus cereus نشان نداد. عصاره اتانولی و آبی درغلظت ۲۰۰۰ µg/ml بر Salmonella typhi و Enterobacter aerogenesتاثیر نداشت و از رشد آن بر محیط کشت جلوگیری به عمل نیاورد.

عصاره اتانولی مرزه بختیاری در تمامی غلظت ها بر Listeria monocytogenes، Bacillus cereus و Enterococcus faecalis اثر بازدارندگی داشت.. عصاره آبی مرزه بختیاری در تمامی غلظت های بر Listeria monocytogenes و Enterococcus faecalis اثر بازدارندگی داشت. عصاره آبی مرزه بختیاری در تمام غلظت ها بجز لظت (۵ mg/ml) بر Bacillus cereus موثر بود و از رشد این باکتری ها جلوگیری کرد. عصاره آبی و اتانولی مرزه بختیاری در غلظت های (۵ mg/ml، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵و ۳۰) هیچ گونه اثر ضد باکتریایی بر Enterobacter aerogenes و Salmonella typhi نشان نداد. و فقط در غلظت‌های (۳۵ mg/ml و ۴۰) از رشد آن جلوگیری نمود.

نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های آبی و اتانولی مرزه بختیاری در جدول ۱ آورده شده است. در مورد تاثیر عصاره اتانولی بر Listeria monocytogenes، Bacillus cereus و Enterococcus faecalis مشخص شد که در غلظت‌های ۱۰ با ۱۵، ۲۰ با ۲۵ و ۳۰ با ۳۵ اختلاف میانگین قطر عدم رشد (به صورت دو به دو) با هم معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین مشخص شد که میانگین قطر هاله عدم رشد Salmonella typhi و Enterobacter aerogenes در غلظت-های ۳۵ با ۴۰ عصاره اتانولی اختلاف معنی‌دار ندارند. مقایسه دو به دو میانگین‌های قطر هاله عدم رشد در مورد عصاره آبی بر باکتری‌های مورد بررسی نشان داد اختلاف میانگین قطر هاله عدم رشد Listeria monocytogenes، Bacillus cereus و Enterococcus faecalis در مورد غلظت‌های ۱۵ با ۲۰، ۲۵ با ۳۰ و ۳۵ با ۴۰، و اختلاف میانگین قطر عدم رشد Salmonella typhi و Enterobacter aerogenes در مورد غلظت‌های ۳۵ با ۴۰ معنی‌دار نمی‌باشد.

نتایج نشان می دهد MIC عصاره اتانولی مرزه بختیاری برای Listeria monocytogenes، Bacillus cereus، Enterococcus faecalis، Salmonella typhi و Enterobacter aerogenes به ترتیب ۸ mg/ml، ۸، ۱۶، ۱۶ و ۳۲ بود، در حالی که MIC عصاره آبی برای Listeria monocytogenes، Bacillus cereus، Enterococcus faecalis، Salmonella typhi و Enterobacter aerogenes به ترتیب ۱۶ mg/ml، ۱۶، ۳۲، ۶۴ و ۶۴ بود(جدول ۲).

نتایج نشان می دهد MBC عصاره اتانولی مرزه بختیاری برای Listeria monocytogenes، Bacillus cereus، Enterococcus faecalis، Salmonella typhi و Enterobacter aerogenes به ترتیب ۱۶ mg/ml، ۳۲، ۳۲، ۶۴ و ۶۴ بود، در حالی که MBC عصاره آبی برای Listeria monocytogenes، Bacillus cereus، Enterococcus faecalis، Salmonella typhi و Enterobacter aerogenes به ترتیب ۳۲ mg/ml، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۱۲۸ بود(جدول ۳).

جدول۱. میانگین قطر هاله عدم رشد Enterococcus faecalis، Listeria monocytogenes، Bacillus cereus، Salmonella typhi و Enterobacter aerogenes برحسب میلی متر در حضور عصاره های اتانولی و آبی مرزه بختیاری (انتشار در آگار)

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ مرزه بختیاری (mg/ml) ۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰
اتانولی	Enterococcus faecalis	۱۱/۶۰±۰/۵۷^{a}	۱۳/۶۰±۰/۵۰^{b}	۱۴/۱۰±۰/۵۷^{b}	۱۵/۹۰±۰/۵۷^{d}	۱۶/۹۰±۰/۵۷^{d}	۱۸/۵۰±۰/۵۰^{f}	۲۰/۰۰±۰/۵۷^{f}	۲۲/۱۰±۰/۵۲^{h}
اتانولی	Listeria monocytogenes	۹/۲۰±۰/۵۰^{a}	۱۲/۶۰±۰/۵۷^{b}	۱۳/۱۰±۰/۲۸^{b}	۱۴/۹۰±۰/۵۰^{d}	۱۵/۴۰±۰/۵۰^{d}	۱۷/۶۰±۰/۵۵^{f}	۱۸/۰۰±۰/۲۸^{f}	۱۸/۸۰±۰/۲۸^{h}
اتانولی	Bacillus cereus	۸/۶۰±۰/۵۷^{a}	۱۲/۴۰±۰/۲۸^{b}	۱۳/۰۰±۰/۵۷^{b}	۱۳/۸۰±۰/۵۷^{d}	۱۴/۲۰±۰/۵۷^{d}	۱۶±۰/۵۳^{f}	۱۶/۹۰±۰/۵۷^{f}	۱۸/۷۰±۰/۵۰^{h}
اتانولی	Salmonella typhi	-	-	-	-	-	-	۸/۳۰±۰/۴۵^{g}	۹/۷۰±۰/۵۰^{g}
اتانولی	Enterobacter aerogenes	-	-	-	-	-	-	۷/۷۰±۰/۵۰^{g}	۸/۰۰±۰/۲۸^{g}
آبی	Enterococcus faecalis	۹/۸۰±۰/۵۷^{a}	۱۱/۸۰±۰/۵۲^{b}	۱۳/۶۰±۰/۵۰^{c}	۱۴/۰۰±۰/۵۰^{c}	۱۵/۹۰±۰/۵۷^{d}	۱۶/۴۰±۰/۵۰^{d}	۱۸/۲۰±۰/۵۷^{g}	۱۹/۴۰±۰/۵۲^{g}
آبی	Listeria monocytogenes	۸/۴۰±۰/۲۸^{a}	۱۱/۱۰±۰/۵۷^{b}	۱۲/۹۰±۰/۲۸^{c}	۱۳/۱۰±۰/۵۰^{c}	۱۴/۹۰±۰/۲۸^{d}	۱۵/۳۰±۰/۵۰^{d}	۱۷/۱۰±۰/۵۷^{g}	۱۸/۰۰±۰/۵۲^{g}
آبی	Bacillus cereus	-	۱۰/۰۰±۰/۵۲^{b}	۱۱/۸۰±۰/۵۷^{c}	۱۲/۳۰±۰/۲۸^{c}	۱۳/۲۰±۰/۵۷^{d}	۱۴/۰۰±۰/۲۸^{d}	۱۵/۸۰±۰/۵۰^{g}	۱۶/۳۰±۰/۲۸^{g}
آبی	Salmonella typhi	-	-	-	-	-	-	۸/۰۰±۰/۲۸^{g}	۹/۶۰±۰/۵۰^{g}
آبی	Enterobacter aerogenes	-	-	-	-	-	-	۶/۶۰±۰/۲۸^{g}	۷/۴۰±۰/۵۷^{g}

- علامت (-) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی مرزه بختیاری می باشد.
- حروف مشابه در یک ردیف نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار بودن در سطح $p < 0/05$ است.

جدول۲. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره های اتانولی و آبی مرزه بختیاری بر Enterococcus faecalis، Listeria monocytogenes، Bacillus cereus، Salmonella typhi و Enterobacter aerogenes

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ مرزه بختیاری (mg/ml) ۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	کنترل
اتانولی	Enterococcus faecalis	-	-	+	+	+	+	-
اتانولی	Listeria monocytogenes	-	-	+	+	+	+	-
اتانولی	Bacillus cereus	-	-	-	+	+	+	-
اتانولی	Salmonella typhi	-	-	-	+	+	+	-
اتانولی	Enterobacter aerogenes	-	-	-	-	+	+	-
آبی	Enterococcus faecalis	-	-	-	+	+	+	-
آبی	Listeria monocytogenes	-	-	-	+	+	+	-
آبی	Bacillus cereus	-	-	-	-	+	+	-
آبی	Salmonella typhi	-	-	-	-	-	+	-
آبی	Enterobacter aerogenes	-	-	-	-	-	+	-

+: عدم رشد -: رشد

جدول۳. نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره های اتانولی و آبی مرزه بختیاری بر Enterococcus faecalis، Listeria monocytogenes، Bacillus cereus، Salmonella typhi و Enterobacter aerogenes

نوع عصاره	میکروارگانیسم	غلظت عصاره برگ مرزه بختیاری (mg/ml)								
		۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸	۲۵۶	کنترل
اتانولی	Enterococcus faecalis	-	-	-	+	+	+	+	+	-
اتانولی	Listeria monocytogenes	-	-	-	-	+	+	+	+	-
اتانولی	Bacillus cereus	-	-	-	-	+	+	+	+	-
اتانولی	Salmonella typhi	-	-	-	-	-	+	+	+	-
اتانولی	Enterobacter aerogenes	-	-	-	-	-	+	+	+	-
آبی	Enterococcus faecalis	-	-	-	-	+	+	+	+	-
آبی	Listeria monocytogenes	-	-	-	-	+	+	+	+	-
آبی	Bacillus cereus	-	-	-	-	-	+	+	+	-
آبی	Salmonella typhi	-	-	-	-	-	-	+	+	-
آبی	Enterobacter aerogenes	-	-	-	-	-	-	+	+	-

+: عدم رشد -: رشد

بحث

وجود ترکیبات ثانویه در گیاهان دارویی سبب شده که در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای را به خود جلب کنند. به ویژه وجود ترکیبات ضد میکروبی موجود در گیاهان دارویی اهمیت این گیاهان را برای تولید آنتی بوتیک-های طبیعی و جدید در علوم پزشکی دو چندان ساخته است.

با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌توان بیان نمود که عصاره اتانولی در مقایسه با عصاره آبی مرزه بختیاری دارای قدرت مهارکنندگی بیش تری است که این امر ممکن است به علت استخراج بیشتر مواد موثر در مرزه بختیاری به وسیله اتانول می‌باشد. نتایج نشان داد که میزان درصد استحصال عصاره (وزن خشک عصاره) هنگامی که از حلال اتانول ۹۶ درجه استفاده شد به میزان ۵ درصد بیش تر از زمانی بود که از آب به عنوان حلال استفاده شد لذا این اختلاف ۵ درصد وزن خشک را می‌توان دلیلی برای اثر بازدارندگی بیش تر عصاره اتانولی ذکر نمود. Heidari و هم کاران اثر ضد میکروبی عصاره‌های آبی و اتانولی مرزه بختیاری را بر Escherichia coli و Staphylococcus aureus بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره اتانولی مرزه بختیاری اثر بازدارندگی بیش تری بر سوش‌های مورد مطالعه دارد(۱۵). این نتیجه با یافته‌های این پژوهش هم‌خوانی دارد. در پژوهش دیگری Sureshjani و هم کاران اثر ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی، متانولی، گلیسیرینی و آبی مرزه بختیاری را بر Staphylococcus epidermidis، Streptococcus pyogenes وPseudomonas aeruginosa بررسی کردند. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی و متانولی مرزه بختیاری نسبت به عصاره آبی اثر بازدارندگی بیش تری دارد، این محققان دلیل اثر بازدارندگی بیش تر عصاره‌های اتانولی و متانولی را استخراج بیش تر مواد موثر در مرزه بختیاری توسط این حلال‌ها ذکر نمودند(۱۶).

بیش ترین قطر هاله بازدارندگی مربوط به عصاره اتانولی مرزه بختیاری بر باکتری گرم مثبت Enterococcus faecalis بود. نتایج تحلیل آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) نشان داد که با افزایش غلظت عصاره اتانولی مرزه بختیاری قطر هاله عدم رشد به طور معنی داری در سطح $P < ۰/۰۵$ افزایش یافت. هم چنین بر اساس نتایج حاصل از مقایسه دو به دو میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن، وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار میانگین قطر عدم رشد غلظت‌های مختلف را می‌توان به مقدار ماده مؤثر موجود در عصاره‌ها نسبت داد. ولی به طوری کلی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه مرزه بختیاری میزان قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا می‌کند.

نتایج نشان داد در سطح معنی دار $P < ۰/۰۵$ بیش ترین مقاومت نسبت به عصاره‌های اتانولی و آبی مرزه بختیاری مربوط به Salmonella typhi و Enterobacter aerogenes بود. هم چنین بیش ترین حساسیت به عصاره های اتانولی و آبی مربوط به Enterococcus faecalis بود. Pirbalouti و هم کاران اثر ضد باکتریایی اسانس مرزه بختیاری را روی باکتری‌های Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa و Klebsiella pneumonia را بررسی کردند. نتایج نشان داد که حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) اسانس مرزه بختیاری بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های مورد آزمایش در مقایسه با اسانس دیگر گیاهان به طور معنی داری کم تر می باشد(۱۷).

نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های آبی و اتانولی مرزه بختیاری نشان داد، بیش ترین مقاومت مربوط به باکتری های گرم منفی Salmonella typhi وEnterobacter aerogenes بود. اثر ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی و آبی مرزه بختیاری ارتباط مستقیمی به نوع میکروارگانیسم دارد، به طوری که باکتری های گرم مثبت Listeria monocytogenes، Bacillus cereus وEnterococcus faecalis در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی Salmonella typhi و Enterobacter aerogenes حساسیت بیش تری داشتند (جدول۲) و در غلظت کم تری از عصاره‌های آبی و اتانولی مرزه بختیاری اثر بازدارندگی نشان دادند. علت آن اختلاف ساختمانی دیواره باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی می باشد، این امر در نتایج سایر محققان هم گزارش شده است(۱۸ و ۱۹).

در طی مطالعات آزمایشگاهی که توسط Adiguzel و هم کاران انجام گرفت مشخص گردید که اسانس مرزه بختیاری می‌تواند به عنوان فرآورده-ای آنتی‌سپتیک در درمان عفونت‌های باکتریایی و قارچی به کار گرفته شود(۲۰). Dadfar و هم کاران اثر ضد باکتری اسانس چند گیاه دارویی انحصاری ایران علیه سودوموناس ائروژینوزا را بررسی کردند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد اسانس مرزه بختیاری موثرترین اسانس انتخابی بود و از این رو این اسانس می تواند به عنوان یک طعم دهنده و نگه دارنده طبیعی جای گزین نگه دارنده های سنتزی در صنعت غذا به خصوص تولید و فرآوری گوشت به کار رود(۲۱).

Teimori با تجزیه اسانس مرزه بختیاری نشان داد که ترکیبات فنلی کارواکرول و تیمول ترکیبات عمده اسانس مرزه بختیاری را تشکیل می دهند که با توجه به اثر ضد میکروبی این ترکیبات می‌توان نتیجه گرفت که میزان اثر ضد میکروبی این اسانس بستگی به میران ترکیبات فنلی کارواکرول و تیمول دارد(۲۲).

نتیجه گیری

با توجه به ایجاد افزایش مقاومت دارویی نسبت به داروهای ضد میکروبی شیمیایی، توجه بیش تری به استفاده از گیاهان دارویی شده است. در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش می توان بیان نمود که عصاره مرزه بختیاری در شرایط "in vitro"دارای فعالیت ضد باکتری قابل ملاحظه‌ای بر روی سویه‌های مورد مطالعه داشت. بدون شک انجام مطالعات بالینی در این زمینه پیش نهاد می‌گردد تا بتوان این عصاره را به عنوان یک ماده ضد میکروبی طبیعی و جدید معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد که در تامین هزینه های این طرح با کد ۱۶۱۳۵ که در شورای پژوهشی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد به تصویب رسید و در اجرای آن ما را یاری نموده‌اند صمیمانه تشکر و قدر دانی می نماییم.

REFERENCES

1. Akhondzadeh Basti, A, Misaghi, A, Gheibi, S. Effect of Zataria multiflora Boiss essential oil on Log probability percentage of growth of Bacillus cereus in Brain & Heart Infusion Broth. J Med Plants. 2005; 4 (16): 48-55.

2. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(4): 564-82.

3. Sefidkon F, Abbasi K, Jamzad Z, Ahmadi S. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of Satureja rechingeri Jamzad. Food Chemi. 2007; 100(3): 1054-8.

4. Sefidkon F, Jamzad Z. Chemical composition of the essential oil of three Iranian Satureja species (S. mutica , S. macrantha and S. intermedia). Food Chemi. 2005; 91(1): 1-4.

5. Sefidkon F, Jamzad Z. Essential oil composition of Satureja spicigera (C. Koch) Boiss. from Iran. Flavour and Frag J. 2004; 19(6): 571-3.

6. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Food microbiology: fundamentals and frontiers: ASM Press Washington, DC. 2001; 10-100.

7. Das K, Tiwari R, Shrivastava D. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. J Med plants Rese. 2010; 4(2): 104-11.

8. Sattari M, Shahbazi A, Najarpyrayh SH. Antibacterial effect of aqueous andalcoholic extracts of eucalyptus on Pseudomonas aeruginosa. Modares J Med Sci. 2005; 8: 19-23.

9. Babayi H, Kolo I, Okogun J, Ijah U. The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. Biokemistri. 2004; 16(2): 106-11.

10. Bauer A, Kirby W, Sherris JC, turck, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Ameri J Clin Patho. 1966; 45(4): 493-6.

11. Benger S, Townsend P, Ashford RL, Lambert P. An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of Melaleuca alternifolia against the dermatophyte Trichophyton rubrum. The Foot. 2004; 14(2): 86-91.

12. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method. J Antimicro Chemo. 2001; 48(1): 43-57.

13. Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totté J, Pieters L, Vlietinck A. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. J Ethnopharmaco. 1999; 65(1): 71-7.

14. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for Aspergillus spp.: NCCLS collaborative study. J Clin Microbio. 2002; 40(9): 3204-8.

15. Heidari Sureshjani M, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Shahidi F, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial effect of Satureja bachtiarica extracts aqueous and ethanolic on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Sci J Biologi Sci. 2013; 2(2): 24-31.

16. Heidari Sureshjani M, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Shahidi F, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial effect of Satureja bachtiarica extracts aqueous, ethanol, methanol and glycerin on Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. Sci J Micro. 2013; 2(2): 53-60.

17. Pirbalouti AG, Malekpoor F, Enteshari S, Yousefi M, Momtaz H, Hamedi B. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by Bakhtiari tribal in Southwest Iran. Inter J Biology. 2010; 2(2): 55-6.

18. Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial effect of aqueous and ethanolic extracts Teucrium polium L. on Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis. Sci J Biologi Sci. 2013; 2(3): 54-61.

19. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mortazavi A. Antimicrobial effects of Lavandula stoechas L. and Rosmarinus officinalis L. extracts on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Sci J Micro. 2013; 2(1): 15-22.

20. Adiguzel A, Ozer H, KiliC H, CetiN B. Screening of antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of Satureja hortensis on foodborne bacteria and fungi. Czech J Food Sci. 2007; 25(2): 81-8.

21. Dadfar SH, Pyrblvty Ghasemi A, Mirlohi M, Hojjat alaslami M, Hamedi B. Antibacterial activity of essential oils of some medicinal plants against Pseudomonas aeruginosa isolated from beef exclusively. Herbal Reme. 2012; 3(1): 35-40.

22. Teimori M. Essential oil analysisand antibacterial activity of Satureja bachtiarica bunge in ardebile province. J of Plant Sci Rese. 2009; 4(2): 19-26.