2 nd National Conference on
Bioscience Innovation
and Technology, Iranian Chemistry
دومین کنفرانس ملی نوآوری و فناوری
علوم زیستی و شیمی ایران
www.bc.bcnf.ir CDIS ۱۱ تیر ۱۳۹۹- تهران

تغییرات فنولوژیک در ترکیب شیمیایی اسانس گیاه مریم گلی مشهدی (*Salvia leriifolia* Benth.) و خاصیت ضد باکتری آن در برابر میکروب‌های دهانی

پروانه ابریشم چی*[۱]، آرزو ذاکر [۲]، ریحانه هوشیار سرجامی[۳]، جواد اصیلی[۴]، مهرانگیز خواجه کرم الدینی[۵]، حسن پرسا[۶]

۱. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران abrisham@um.ac.ir

۲. استادیار، گروه آموزش زیست شناسی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

۳. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۴. استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۵. استاد، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۶. کارشناس پژوهشی، گروه پژوهشی بقولات، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

گیاه دارویی مریم گلی مشهدی با نام علمی *Salvia leriifolia* Benth. بومی ایران است که خواص دارویی متعددی برای آن گزارش شده است. هدف از این پژوهش، ارزیابی اسانس گیاه در مراحل مختلف فنولوژی و اثر ضد باکتری آن بر عوامل بیماری‌زای دهانی به منظور امکان استفاده از آن در ترکیب دهان‌شویه‌ها بود. محتوای شیمیایی اسانس برگ در مراحل مختلف رویشی، گل‌دهی و بذردهی از طریق آنالیز GC/MS ارزیابی شد. سپس اثر ضد باکتری غلظت‌های مختلف اسانس بر باکتری‌های *Streptococcus mutans*، *Streptococcus pyogenes*، *Streptococcus sanguis* و *Actinomyces viscosus*، با روش‌های آگار دیفیوژن، آگار دایلوشن و ماکرودایلوشن بررسی و با دهان‌شویه‌های کلرهگزیدین و ستیل پیریدینیوم مقایسه شد. ترکیبات بتا-پینن، آلفا-مورولول، آلفا-پینن، ۱ و ۸-سینئول، گاما-کادینن و ارمولیگنول عمده‌ترین اجزای تشکیل دهنده اسانس بودند. اسانس گیاه در تمام مراحل فنولوژی از رشد باکتری‌ها ممانعت کرد. بیشترین و کمترین اثر ممانعت از رشد باکتری، به ترتیب در باکتری‌های *Streptococcus mutans* و *Streptococcus pyogenes* مشاهده شد. قطر هاله ممانعت از رشد ناشی از تأثیر اسانس، در بیشتر مراحل فنولوژی، نسبت به کلرهگزیدین و ستیل پیریدینیوم بیشتر بود. بیشترین فعالیت ضد میکروبی در اسانس حاصل از مرحله گل‌دهی و بذردهی ارزیابی شد. حداقل غلظت بازدارنده از رشد باکتری‌های در معرض اسانس، جز در مورد باکتری استرپتوکوکوس موتانس، در بیشتر تیمارها، مشابه کلرهگزیدین بود. اسانس در بیشتر مراحل رشد، فعالیت باکتریوسایدی یکسان و در اغلب موارد، عملکردی قابل مقایسه با کلرهگزیدین داشت. اسانس مریم گلی مشهدی قابلیت مهار رشد میکروب‌های دهانی را دارد و می‌تواند گزینه مناسبی در تولید دهان‌شویه‌هایی با منشا گیاهی باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، باکتری‌های دهان، ضدباکتری، فنولوژی، مریم گلی مشهدی

مقدمه

پوسیدگی دندان و بیماری‌های پریودنتال، از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی دهان و دندان در سطح جهان هستند که از فعالیت عوامل بیماری‌زای دهانی نظیر استرپتوکوکوس‌ها (*Streptococcus*) و تخریب موضعی بافت‌های سخت دندان توسط فرآورده‌های اسیدی حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها ایجاد می‌شوند [۱]. بنابراین کاهش و یا حذف باکتری‌های بیماری‌زای دهان در جلوگیری از بیماری‌های دهانی، پوسیدگی دندان و سلامت بدن حائز اهمیت است [۲، ۳]. دهان شویه‌هایی که امروزه مصرف می شوند، اغلب منشاء شیمیایی دارند و علیرغم اثر مثبت در جلوگیری از پوسیدگی دندان، اثرات جانبی نامطلوبی نظیر مزه نامناسب، مقاوم‌سازی میکروارگانیسم‌ها و تغییر رنگ دندان نیز دارند [۲، ۴، ۵، ۶، ۷]. لذا استفاده از ترکیباتی با منشا گیاهی، به عنوان عوامل درمانی جدید و فاقد اثرات نامطلوب آنتی بیوتیک های سنتزی، جهت جلوگیری از تشکیل پلاک دندانی، پوسیدگی دندان، کاهش التهاب لثه و مقابله با عفونت های دهانی، پیشنهاد شده است.

در بین فرآورده‌های طبیعی گیاهی که خاصیت ضد میکربی دارند، اسانس‌های گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند و یافته‌های متعددی در رابطه با فعالیت ضد میکروبی آن‌ها در برابر میکروارگانیسم‌های مختلف ارائه شده است [۳، ۵، ۸، ۹]. علیرغم بررسی‌های متعدد انجام شده بر روی خاصیت ضد میکربی اسانس‌ها، گزارش‌های محدودی در رابطه با کاربرد آن‌ها جهت پیشگیری و مبارزه با عفونت‌های دهان و دندان و استفاده در فرمولاسیون دهان شویه‌های ضد پلاک و ضد التهاب لثه وجود دارد [۳، ۵، ۶، ۸، ۱۰].

گیاهان جنس مریم گلی (*Salvia*) به واسطه داشتن مقادیر قابل توجه اسانس و هم چنین دارا بودن خواص ضد میکروبی، از دیرباز مورد توجه بوده اند [۱۱]. تاکنون گزارش‌های متعددی مبنی بر اثر مهار کننده اسانس گونه‌های مختلف *Salvia* از جمله گونه‌های *S. officinalis*، *S. bracteata* [۱۲، ۱۳]، *S. potentillifolia* [۱۴]، *S. hydrangea* [۱۵]، *S. oligophylla*، *S. atropatana* [۱۶]، *S. chloroleuca* [۱۷] بر رشد انواع باکتری‌های گرم مثبت و منفی ارائه شده است.

گیاه مریم گلی مشهدی با نام علمی *Salvia leriifolia* Benth.، گونه‌ای علفی، پایا و بومی ایران است [۱۸] که دارای خاصیت ضد التهاب [۱۹]، ضد میکروب، آرام‌بخش [۲۰]، ضد درد [۲۱] و آنتی‌اکسیدان [۲۲] می‌باشد. بررسی اولیه محققین مطالعه پیش رو، حاکی از اثر مهارکنندگی اسانس بخش هوایی این گونه گیاهی در مرحله گل‌دهی، بر روی برخی از باکتری‌های بی‌هوازی مولد عفونت‌های دهانی و حلقی بود [۲۳]. لذا در راستای تکمیل بررسی قبلی، در پژوهش حاضر، ابتدا ویژگی‌های کمی و کیفی اسانس حاصل از برگ گیاه مریم گلی مشهدی در مراحل مختلف رشد و نمو (مراحل رویشی، گل‌دهی و بذردهی) شناسایی شد. سپس ارتباط بین خاصیت ضدمیکروبی اسانس (بر علیه برخی باکتری‌های دهانی) با مراحل زندگی گیاه (فنولوژی) تعیین و با تأثیر دهان‌شویه‌های تجاری مقایسه گردید تا امکان استفاده بهینه از اسانس به عنوان یک ترکیب طبیعی در مقابله با عفونت‌های دهانی مشخص شود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی و استخراج اسانس

گیاه مریم گلی مشهدی در مراحل مختلف فنولوژی (رویشی، گل‌دهی و بذردهی) از شهرستان بجستان واقع در استان خراسان رضوی (طول جغرافیایی"۴۰/۴ ′۷ °۳۶ و عرض جغرافیایی "۳۴/۷ ′۵۰ °۵۹) جمع آوری و پس از شناسایی در هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، با شماره هرباریومی ۱۲۸۳۵نگهداری شد.

اسانس موجود در ۲۵۰ گرم پودر برگ خشک گیاه مریم گلی مشهدی، به مدت ۴ ساعت توسط دستگاه کلونجر (مدل MS-E 107) به روش تقطیر با بخارآب، استخراج و پس از رطوبت‌زدایی با سولفات سدیم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید [۲۴].

شناسایی اجزای سازنده اسانس به روش کروماتوگرافی گازی/ طیف سنجی جرمی (GC/MS)

کیفیت و کمیت اجزای اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Varian 3400 دارای آشکارساز طیف سنج جرمی چهارقطبی و مجهز به ستون DB-5 (طول ۶۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر) تعیین شد. هلیوم (درجه خلوص ۹۹/۹۹) به عنوان گاز حامل استفاده شد. حرارت ستون، از ۶۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵ درجه در دقیقه افزایش یافت و دمای اتاقک تزریق بر روی ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. شناسایی ترکیبات موجود در اسانس، بر اساس شاخص بازداری (Retention Index) طیف‌های جرمی حاصل و مقایسه آن‌ها با استانداردهای موجود در مراجع (Wiley) و داده‌های موجود در کتابخانه GC-MS صورت گرفت [۲۴].

ارزیابی فعالیت ضد باکتری اسانس

باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس (*Streptococcus mutans*) (PTCC 1683)، استرپتوکوکوس پیوژنز (*Streptococcus pyogenes*) (PTCC 1447)، استرپتوکوکوس سانگوئیس (Streptococcus *sanguis*) (PTCC 1449) و اکتینومایسس ویسکوزوس (*Actinomyces viscosus*) (PTCC 1202)، از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند و پس از فعال‌سازی و تهیه سوسپانسیون میکروبی با غلظت ۱/۵ × ۱۰^۸ cfu/mL (Colony forming unit/mL)، مورد استفاده قرار گرفتند [۲۵].

اثر ضد باکتری غلظت‌های مختلف اسانس (۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، با روش‌های آگار دیفیوژن، آگار دایلوشن و ماکرودایلوشن بررسی شد. باکتری‌ها در محیط کشت Blood agar با استفاده از سوسپانسیون میکروبی با غلظت معادل ۰/۵ مک فارلند (۱/۵×۱۰^۸ cfu/mL) کشت شدند. سپس با استفاده از سیلندر استریل، چاهک‌هایی با قطر تقریبی ۶ میلی‌متر درون آگار ایجاد و با ۳۰ میکرولیتر از غلظت‌های مورد بررسی از اسانس و یا دهان‌شویه‌های تجاری کلرهگزیدین و محلول ستیل پیریدینیوم پر شدند. دو روز پس از قرارگیری کشت‌ها در دمای ۳۷°C، قطر هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت [۲۵].

برای شمارش کلنی باکتریایی، سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند به لوله‌های حاوی محیط کشت Blood agar استریل و غلظت‌های مختلف اسانس، تلقیح شد. بعد از مدت زمان ۱۵ دقیقه (resting time)، حجم ۰/۰۱ میلی‌لیتر از هر لوله به محیط کشت Blood agar اضافه گردید. پس از قرارگیری نمونه‌ها در جار بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۸ ساعت، کلنی‌های باکتری شمارش و به صورت cfu/mL گزارش شدند [۲۶].

برای تعیین حداقل غلظت باردارندگی یا MIC (Minimum Inhibitory Concentration) محیط کشت Blood agar (۵ میلی‌لیتر) حاوی غلظت‌های مورد بررسی اسانس و یا دهان‌شویه‌های کلرهگزیدین و ستیل پیریدینیوم تهیه و ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت ۵×۱۰^۶ میکروارگانیسم در میلی‌لیتر بر روی آن کشت داده شد. برای شاهد مثبت، از کشت سوسپانسیون میکروبی با غلظت مشابه بر روی محیط کشت Blood agar، فاقد اسانس و دهان‌شویه، استفاده شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد باکتری‌ها بررسی و حداقل غلظتی از اسانس یا دهان‌شویه که در آن غلظت رشد باکتری مشاهده نشد، تحت عنوان MIC محاسبه گردید [۲۵].

حداقل غلظت کشنده باکتری با عنوان MBC (Minimum Bactericidal Concentration) بر اساس دستورالعمل CLSI تعیین شد [۲۹]. ابتدا محلول پایه ۱۰۰ میلی گرم در میلی‌لیتر از اسانس تهیه و سپس رقت‌های متوالی در محدوده ۶/۲۵ تا ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس آماده گردیدند. سوسپانسیون میکروبی حاوی ۵×۱۰^۶ میکروارگانیسم در میلی-

لیتر به محیط کشت استریل Brain Heart Infusion Broth، حاوی غلظت‌های مورد بررسی از اسانس تلقیح شد. پس از قرارگیری لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در جار بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۲۵ میکرولیتر از هر لوله بر روی محیط کشت Blood agar کشت شد و ۴۸ ساعت بعد، نتایج مورد بررسی قرار گرفت [۲۸].

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری MSTAT (نسخه ۲/۱) صورت گرفت و میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

به طور کلی، با استفاده از تکنیک GC/MS، ۳۵ ترکیب مختلف در اسانس برگ‌های مریم گلی مشهدی شناسایی شد. ترکیبات اصلی اسانس، بتا-پینن، آلفا- مورولول، آلفا- پینن، ۱ و ۸-سینئول، گاما- کادینن و ارمولیگنول بودند و مقدار آن-ها با توجه به مرحله رشد و نمو، کمی متفاوت بود. در مرحله رویشی، بتا- پینن، آلفا- پینن و آلفا- مورولول (به ترتیب ۴۲/۷۴، ۱۷/۷۱ و ۱۰/۶۵ درصد)، در زمان گل‌دهی، بتا- پینن، آلفا- مورولول و آلفا- پینن (به ترتیب ۲۳/۳۵، ۱۷/۱۱ و ۱۴/۱۳ درصد) و در مرحله بذردهی، آلفا- مورولول، گاما- کادینن و بتا- پینن (به ترتیب ۱۶/۱۰، ۱۳/۷۲ و ۱۳/۵۳ درصد) اجزای عمده اسانس را تشکیل می‌دادند. با افزایش سن برگ، مقدار مونوترپن‌های هیدروکربنه کاهش ولی مقدار مونوترپن-های اکسیژن‌دار، سزکوئی‌ترپن‌های هیدروکربنه و سزکوئی‌ترپن‌های اکسیژن‌دار افزایش یافت (جدول ۱).

جدول ۱. نام و درصد ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس برگ گیاه مریم گلی مشهدی در مراحل مختلف رشد و نمو.

شماره	نام ترکیب	RT*	RI**	مقدار (٪)		
				V	F	S
۱	α-Thujene	۹/۵۰	۹۳۹	-	۰/۱۰	۰/۰۸
۲	α-Pinene	۹/۸۰	۹۴۹	۱۷/۷۱	۱۴/۱۳	۷/۹۰
۳	Camphene	۱۰/۱۷	۹۶۲	۰/۶۴	۰/۹۵	۰/۸۵
۴	Sabinene	۱۰/۷۳	۹۸۰	-	۰/۰۵	۰/۰۶
۵	β-Pinene	۱۰/۹۸	۹۸۲	۴۲/۷۴	۲۳/۳۵	۱۳/۵۳
۶	Myrcene	۱۱/۰۱	۹۹۰	-	-	۰/۲۱
۷	δ-3-Carene	۱۱/۷۳	۱۰۱۵	۰/۲۷	۰/۲۸	۰/۱۹
۸	α-Terpinene	۱۱/۸۵	۱۰۲۱	-	t***	t***
۹	Paracymene	۱۲/۰۶	۱۰۲۸	-	۰/۱۰	۰/۰۷
۱۰	1,8-Cineole	۱۲/۳۷	۱۰۳۹	۸/۶۴	۱۳/۲۵	۱۲/۱۴
۱۱	γ-Terpinene	۱۳/۰۱	۱۰۶۳	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۰۹
۱۲	cis-Sabinenehydrate	۱۳/۲۴	۱۰۷۱	-	-	t***
۱۳	Terpinolene	۱۳/۸۵	۱۰۹۳	-	t***	t***
۱۴	Borneol	۱۶/۲۱	۱۱۷۷	۱/۶۶	۲/۶۲	۳/۴۶

۱۵	Terpinene-4-ol	۱۶/۴۶	۱۱۸۶	۰/۲۲	۰/۲۳	۰/۲۲
۱۶	α-Terpineol	۱۶/۸۱	۱۱۹۸	۰/۶۷	۰/۵۵	۰/۶۵
۱۷	bornyl acetat	۱۹/۴۷	۱۲۹۳	۰/۰۵	۰/۱۰	۰/۱۲
۱۸	α-Copaene	۲۱/۲۹	۱۳۶۱	-	t***	۰/۰۵
۱۹	β-Cubebene	۲۲/۰۸	۱۳۹۱	-	۰/۰۶	۰/۱۲
۲۰	α-Gurjunene	۲۳/۰۶	۱۴۲۹	۰/۷۲	۰/۸۸	۲/۴۰
۲۱	α-Funebrene	۲۲/۴۰	۱۴۰۳	-	-	t***
۲۲	β-caryophyllene	۲۳/۳۵	۱۴۴۰	۱/۳۴	۱/۱۰	۲/۲۵
۲۳	α-Humulene	۲۴/۲۰	۱۴۷۴	۰/۳۰	۰/۲۰	۰/۳۱
۲۴	α-Acoradiene	۲۴/۳۸	۱۴۸۱	-	۰/۰۵	۰/۱۱
۲۵	γ-Murrolene	۲۴/۶۵	۱۴۹۲	۰/۲۰	۰/۲۵	۰/۵۹
۲۶	Germacrene-D	۲۴/۸۵	۱۵۰۰	-	۰/۱۳	۰/۲۷
۲۷	β-Selinene	۲۵/۰۲	۱۵۰۷	۰/۱۶	۰/۱۲	۰/۳۴
۲۸	α-Murrolene	۲۵/۲۲	۱۵۱۵	۰/۷۷	۰/۸۳	۲/۲۴
۲۹	γ-Cadinene	۲۵/۶۲	۱۵۳۲	۰/۵۳	۰/۸۹	۲/۷۴
۳۰	δ-Cadinene	۲۵/۸۰	۱۵۳۹	۴/۴۴	۸/۹۴	۱۳/۷۲
۳۱	Viridiflorol	۲۷/۹۱	۱۶۲۸	۰/۶۲	۰/۶۹	۱/۰۲
۳۲	Eremolignol	۲۸/۶۸	۱۶۶۲	۳/۶۹	۶/۴۸	۸/۹۹
۳۳	Epi- α-cadineol	۲۸/۸۴	۱۶۶۹	۱/۱۹	۱/۷۳	۲/۸۴
۳۴	α-Muurolol	۲۹/۰۱	۱۶۷۶	۱۰/۶۵	۱۷/۱۱	۱۶/۱۰
۳۵	Farnesol <(22,62)->	۳۰/۰۳	۱۷۲۲	۱/۳۹	۱/۶۷	۲/۱۳
	گروه‌های عمده ترکیبات					
	مونوترپن‌های هیدروکربنه			۶۱/۴۶	۳۹/۱۹	۲۳/۰۳
	مونوترپن‌های اکسیژن‌دار			۱۱/۲۴	۱۶/۷۵	۱۶/۶۱
	سزکوئی ترپن‌های هیدروکربنه			۸/۴۶	۱۳/۴۷	۲۵/۱۷
	سزکوئی ترپن‌های اکسیژن‌دار			۱۶/۹۸	۲۷/۶۸	۳۱/۰۸
	کل ترکیبات شناسایی شده			۹۸/۱۴	۹۷/۰۹	۹۵/۸۹

RT: زمان بازداری؛ **RI: شاخص بازداری (شاخص کواتس)؛ -t: ترکیبات کم تر از ۰/۰۵٪؛ V: مرحله رویشی؛ F: مرحله گل‌دهی؛S : مرحله بذردهی.**

اسانس حاصل از برگ گیاه در مراحل رویشی، گل‌دهی و بذردهی، به صورت وابسته به غلظت، از رشد باکتری‌های مورد مطالعه ممانعت کرد و از این نظر، غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس، مناسب‌ترین غلظت‌ها در مهار رشد باکتری‌ها بودند (جدول ۲). باکتری استرپتوکوکوس موتانس، بیشترین حساسیت را به اسانس در مراحل گل‌دهی و بذردهی، در تمام غلظت‌های مورد بررسی، نشان داد. در حالی که استرپتوکوکوس پیوژنز مقاوم‌ترین باکتری بود.

مقایسه اثر ضد باکتری اسانس با دهان‌شویه‌های تجاری کلرهگزیدین و ستیل پیریدینیوم نیز، دال بر اثر بازدارندگی چشمگیر اسانس بر رشد باکتری‌های دهانی و مواردی، برتری معنی‌دار آن نسبت به غلظت‌های مشابه از دهان‌شویه‌ها بود (جدول ۲). تأثیر غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسانس، در مرحله بذردهی (به ترتیب با قطر هاله ممانعت از رشد ۱۰/۱۷ و ۱۴/۵۰ میلی‌متر) در بازدارندگی از رشد استرپتوکوکوس موتانس به طور معنی‌داری بیشتر از کلرهگزیدین

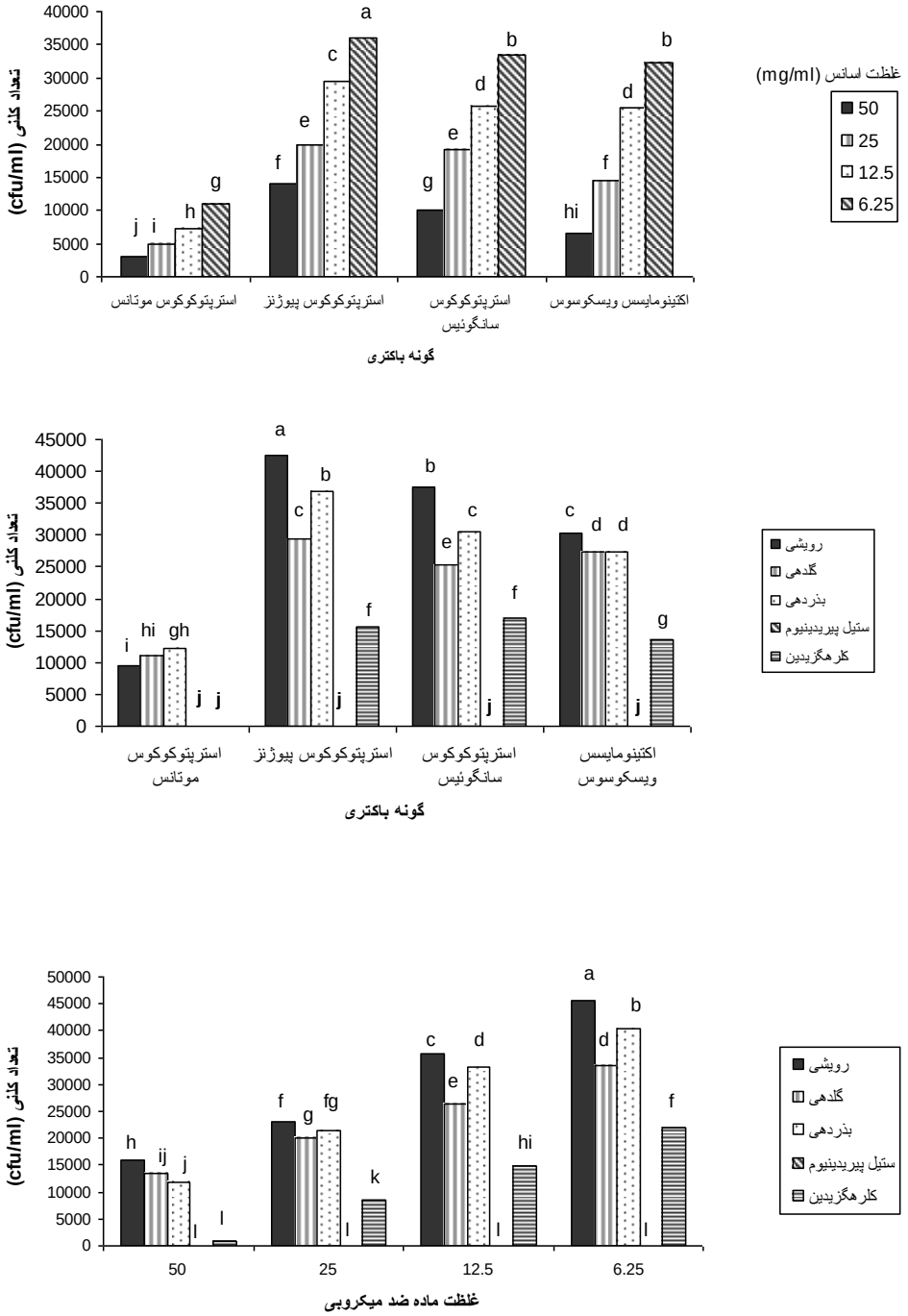
(به ترتیب با قطر هاله ممانعت از رشد ۷/۵۰ و ۱۰/۵۰ میلی‌متر) و ستیل پیریدینیوم (به ترتیب با قطر هاله ممانعت از رشد ۴/۵۰ و ۶/۵۰ میلی‌متر) بود (جدول ۲). بیشترین بازدارندگی از رشد باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز مربوط به اسانس گیاه در مرحله گل‌دهی بود که اثر قویتری نسبت به دهان‌شویه‌های تجاری مورد بررسی داشت. در مورد استرپتوکوکوس سانگوئیس، اسانس مرحله رویشی (غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تأثیر بازدارنده بارزتری (قطر هاله ممانعت از رشد باکتری ۱۰/۱۷ میلی‌متر) نسبت به اسانس گیاه در دو مرحله دیگر از فنولوژی داشت و به طور معنی‌داری، موثرتر از دهان-شویه کلرهگزیدین (۶/۵۰ میلی‌متر) و ستیل پیریدینیوم (۵/۵۰ میلی‌متر) عمل کرد. اکتینومایسس ویسکوزوس در حضور اسانس برگ گیاهانی که در مرحله رشد رویشی بودند، کمترین رشد را نشان داد (جدول ۲) و قطر هاله ممانعت از رشد این باکتری در حضور تمام غلظت‌های اسانس این مرحله، به طور معنی‌داری بیشتر از قطر هاله ایجاد شده توسط کلرهگزیدین و قابل مقایسه با ستیل پیریدینیوم بود. برای مثال، در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس مرحله رشد رویشی، هاله‌ای با قطر ۹/۶۷ میلی‌متر مشاهده شد، در حالی‌که قطر هاله برای کلرهگزیدین ۷/۱۷ و برای ستیل پیریدینیوم ۹/۵۰ میلی‌متر اندازه گیری شد. غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس مرحله گل‌دهی، در مهار رشد اکتینومایسس ویسکوزوس، قوی‌تر از کلرهگزیدین عمل کردند. اگرچه همه غلظت‌های اسانس حاصل از این مرحله از رشد گیاه، از نظر ممانعت از رشد این باکتری، عملکردی مشابه ستیل پیریدینیوم داشتند.

بر اساس نتایج حاصل از شمارش تعداد کلنی، در تمام باکتری‌های مورد مطالعه، کمترین تعداد کلنی در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس مشاهده شد (شکل ۱-الف). علاوه بر این، باکتری استرپتوکوکوس موتانس با کمترین تعداد کلنی، و استرپتوکوکوس پیوژنز با بیشترین تعداد کلنی، به ترتیب، به عنوان حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری نسبت به اسانس تعیین شدند (شکل ۱-ب). در حضور دهان‌شویه‌های ستیل پیریدینیوم و کلرهگزیدین، هیچ کلنی باکتریایی مشاهده نشد. مراحل مختلف فنولوژی نیز، اثر معنی‌داری بر ویژگی ضد باکتریایی اسانس داشت و اثر بازدارندگی اسانس مرحله گل‌دهی قوی‌تر از مراحل رویشی و بذردهی بود. (شکل ۱-ج).

جدول ۲- تأثیر اسانس برگ مریم گلی مشهدی، در مراحل مختلف رشد و نمو گیاه، بر باکتری‌های دهانی در مقایسه با دهان‌شویه‌های کلرهگزیدین و ستیل پیریدینیوم.

غلظت اسانس (mg/mL)	استرپتوکوکوس موتانس					استرپتوکوکوس پیوژنز					استرپتوکوکوس سانگوئیس					اکتینومایسس ویسکوزوس				
	V	F	S	C	CH	V	F	S	C	CH	V	F	S	C	CH	V	F	S	C	CH
۵۰	۷/۶۷	۱۲/۵۰	۱۴/۵۰	۶/۵۰	۱۰/۵۰	۶/۳۳	۸/۵۰	۶/۸۳	۶/۰۰	۵/۶۷	۱۰/۱۷	۷/۵۰	۸/۰۰	۵/۵۰	۶/۵۰	۹/۶۷	۹/۱۷	۸/۵۰	۹/۵۰	۷/۱۷
	f-i	b	a	h-n	c	h-o	d-g	g-m	i-p	j-q	cd	f-i	e-h	k-r	h-n	cde	c-f	d-g	cde	g-k
۲۵	۵/۶۷	۱۰/۱۷	۱۰/۱۷	۴/۵۰	۷/۵۰	۵/۰۰	۶/۶۷	۴/۵۰	۳/۵۰	۴/۱۷	۷/۰۰	۵/۶۷	۵/۵۰	۳/۵۰	۴/۰۰	۷/۱۷	۷/۰۰	۵/۵۰	۶/۸۳	۵/۰۰
	j-q	cd	cd	p-v	f-i	n-u	h-n	p-v	t-[	q-x	g-l	j-q	k-r	t-[	q-y	g-k	g-l	k-r	g-m	n-u
۱۲/۵	۴/۱۷	۷/۳۳	۶/۳۳	۲/۵۰	۵/۰۰	۳/۶۷	۵/۱۷	۳/۱۷	۲/۰۰	۲/۳۳	۴/۶۷	۴/۶۷	۴/۰۰	۲/۳۳	۳/۱۷	۶/۳۳	۴/۳۳	۳/۸۳	۴/۳۳	۳/۵۰
	q-x	g-j	h-o	x-^	n-u	s-[	m-t	v-\	[-^	y-^	o-v	o-v	q-y	y-^	v-\	h-o	p-w	r-z	p-w	t-[
٦/۲۵	۲/۶۷	۵/۵۰	۴/۰۰	۱/۵۰	۳/۳۳	۲/۰۰	۳/۱۷	۱/۵۰	۱/۱۷	۱/۳۳	۳/۵۰	۳/۳۳	۳/۰۰	۱/۱۷	۲/۳۳	۵/۳۳	۳/۳۳	۳/۱۷	۴/۰۰	۲/۱۷
	w-^	k-r	q-y	\]^	u-[	[-^	v-\	\-^	^	]^	t-[	u-[	v-]	^	y-^	l-s	u-[	v-\	q-y	z-^

داده ها میانگین ۳ بار اندازه گیری قطر هاله ممانعت از رشد هستند. میانگین های واجد حداقل یک حرف مشترک، بر اساس آزمون**LSD**، تفاوت معنی داری ندارند ($p>0.05$). **V**: مرحله رویشی، **F** : مرحله گلدهی، **S**: مرحله بذردهی، **C**: ستیل پیریدینیوم ، **CH**: کلرهگزیدین؛ حروف معنی داری : **a-z[\]^**



شکل ۱. اثر متقابل نوع باکتری و غلظت اسانس (الف)، نوع باکتری و مراحل فنولوژی گیاه (ب)، غلظت اسانس و مراحل فنولوژی گیاه (ج) بر تعداد کلنی باکتریایی تشکیل شده در محیط کشت Blood agar. میانگین های واجد حداقل یک حرف مشترک، بر اساس آزمونLSD، تفاوت معنی داری ندارند ($p>0.05$).

در این پژوهش، کمترین MIC (۲۰/۸۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) برای باکتری استرپتوکوکوس موتانس و بیشترین MIC (۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، برای استرپتوکوکوس به دست آمد. مراحل مختلف فنولوژی گیاه نیز اثر معنی‌داری بر خاصیت ضد باکتری اسانس داشت (جدول ۳). حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئیس در تیمار با اسانس مراحل رویشی، گل‌دهی و بذردهی تفاوتی با یکدیگر نداشت، اما برای استرپتوکوکوس پیوژنز و اکتینومایسس ویسکوزوس به ترتیب اسانس مرحله بذردهی و رویشی بیشترین تاثیر بازدارندگی را داشتند. حداقل غلظت اسانس مرحله رویشی جهت بازدارندگی از رشد اکتینومایسس ویسکوزوس، مشابه اثر ستیل پیریدینیوم بود. اسانس حاصل از مراحل گل‌دهی و بذردهی نیز، از نظر حداقل غلظت بازدارندگی از رشد استرپتوکوکوس پیوژنز، اکتینومایسس ویسکوزوس و استرپتوکوکوس سانگوئیس، قابل مقایسه با کلرهگزیدین بودند (جدول ۳).

جدول ۳. مقادیر MIC و MBC (mg/mL) اسانس برگ گیاه مریم گلی مشهدی در مراحل رویشی، گل‌دهی و بذردهی بر باکتری‌های دهانی در مقایسه با دهان‌شویه‌های کلرهگزیدین و ستیل پیریدینیوم.

باکتری / اسانس/ دهان‌شویه	استرپتوکوکوس موتانس		استرپتوکوکوس پیوژنز		استرپتوکوکوس سانگوئیس		اکتینومایسس ویسکوزوس	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
رویشی	۲۰/۸۳ ^{b}	۵۰/۰۰ ^{bc}	۵۰/۰۰ ^{a}	۷۵/۰۰ ^{a}	۲۵/۰۰ ^{b}	۵۰/۰۰ ^{bc}	۱۲/۵۰ ^{c}	۲۹/۱۷ ^{cde}
گل‌دهی	۲۰/۸۳ ^{b}	۴۱/۶۷ ^{bcd}	۲۵/۰۰ ^{b}	۵۰/۰۰ ^{bc}	۲۰/۸۳ ^{b}	۵۸/۳۳ ^{ab}	۲۵/۰۰ ^{b}	۵۸/۳۳ ^{ab}
بذردهی	۲۵/۰۰ ^{b}	۴۱/۶۷ ^{bcd}	۲۵/۰۰ ^{b}	۵۸/۳۳ ^{ab}	۲۵/۰۰ ^{b}	۵۸/۳۳ ^{ab}	۲۵/۰۰ ^{b}	۵۸/۳۳ ^{ab}
کلرهگزیدین	۱/۶۲ ^{d}	۲۵/۰۰ ^{de}	۲۵/۰۰ ^{b}	۷۵/۰۰ ^{a}	۲۵/۰۰ ^{b}	۵۰/۰۰ ^{bc}	۲۵/۰۰ ^{b}	۲۵/۰۰ ^{de}
ستیل پیریدینیوم	۱/۶۲ ^{d}	۱/۶۲ ^{f}	۱/۶۲ ^{d}	۱/۶۲ ^{f}	۱/۶۲ ^{d}	۱/۶۲ ^{f}	۱۲/۵۰ ^{c}	۱۲/۵۰ ^{ef}

میانگین های واجد حداقل یک حرف مشترک، بر اساس آزمون LSD، تفاوت معنی داری ندارند ($p>0.05$).

مشابه نتایج حاصل از بررسی قطر هاله ممانعت از رشد، تعداد کلنی و MIC، باکتری استرپتوکوکوس موتانس با کمترین MBC و استرپتوکوکوس پیوژنز با بیشترین MBC، به ترتیب حساسیت و مقاومت بیشتری به اسانس برگ مریم گلی مشهدی داشتند. بر اساس داده‌های MBC، اثر ضد میکروبی اسانس مرحله رویشی بر اکتینومایسس ویسکوزوس، استرپتوکوکوس سانگوئیس و استرپتوکوکوس پیوژنز قابل مقایسه با کلرهگزیدین بود. اسانس مرحله بذردهی نیز بر روی سه باکتری مورد مطالعه (استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس پیوژنز و استرپتوکوکوس سانگوئیس) تأثیر مشابهی با کلرهگزیدین داشت. علاوه بر این، تأثیر اسانس مراحل گل‌دهی و بذردهی در ممانعت از رشد باکتری استرپتوکوکوس موتانس و اثر اسانس حاصل از سه مرحله رشد و نمو بر استرپتوکوکوس سانگوئیس نیز مانند کلرهگزیدین بود (جدول ۳).

به طور کلی، در تمام روش‌های مورد بررسی، استرپتوکوکوس موتانس حساس‌ترین و استرپتوکوکوس پیوژنز مقاوم‌ترین باکتری‌ها در برابر اسانس بودند. غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اسانس مراحل بذردهی و گل‌دهی بر استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس پیوژنز، اسانس مرحله رویشی بر استرپتوکوکوس سانگوئیس و اسانس هر سه مرحله رشد و نمو بر اکتینومایسس ویسکوزوس، خاصیت ضد باکتریایی مؤثری نشان دادند که در برخی موارد، نسبت به دهان‌شویه‌ها برتری داشت.

بحث

پوسیدگی دندان یکی از مشکلات اصلی و عمده بهداشت عمومی در جهان است. میکروارگانیسم‌های اصلی که در ایجاد پوسیدگی و تشکیل پلاک دندان دخالت دارند، از جنس استرپتوکوکوس هستند که برخی از آن‌ها، نظیر استرپتوکوکوس موتانس با پوسیدگی دندان ارتباط مستقیم دارند، در حالی که برخی مانند استرپتوکوکوس سانگوئیس کمتر مضر هستند [۲۹]. امروزه تمایل رو به رشدی برای استفاده از فرآورده‌های طبیعی گیاهی جهت کنترل و جلوگیری از تشکیل پلاک، پوسیدگی دندان، التهاب لثه، آفت و بوی بد دهان ناشی از عفونت‌های دهانی به وجود آمده و استفاده از اسانس‌ها در این زمینه موفقیت‌آمیز بوده است. بررسی‌های مختلف حاکی از مهار رشد میکروارگانیسم‌ها، در سطح دندان و حفره دهانی، توسط اسانس‌ها و اجزای سازنده آن‌ها است، لذا این ترکیبات به عنوان عوامل نوید بخش در جلوگیری و یا درمان بیماری‌های مربوط به پلاک دندانی مطرح شده‌اند [۴، ۳۰].

نتایج پژوهش حاضر، نشان‌دهنده ممانعت از رشد باکتری‌های مورد مطالعه در اثر اسانس برگ مریم گلی مشهدی بود. تاثیر مثبت اسانس گیاه درخت چای (*Melaleuca alternifolia*) و مرمکی (*Commiphora myrrha*) در ممانعت از رشد باکتری‌های عامل بیماری‌های دهان و دندان مانند استرپتوکوکوس موتانس گزارش شده است [۴]. زمردیان و همکاران خاصیت ضد میکروبی قوی اسانس گیاهان *Satureja khuzestanica*، *Salvia mirzayanii* و *Zataria multiflora* را بر باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئیس نشان دادند [۲۹]. در پژوهش دیگری، دهان‌شویه تهیه شده از عصاره مریم گلی (*S. officinalis*) موجب کاهش تعداد استرپتوکوکوس موتانس در پلاک دندانی شد [۳۱]. اثر ضد میکروبی اسانس برگ اکالیپتوس (*Eucalyptus glubulus*) بر استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس کازئی (*Lactobacillis casei*)، که از عوامل بیماری‌زای دهان می‌باشند، نیز گزارش شده است [۱۰]. اثر باکتریوسایدی قابل ملاحظه اسانس دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*) بر استرپتوکوکوس موتانس [۷] و عصاره *Aristolochia cymbifera* بر استرپتوکوکوس موتانس و لاکتوباسیلوس کازئی [۹] ارائه شده است. طبق یافته‌های Hammer و همکاران (۲۰۰۳) نیز، اسانس درخت چای (*Melaleuca alternifolia*) رشد طیف وسیعی از باکتری‌های دهانی، شامل اکتینومایسس و استرپتوکوکوس‌ها (میتیس، سانگوئیس و موتانس) را مهار نمود [۳۲]. تأثیر مهارکنندگی اسانس برگ *Tetradenia riparia* و *Plectranthus neochilus* بر روی باکتری‌های دهانی از جمله استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئیس نیز مثبت ارزیابی شد [۵، ۳۳].

اسانس‌ها با غشای میکروب‌ها برهم‌کنش دارند و موجب تغییرات فیزیولوژیکی شدیدی در آن‌ها می‌شوند. مکانیسم فعالیت بیولوژیکی اسانس‌ها به ویژگی آبگریز بودن اجزای شیمیایی سازنده آن‌ها، به ویژه مونوترپن‌ها و سزکویی‌ترپن‌ها، مربوط می‌شود. مولکول‌های اسانس، به خاطر چربی‌دوست بودن، به سادگی به غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها نفوذ می‌کنند و با اثر بر سیالیت، نفوذپذیری و یکپارچگی غشای سلول و اندامک‌ها و همچنین تغییر در مسیرهای متابولیکی، منجر به مرگ سلول می‌گردد. علاوه بر این، برهم‌کنش‌های هم‌کردار بین اجزای متعدد موجود در اسانس، می‌تواند موجب افزایش فعالیت بیولوژیکی آن شود [۵، ۳۳].

بر اساس نتایج GC/MS، ترکیبات بتا- پینن، آلفا-مورولول، آلفا-پینن و ۱و۸- سینئول، چهار ترکیب اصلی اسانس مریم گلی مشهدی می‌باشند. بتا-پینن و آلفا-پینن متعلق به گروه مونوترپن‌های هیدروکربنی، ۱و۸- سینئول، از مونوترپن‌های اکسیژن‌دار و آلفا-مورولول، از گروه سزکوئی ترپن‌های اکسیژن‌دار هستند. بر اساس گزارش Rustaiyan و همکاران نیز مونوترپن‌های هیدروکربنی بیشترین مقدار را در اسانس همین گونه گیاهی داشتند و بتا-پینن، ۱و۸- سینئول، آلفا-پینن و

آلفا-کادینن به ترتیب فراوان‌ترین اجزای اسانس بودند [۳۴، ۳۵] . بررسی دیگر نشان داد که مونوترپن‌ها فراوان‌ترین ترکیبات و ۱و۸- سینئول، کامفور، آلفا-پینن و کامفن اجزای اصلی اسانس گیاه مریم گلی مشهدی هستند [۳۶]. تفاوت-های اندکی که در رابطه با اجزای تشکیل دهنده اسانس گیاه مریم گلی مشهدی، میان نتایج بررسی حاضر و پژوهش‌های قبلی مشاهده می‌شود، می‌تواند به طور عمده ناشی از تفاوت در شرایط محیطی و جغرافیایی زیستگاه و تا حدی مربوط به مدت زمان تقطیر و دمای مورد استفاده باشد [۳۶، ۳۷].

به طور کلی، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار، سزکوئی ترپن‌های با وزن مولکولی پایین و مونوترپن‌های هیدروکربنی نوع پینن، ترکیبات شناخته شده‌ای هستند که فعالیت ضد میکروبی دارند [۳۳، ۳۸، ۳۹]. خاصیت ضدباکتریایی برخی از این ترکیبات نظیر ۱ و ۸ - سینئول، توجون، کامفور، آلفا-پینن، بتا-پینن، سابینن و آلفا-ترپینئول، که در اسانس بخش هوایی گیاه مریم گلی مشهدی نیز وجود دارند، تایید شده است [۴۰، ۴۱]. به طور مشابه، فعالیت ضد میکروبی اسانس چند گونه دیگر از مریم گلی، *S. cryptantha*، *S. multicalis*، *S. tomentosa* و *S. ringens* نیز به حضور آلفا-پینن، بورنئول، ۱ و ۸-سینئول و کامفور نسبت داده شده است [۴۲، ۴۳، ۴۴]. Zomorodian و همکاران، اثر ضد میکروبی قوی اسانس گیاه *S. mirzayanii* را که حاوی درصد بالایی از ۱و ۸- سینئول است، بر باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سانگوئیس گزارش کردند [۲۹]. Sonboli و همکاران، هم‌کرداری بین برخی از اجزای سازنده اسانس نظیر لینالول، ۱و۸-سینئول، آلفا پینن، بتا پینن، بتا کاریوفیلن و لیمونن را عامل مهمی در ایجاد خاصیت ضد میکروبی اسانس برخی از گونه-های مریم گلی دانسته‌اند [۴۵]. با توجه به موارد فوق، تأثیر بازدارنده قابل توجه اسانس برگ مریم گلی مشهدی بر باکتری‌های دهانی انتخاب شده در بررسی حاضر، احتمالا به حضور قابل توجه مونوترپن‌هایی نظیر بتا-پینن، آلفا-پینن، ۱و۸- سینئول و سزکویی‌ترپن آلفا-مورولول در آن مربوط است.

مقایسه فعالیت ضد میکروبی اسانس مریم گلی مشهدی در مراحل مختلف رشد و نمو، مؤید اثر قابل قبول اسانس گیاه در بازدارندگی از رشد باکتری‌ها بود که مشابه دهان‌شویه‌ها و مواردی، قویتر از آنها عمل کرد. به خوبی نشان داده شده است که مقدار، نوع و ترکیب اسانس در گیاهان مختلف وابسته به مرحله نموی است و در اغلب موارد، تولید و تجمع اسانس در مرحله گل‌دهی به حداکثر می رسد [۴۶، ۴۷]. نتایج تحقیق حاضر، نشان دهنده تفاوت ترکیبات سازنده اسانس در مراحل مختلف رشد و نمو بود و می توان گفت که کیفیت اسانس، متاثر از فنولوژی این گونه است. منطبق با این نتیجه، گزارش‌های دیگری نیز دال بر تغییر ترکیب اجزای سازنده اسانس در برگ نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) [۴۸، ۴۹]، بومادران بیابانی [۵۰] و مرزنجوش (*Origanum vulgare* subsp. gracile) [۵۱]، همراه با نمو و افزایش سن برگ بوده‌اند.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر نشان داده شد که علاوه بر اسانس برگ گیاه مریم گلی مشهدی در مرحله گل‌دهی، اسانس حاصل از برگ در سایر مراحل فنولوژی گیاه نیز اثر ضد باکتریایی بر باکتری‌های مولد عفونت‌های دهانی-حلقی دارد. بنابراین، یافته‌های این پژوهش، از مزیت کاربرد اسانس‌ها در تهیه و تولید دهان‌شویه‌ها و یا سایر فرآورده‌های مرتبط با بهداشت دهان و دندان حمایت می‌کند و گیاه مریم گلی مشهدی را به عنوان کاندیدای مناسبی در این زمینه جهت ارزیابی‌های بیشتر و دقیق‌تر معرفی می‌نماید.

قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد برای تأمین بودجه این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند. همچنین از زحمات کارکنان آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد، آزمایشگاه مفردات دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و آزمایشگاه میکروب‌شناسی بیمارستان قائم مشهد قدردانی می‌شود.

مراجع

1. Sadeghi-Nejad, B., Moghimipour, E., Yusef-Naanaie, S. and Nezarat, S. (2018), "Antifungal and antibacterial activities of polyherbal toothpaste against oral pathogens, *in vitro",* Current Medical Mycology, 4(2), pp 21-26.

2. Moezzi-ghadim, N., Taghibakhsh, M., Godarzi, H., Liravinezhad hoseini, N., Alirezaei, S. (2018), "Evaluation of the Effect of Four Herbal Extracts on Growth of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*", Journal of Research in Dental and Maxillofacial Sciences, 3(2), pp 7-13.

3. Nam, S.H., Chi, M.S. and Choi, Y.S. (2018), "Antimicrobial effect of aroma essential oils on the oral cavity for the prevention and treatment of inflammatory diseases", Biomedical Research, 29(21), pp 3850-3852.

4. Park, C. and Yoon, H. (2018), "Antimicrobial activity of essential oil against oral strains", International Journal of Clinical Preventive Dentistry, 14(4), pp 216-221.

5. Melo, N.I., Carvalho, C.E., Fracarolli, L., Cunha, W.R., Veneziani, R.C.S., Martins, C.H.G. and Crotti, A.E.M. (2015), "Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria", Brazilian journal of Microbiology**,** 46, pp 519-525.

6. Freires, I.A., Denny, C., Benso, B., Alencar, S.M. and Rosalen, P.L. (2015), "Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review", Molecules, 20, pp 7329-7358.

7. Zainal-Abidin, Z., Mohd-Said, S., Abdul Majid, F.A., Mustapha, W.A.W. and Jantan, I. (2013), "Anti-Bacterial activity of cinnamon oil on oral pathogens", Open Conference Proceedings Journal, 4, pp 12-16.

8. Aguiar, G.P., Carvalho, C.E. and Dias, H.J. (2013), "Antimicrobial activity of selected essential oils against cariogenic bacteria", Natural Product Research, 27, pp 1668-1672.

9. Alviano, D.S. and Alviano, C.S. (2009), "Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases", Current Pharmaceutical Biotechnology, 10, pp 106-121.

10. Amin, M., Abasi-Montazeri, E., Javadi, M., Shahin, F. and Teymuri-Rad, M. (2013), "Evaluation of antimicrobial effect of essential oil of leaves of *Eucalyptus glubulus* methanol base against some of mouth bacteria" Jentashapir, pp 41-47 (In Persian).

11. Fu, Z., Wang, H., Hu, X., Sun, Z. and Han, C. (2013), "The Pharmacological Properties of *Salvia* Essential oils", Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3(7), pp 122-127.

12. Khalil, R. and Li, Zh.G. (2011), "Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria" African Journal of Biotechnology, 10(42), pp 8397-8402.

13. Cardile, V., Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N.A. and Piozzi, F. (2009), "Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia Rubifolia* from Lebanon: chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells", Journal of Ethnopharmacology, 126, pp 265-272.

14. Kivrak, I., Duru, M.E., Ozturk, M., Harmandar, M. and Topcu, G. (2009), "Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*", Food Chemistry, 116, pp 470-479.

15. Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A., Kesdek, M., Kaya, Y. and Kilic, H. (2008), "Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. Ex Benth.", Biochemical Systematics and Ecology, 36, pp 360-368.

16. Salimpour, F., Mazooji, A., Mazhar, F. and Barzin, G. (2014), "Comparative study of antibacterial properties of four species of *Salvia* L. as a medicinal plant", Research in Medicine, 37 (4), pp 205-210 (In Persian).

17. Yadollahi, A., Firouznia, A. and Rajab-Zadeh, G. (2013), "Chemical composition and antibacterial properties of the essential oil of *Salvia Chloroleuca* Rech.F. & Allen in North Khorasan Province" Journal of North Khorasan University of Medical Sciences, 4, pp 69-76 (In Persian).

18. Rechinger, K.H. (1982), "Flora Iranica. Academische Druk und Verlagsantalt", Graz. Pp 150: 582.

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

20. Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H.R., Imenshahidi, M. and Fazly Bazzaz, B.S. (2009), "Review of the pharmacological and toxicological effects of *Salvia leriifolia*", Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 12, pp 1-8.

21. Hosseinzadeh, H. and Imenshahidi, M. (1999), "Effects of aqueous and alcoholic extract of seeds and leaves of *Salvia leriifolia* on viability of rats exposed to hypoxia", Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2, pp 75-78.

22. Farhoosh, R., Purazrang, H., Haddad-Khodaparast, M.H., Rahimizadeh, M. and Seyedi, S.M. (2004), "Extraction and separation of antioxidative compounds from *Salvia leriifolia* leaves" Journal of Agricultural Science and Technology, 6, pp 43-50.

23. Abrishamchi, P., Khaje- Karamadini, M., Houshyar-Sarjami, R., Zaker, A., Asili, J., Porsa, H. and Zarif, R. (2016), "Antibacterial effect of essential oils from *Salvia leriifolia* Benth. against some oral pathogens", Journal of Microbial World, 9(3), pp 215-225.

24. Jaimand, K. and Rezaee, M.B. (2006), "Essential oils, distillation apparatuses, test methods of essential oils and retention indices in essential oil analysis", First edn. Iranian society of Medicinal Plants, 350 Pp. Tehran (In Persian).

25. Baron, E.J. and Finegold, S.M. (1990), *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*. 8th Edition. Mosby, 861 Pp. Saint Louis.

26. Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2007), "Study guide for Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology". 12th edition. Elsevier - Health Sciences Division, 200 pp. Saint Louis.

27. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, (2017), 27th ed. Informational Supplement M100-S27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

28. Eloff, J.N. (1998), "A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria", Planta Medica, 64, pp 711-713.

29. Zomorodian, K., Ghadiri, P., Saharkhiz, M.J., Moein, M.R., Mehriar, P., Bahrani, F., Golzar, T., Pakshir, K. and Fani, M.M. (2015), "Antimicrobial activity of seven essential oils from Iranian aromatic plants against common causes of oral infections" Jundishapur Journal of Microbiology, 8(2), pp 41-47.

30. Vorobets, N.M., Kryvtsova, M.V., Rivis, O.Y., Spivak, M.Y., Yavorska, H.V. and Semenova, H.M. (2018), "Antimicrobial activity of phytoextracts on opportunistic oral bacteria, yeast and bacteria from probiotics", Regulatory Mechanisms in Biosystems, 9(3), pp 374-378.

31. Beheshti-Rouy, M., Azarsina, M., Rezaie-Soufi, L., Alikhani, M.Y., Roshanaie, G. and Komaki, S. (2015), "The antibacterial effect of sage extract *(Salvia officinalis)* mouthwash against *Streptococcus mutans* in dental plaque: a randomized clinical trial" Iranian journal of microbiology, 7(3), pp 173-177.

32. Hammer, K.A., Dry, L., Johnson, M., Michalak, E.M., Carson, C.F. and Riley, T.V. (2003), "Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro", Oral Microbiology and Immunology, 18, pp 389-392.

33. Crevelin, E.J., Caixeta, S.C., Dias, H.J., Groppo, M., Cunha, W.R., Martins, C.H.G. and Crotti, A.E.M. (2015), "Antimicrobial activity of the essential oil of *Plectranthus neochilus* against cariogenic bacteria", Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015:102317.

34. Rustaiyan, A., Masoudi, S., Yari, M., Rabani, M., Motiefar, H.R. and Larijani, K. (2000), "Essential oil of *Salvia leriifolia* Benth.", Journal of Essential Oil Research, 12, pp 601-602.

35. Rustaiyan, A., Shafeghat, A., Masoudi, S., Akhlaghy, H. and Tabatabaei, M. (2007), "Essential oil of *Salvia leriifolia* Benth.", Journal of Essential Oil Bearing Plants, 10, pp 121-126.

36. Monfared, A. and Ghorbanli, M. (2009), "Composition of the essential oils of *Salvia leriifolia* Benth. Growing wild in around of two mine in Iran", Research Journal of Phytochemistry, 4(1), pp 13-17.

37. Miguel, G., Cruz, C., Faleir, M.L., Simo, M.T.F. and Figueired, A.C. (2011), "*Salvia officinalis* L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities", Natural Products Research, 25(5), pp 526–541.

38. Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. (2000), "Antibacterial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils", Journal of Applied Microbiology, 88, pp 308-316.

39. Omidbaigi, R. (2000), "Approaches to production and processing of medicinal plants" 2nd edn. Tarrahan Nashr, pp 286. Tehran. (In Persian)

40. Yousefzadi, M., Sonboli, A., Karimi, F., Ebrahimi, S.N., Asghari, B. and Zeinali, A. (2007), "Antimicrobial activity of some *Salvia* species essential oil", Zeitschrift für Naturforschung C, 62, pp 514 - 518.

41. Carata, C. (1996), "Activity of the oil of *Salvia officinalis* against *Botrytis cinerea*", Journal of Essential Oil Research, 8, pp 399-404.

42. Hazendaroglu, M.Z., Karaby, N.U. and Zeybek, U. (2001), "Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil", Fitoterapia, 72(7), pp 829-831.

43. Tzako, O., Pitarokili, D. and Harvala, C. (2001), "Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Salvia ringens*", Planta Medica, 67, pp 81-83.

44. Tepe, B., Donmez, E. and Unlu, M. (2004), "Antimicrobial and anti-oxidative activities of the essential oils and methanol extract of *Salvia cryptantha* and *Salvia multiculis*", Food Chemistry, 84, pp 519-525.

45. Sonboli, A., Babakhani, B. and Mehrabian, A.R. (2006), "Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*", Zeitschrift für Naturforschung C, 61, pp 160-164.

46. Cneyt, C., irak, J.R.I., Valdimaras, J. and Liudas I. (2007), "Secondary metabolites in *Hypericum perfoliatum*: variation among plant parts and phenological stages", Botanical Helvetica, 117, pp 29-36.

47. Verdian-rizi, M. (2009), "Variation in the essential oil composition of *Laurus nobilis L.* of different growth stages cultivated in Iran", Journal of Basic and Applied Sciences, 5, pp 33-36.

48. Soltani, F., Sharifi, M., Khajeh, K. and Yousefzadi, M. (2009), "Study of essential oil composition, menthone reductase activity and antimicrobial activity of *Mentha piperita* in two stages of growth", Iranian Journal of Biology, 21, pp 62-70 (In Persian).

49. Gershenzon, J., McConkey, M.E. and Croteau, R.B. (2000), "Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint", Plant Physiology, 122. pp 205-213.

50. Aminkhani, A., Sharifi, R., and Dorosti, R. (2019), "Chemical composition and antimicrobial activity of *Achillea tenuifolia* Lam. essential oils at different phenological stages from Khoy", Chemistry and Biodiversity, 16(12), e1900289.

51. Morshedloo, M.R., Mumivand, H., Craker, L.E. and Maggi, F. (2017), "Chemical composition and antioxidant activity of essential oils in *Origanum vulgare* subsp. gracile at different phenologica stages and plant parts" Journal of Food Processing and Preservation, e13516.

2 ndNational Conference on
Bioscience Innovation
and Technology, Iranian Chemistry
دومین کنفرانس ملی نوآوری و فناوری
علوم زیستی و شیمی ایران
www.bc.bcnf.ir
۱۱ تیر ۱۳۹۹- تهران

Phenological changes in chemical composition of essential oils from *Salvia leriifolia* Benth. and its antibacterial activity against some oral pathogens

Parvaneh Abrishamchi[1*], Arehzoo Zaker[2], Reihaneh Houshyar-Sarjami[3], Javad Asili[4], Mehrangiz Khaje- Karamadini[5], Hassan Porsa[6]

1. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. abrisham@um.ac.ir
2. Assistant Professor, Department of Biology, Farhangian University, Tehran, Iran.
3. MSc. Department of Biology, Faculty of science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4. Full Professor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
5. Full Professor, Microbiology and Virology Research Centre, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
6. Research Expert, Department of Pulses, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Salvia leriifolia Benth. (from family Lamiaceae) is a native medicinal plant species of Iran with various pharmacological activities. In this study, chemical composition of essential oils at different stages of *S. leriifolia* growth (vegetative, flowering and seed formation) was analyzed using GC/MS technique. Besides, antibacterial activity of different concentrations of essential oils against some oral pathogens including *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus* were evaluated by agar well diffusion, agar dilution and broth macrodilution methods. Two common mouthwash, chlorhexidine and cetylpyridinium, were used as positive controls. Among 35 compounds, β-pinene, α-muurolol, α-pinene, 1.8-cineole, δ-cadinene and eremolignol were the major components of essential oils. The essential oils of *S. leriifolia*, obtained at different growth stages, significantly inhibited the growth of all bacteria tested. Maximum and minimum inhibitory effect of essential oils was observed for *S. mutans* and *S. pyogenes*, respectively. In most phenological stages, diameter of inhibition zones caused by essential oils were more than that of chlorhexidine and cetylpyridinium. The strongest antibacterial activity was observed by essential oils obtained at flowering and seed formation stages. In most treatments, the MIC value for bacteria was comparable to chlorhexidine, except for *S. mutans*. The bactericidal activity of essential oils was the same at different stages of plant growth stages and was similar to chlorhexidine, in most cases. In conclusion, the essential oils of *S. leriifolia* have the potential to inhibit the growth of oral pathogens and could be a good candidate for the production of natural mouthwashes.

Key words: antibacterial activity, essential oils, oral pathogens, phenology, *Salvia leriifolia*