



Evaluation of the Antimicrobial Effects of Aqueous Extracts of *Ziziphora tenuior* and *Citrus medica* Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria¹

Ramin Mohammadi-Aluocheh

Department of Biology, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran (**Corresponding author**).
ramin.p1363@gmail.com

Farzin Dadoullahi

Department of Biology, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran. ramin@gmail.com

Seyyede Masoumeh Mirnurollahi

Department of Biology, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran. mmirnorollahi@yahoo.com

Masoumeh Mahdavi-Ourtakand

Department of Biology, VaP.C., Islamic Azad University, Varamin, Iran.
masumehmahdavi@gmail.com

Abstract

Purpose: Recently, plant-based extracts have attracted considerable interest as potential substitutes for antibiotics, since their bioactive compounds can effectively combat resistant bacterial pathogens. The present study aimed to investigate the antimicrobial potential of aqueous extracts of *Ziziphora tenuior* and *Citrus medica* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Aqueous extracts were prepared from the plants and antimicrobial activities were evaluated using the disk diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) methods. Furthermore, the possible synergistic antimicrobial effects of the combined extracts at sub-inhibitory concentrations were assessed.

Findings: The results indicated that none of the extracts exhibited inhibitory activity against *E. coli*. However, the *Z. tenuior* extract was effective against *S. aureus*, the diameter of the growth inhibition zone for different concentrations of *Z. tenuior* extract (from 25 to 200 µg/mL) was 18 to 25 mm. The *C. medica* extract showed antimicrobial activity only at 200 µg/mL, with a 10 mm inhibition zone. The MIC values of *Z. tenuior* and *C. medica* extracts against *S. aureus* were determined to be 64 µg/mL and 128 µg/mL, respectively. The combined use of both extracts showed no inhibitory or synergistic effects against either *E. coli* or *S. aureus*.

Conclusions: Overall, these findings suggest that aqueous extracts of *Ziziphora tenuior* and *Citrus medica* possess potential therapeutic value for managing bacterial infections caused by *S. aureus*.

Keywords: antimicrobial activity, aqueous extract, *Ziziphora tenuior*, *Citrus medica*. Gram-Positive Bacteria, Gram-Negative Bacteria.

¹ Received: 2024/07/20; Revised: 2024/09/12 ; Accepted: 2024/11/04 ; Published online: 2025/03/10



بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره آبی گیاهان کاکوتی (*Ziziphora tenuior*) و بالنگ (*Citrus medica*) علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی^۲

رامین محمدی آلوچه

گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (نویسنده مسئول). ramin.p1363@gmail.com

فرزین دادالهی

گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ramin@gmail.com

سیده معصومه میرنوالهی

گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. mmirnorollahi@yahoo.com

معصومه مهدوی اورتاکند

گروه زیست‌شناسی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران. masumehmahdavi@gmail.com

چکیده

هدف: امروزه عصاره‌های گیاهی به دلیل دارا بودن ترکیبات موثره، یکی از منابع درمان عفونت‌های باکتریایی ناشی از مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی هستند. در مطالعه حاضر، خواص ضد میکروبی عصاره آبی گیاهان کاکوتی و بالنگ بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیاکلی بررسی شد. عصاره آبی از گیاهان تهیه شد و سپس اثرات ضد میکروبی آنها به روش دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) مطالعه شد. همچنین اثر ضد میکروبی ترکیبی عصاره‌ها در غلظت تحت مهاری آنها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: براساس نتایج بدست آمده عصاره گیاه کاکوتی و بالنگ هیچ تاثیری بر باکتری اشیریشیاکلی نداشت. عصاره گیاه کاکوتی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس موثر بود و قطر هاله عدم رشد برای غلظت‌های مختلف عصاره کاکوتی (از ۲۵ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ۱۸ تا ۲۵ میلی‌متر بدست آمد. گیاه بالنگ فقط در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر این باکتری موثر و قطر هاله عدم رشد آن ۱۰ میلی‌متر بود. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره کاکوتی و بالنگ بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۶۴ و ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. نتایج بررسی اثر ترکیبی عصاره‌های گیاهی نشان داد که ترکیب عصاره‌های گیاهی در غلظت تحت مهاری آنها، روی اشیریشیاکلی و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بی‌تاثیر است. بنابراین، ترکیب این دو عصاره بر یکدیگر اثرات هم‌افزایی و سینرژیک ندارد.

نتیجه‌گیری: عصاره آبی گیاه کاکوتی و بالنگ در درمان عفونت‌های باکتریایی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس موثر است. **کلیدواژه‌ها:** اثر ضد میکروبی، عصاره آبی، کاکوتی، بالنگ، باکتری‌های گرم مثبت، باکتری‌های گرم منفی، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس.

^۲ تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۳۰ ؛ تاریخ اصلاح: ۱۴۰۳/۰۶/۲۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۴ ؛ تاریخ انتشار آنلاین: ۱۴۰۴/۰۱/۱۰

مقدمه

افزایش روزافزون مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به یکی از مهم‌ترین چالش‌های درمانی در سراسر جهان تبدیل شده است (۱). استفاده بی‌رویه از داروهای شیمیایی و بروز سویه‌های مقاوم، نه تنها درمان عفونت‌های شایع را دشوار ساخته، بلکه باعث گسترش آلودگی‌های زیست محیطی نیز شده است. از این رو، امروزه تمرکز پژوهش‌های زیست‌پزشکی بر استفاده از منابع طبیعی، به ویژه عصاره‌های گیاهی، به عنوان جایگزین‌های ایمن و مؤثر برای ترکیبات سنتتیک افزایش یافته و اغلب اعتقاد بر این است که گیاهان ایمن‌تر از داروهای سنتزی بوده و فاقد اثرات جانبی می‌باشند (۲-۳). در سال‌های اخیر عصاره‌های گیاهی متنوعی به عنوان عوامل ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از گیاهانی که استفاده دارویی فراوانی دارد، گیاه بالنگ (*Citrus medica* L.) از تیره Rutaceae است. این گیاه، درختی کوچک یا درختچه‌ای بزرگ با خارهای کوتاه، برگ‌های بزرگ به طول ۱۰-۱۸ سانتیمتر، گل‌های پانیکولی به عرض ۲/۵ سانتیمتر یا بیشتر، گلبرگ‌های نوک کند، میوه بیضوی یا مستطیلی به طول ۱۵ تا ۲۵ سانتیمتر است (۴). فلاونوئیدهای موجود در عصاره متانولی پوست مرکبات به عنوان عامل ضد میکروبی شناخته شده‌اند. پوست میوه بالنگ حاوی سیترونال، ترپن‌ها، آلدئیدها، کتون‌ها، استرها، الکل‌ها و اسیدهای آلی می‌باشد. لیمونن اثرات ضد میکروبی دارد و همچنین ژرانیول و سایر مونوترپن‌های موجود در عصاره پوست میوه بالنگ، دارای خاصیت ضد سرطانی است (۵). کاکوتی (*Ziziphora tenuior* L.) گیاهی علفی یک‌ساله و متعلق به خانواده Lamiaceae است که عمدتاً در مناطق کوهستانی رشد می‌کند. ارتفاع گیاه ۳ تا ۴۰ سانتیمتر، ساقه منفرد یا از پایین منشعب و پوشیده از کرک، برگ‌های سرنیزه‌ای پهن، سرنیزه‌ای باریک تا خطی و بلندتر از گل‌ها، گل آذین سنبله‌ای بلند، میوه فندقه به طول ۲ و عرض ۰/۸ میلیمتر است (۶). براساس گزارش‌های موجود، این گیاه از نظر ترکیباتی نظیر استرول‌ها، اسیدهای چرب و فلاونوئیدها بسیار غنی بوده و اثرات ضد میکروبی اسانس این گیاه در مطالعات متعددی بررسی و تایید شده است. مواد مؤثره این گیاه در داروسازی کاربرد فراوانی دارد (۷). بسیاری از ترکیبات مؤثره گیاهان گرچه به تنهایی فعالیت ضد باکتریایی دارند، اما امکان استفاده از آنها در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر ترکیبات گیاهی به منظور اثربخشی بیشتر وجود دارد (۸). با توجه به گرایش فزاینده‌ای که برای استفاده از فرآورده‌های گیاهی در درمان بیماری‌ها مشاهده می‌گردد، پژوهش حاضر با هدف بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های آبی گیاهان کاکوتی (*Ziziphora tenuior*) و بالنگ (*Citrus medica*) به صورت منفرد و سینرژیک، علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* انجام شد.

مواد و روش‌ها

استخراج عصاره‌های گیاهی

در این پژوهش، گیاهان بالنگ و کاکوتی از مرکز تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه شدند. پس از شناسایی توسط منابع گیاه‌شناسی، مواد زائد از گیاهان جداسازی و اندام هوایی گیاه کاکوتی و پوست میوه گیاه بالنگ در جریان هوا خشک شدند. بخش‌های گیاهی خشک شده با استفاده از آسیاب برقی با الک دارای منافذ به قطر دو میلیمتر به طور کامل و یکنواخت خرد و در داخل ظروف شیشه‌ای نگهداری شدند. برای استخراج عصاره از گیاهان، از دستگاه سوکسله استفاده گردید. در این روش، ابتدا ۴۰ گرم از هر گیاه خرد شده به صورت مجزا تهیه شده و سپس درون کارتوش (یک کاغذ صافی به شکل یک



لوله ته بسته آماده) قرار گرفته و به آرامی داخل محفظه سوکسله قرار داده شد. در مرحله بعد، ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر به فلاسک ته گرد افزوده شده و سپس سوکسله و مبرد روی فلاسک نصب شد. پس از گذشت ۳ ساعت از آغاز عمل عصاره گیری، عمل استخراج به پایان رسید. در این زمان حرارت قطع شده و به سیستم اجازه داده شد تا کمی خنک شود تا همه بخارات در مبرد سرد شده و به فاز مایع وارد شوند. در مرحله بعد، ۲۰۰ میلی لیتر محلول داخل بالن باقی ماند که پس از خارج نمودن عصاره از داخل فلاسک، از دستگاه روتاری برای جداسازی مواد زائد از عصاره و تغلیظ آن استفاده شد. در انتها، یک گرم از رسوب خشک حاصل به ۵ سی سی حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) افزوده شد و سپس توسط سرنگ میلی پور با فیلترهایی به قطر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. در نهایت، عصاره ها در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در شیشه های تیره رنگ نگهداری شد.

تهیه سویه های استاندارد باکتری های گرم مثبت و گرم منفی

نمونه های باکتریایی مورد مطالعه در این تحقیق شامل *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) بود که به صورت لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی ایران در انستیتو پاستور خریداری شد. برای حفظ و نگهداری سویه ها تا زمان استفاده، در شرایط ایزوله و در محیط آگار، در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های گیاهی به روش دیسک دیفیوژن

جهت بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره ها، از روش تعیین حساسیت باکتری با استفاده از دیسک های بلانک استفاده گردید. به این منظور حجم های یکسانی از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده تا در طول موج ۵۳۰ نانومتر سطح جذبی معادل ۰/۵ مک فارلند را شکل دهد. باکتری های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* ابتدا کشت چمنی داده شدند و پس از آن، پاساژهای مرتب انجام گرفت. یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری های خالص شده به صورت چمنی در سطح پلیت حاوی محیط مولر هیتون آگار کشت و سپس دیسک های بلانک بر روی سطح پلیت آلوده به باکتری قرار داده شد. عصاره های گیاهی در غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر با استفاده از دی متیل سولفوکساید (DMSO) ۵ درصد تهیه شدند و مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره ها روی دیسک ها ریخته شد. قطر هاله عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد اندازه گیری گردید. دیسک آنتی بیوتیکی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و هر آزمایش با سه تکرار انجام گرفت.

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره های گیاهی به روش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

این بررسی به روش میکرو دیلوشن براث انجام شد. در این روش از میکرو پلیت ۹۶ خانه ای استفاده گردید. محلول استوک عصاره در DMSO تهیه شد. سریال های از رقت ها با دو برابر شدن غلظت در محیط مولر هیتون براث تهیه شد (برای هر عصاره ده رقت سریال بین ۲ تا ۱۰۲۴ میکروگرم بر میلی لیتر). سپس، دو میلی لیتر از هر یک از رقت ها به صورت جداگانه به ۱۸ میلی لیتر محیط مولر هیتون آگار استریل سرد شده، تا ۵۰ درجه سانتیگراد اضافه شد و در پلیت هایی با قطر ۸ سانتیمتر ریخته شد. سوسپانسیون میکروبی که با نیم مک فارلند برابر شده بود، به وسیله محیط کشت مولر هیتون براث به میزان ۱/۱۰۰، جهت به دست آوردن تعداد $10^6 \times 1$ CFU/ml رقیق شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک افزوده شد، در این آزمون به منظور کنترل محیط کشت، از محیط کشت خالی (بدون عصاره و سوسپانسیون میکروبی) استفاده گردید. به منظور کنترل زمینه از عصاره و محیط کشت (بدون سوسپانسیون میکروبی) استفاده شد. یک چاهک هم به منزله کنترل

DMSO (محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی به همراه DMSO ۵ درصد) در نظر گرفت شد. همچنین سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت بدون عصاره به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. حجم نهایی تمام چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. میکروپلیت‌ها بر روی شیکر ۲۵۰ rpm به مدت ۱ دقیقه قرار داده شد، تا مخلوط کاملاً یکنواخت گردد. سپس میکروپلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰-۲۴ ساعت، انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت وجود کدورت (در مقایسه با ردیف کنترل) حاکی از رشد باکتری و شفافیت، نشان دهنده عدم رشد باکتری می‌باشد. پایین‌ترین غلظتی که در آن هیچ‌گونه رشد باکتری مشاهده نشد و فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری بود، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. تمام مراحل برای هریک از عصاره‌ها با ۳ بار تکرار روی دو سویه مورد مطالعه انجام شد.

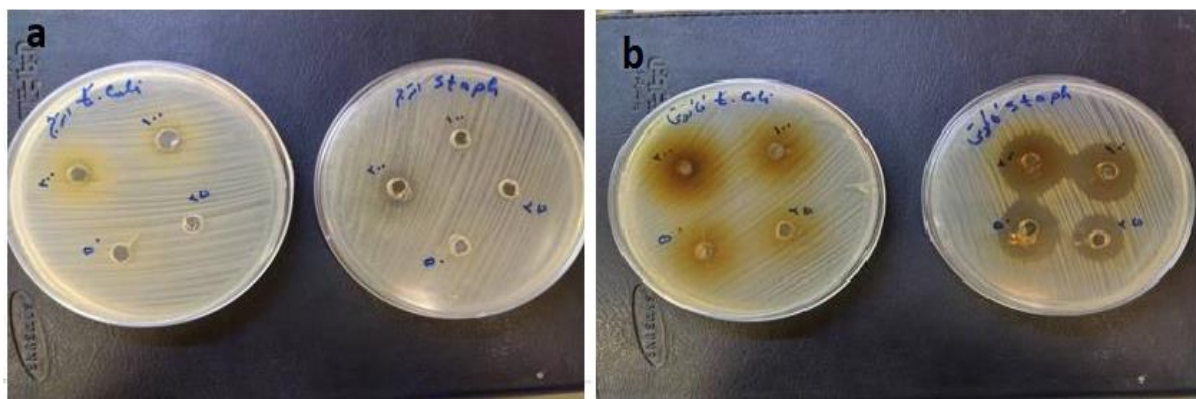
بررسی اثر ترکیبی عصاره‌های گیاهی

برای تعیین اثر هم افزایی و ترکیبی بین عصاره‌ها از روش انتشار استفاده شد. برای این منظور از غلظت تحت مهاری (Sub-MIC) عصاره‌ها استفاده شد. غلظت تحت مهاری عصاره با رقت 1/2MIC عصاره تهیه شد. سوسپانسیون باکتریایی با غلظت معادل نیم مک فارلند روی محیط مولر هیتون آگار کشت و دیسک‌های بلانک روی آن قرار گرفتند. مقدار ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های تحت مهاری عصاره‌ها روی دیسک‌ها ریخته شد و قطر هاله عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها

نتایج بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی به روش دیسک دیفیوژن

نتایج بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های مورد مطالعه به روش دیسک دیفیوژن نشان داد که ۲۴ ساعت بعد از تیمار، عصاره گیاهان کاکوتی و بالنگ هیچ تاثیری بر رشد باکتری اشرشیاکلی نداشتند (تصویر ۱). یافته‌ها نشان داد که عصاره گیاه کاکوتی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس موثر بوده و قطر هاله عدم رشد برای غلظت‌های مختلف عصاره کاکوتی (از ۲۵ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ۱۸ تا ۲۵ میلی‌متر بدست آمد و گیاه بالنگ فقط در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر این باکتری موثر و قطر هاله عدم رشد آن ۱۰ میلی‌متر بود (جدول ۱). براساس نتایج بدست آمده، اثر ضد میکروبی عصاره گیاهان مورد مطالعه علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با افزایش غلظت آنها، افزایش یافته و قطر هاله عدم رشد این باکتری افزایش می‌یابد. این مطالعه نشان داد که غلظت و نوع عصاره و نیز نوع باکتری بر میزان اثر ضد میکروبی ترکیبات مورد بررسی نقش مهمی دارد.





تصویر ۱- تصویر بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه بالنگ (a) کاکوتی (b) در غلظت‌های مختلف به روش دیسک دیفیوژن

جدول ۱- نتایج قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) دو سویه باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت‌های مختلف عصاره گیاهان کاکوتی و بالنگ

غلظت عصاره ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
۲۵	–	۱۸
۵۰	–	۲۰
۱۰۰	–	۲۵
۲۰۰	–	۲۵
۲۵	–	–
۵۰	–	–
۱۰۰	–	–
۲۰۰	–	۱۰

نتایج بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی به روش حداقل غلظت بازدارندگی و در ترکیب با یکدیگر حداقل غلظت بازدارنده عصاره‌های گیاهی برای باکتری‌های مورد مطالعه به روش میکرو دیالوژن برآورد شد. در چاهک‌های کنترل محیط کشت، کنترل زمینه، کنترل DMSO هیچ کدورتی مشاهده نشد. چاهک کنترل مثبت کدر بود که حاکی از رشد باکتری‌ها می‌باشد. نتایج MIC عصاره‌های گیاهی برای دو سویه استاندارد در جدول (۲) نشان داده شده است. نتایج نشان داد که عصاره گیاه کاکوتی و بالنگ ۲۴ ساعت بعد از تیمار، هیچ تاثیری بر باکتری اشرشیاکلی نداشت. در حالی که عصاره‌های گیاه کاکوتی و بالنگ روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس موثر بود و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) آن به ترتیب ۶۴ و ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. همچنین نتایج بررسی اثر ترکیبی عصاره‌های گیاهی نشان داد که ترکیب غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی در غلظت تحت مهاری آنها، روی اشرشیاکلی و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بی‌تاثیر است. بنابراین، ترکیب این دو عصاره بر یکدیگر اثرات هم‌افزایی و سینرژیک ندارد (تصویر ۲).

جدول ۲- نتایج MIC عصاره‌های گیاهی علیه دو سویه باکتری مورد مطالعه

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
عصاره کاکوتی	–	۶۴
عصاره بالنگ	–	۱۲۸



تصویر ۲- نتایج بررسی اثر ترکیبی عصاره‌های گیاهی کاکوتی و بالنگ در غلظت تحت مهاری

بحث

از آنجایی که مقاومت باکتریایی در حال افزایش است و انتقال مقاومت از باکتری‌های مقاوم به سویه‌های حساس از روش‌های مختلف و به آسانی صورت می‌گیرد که موجب مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی معمول می‌گردد، مشتقات گیاهان دارویی با خواص ضد میکروبی می‌توانند به عنوان ترکیب جایگزین یا مکمل در درمان عفونت‌های باکتریایی کاربرد زیادی داشته باشند. با توجه به مشکلات ناشی از ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در درمان عفونت‌ها، توجه خاص برای حل این موضوع ضروری به نظر می‌رسد (۹). گیاهان دارویی با دارا بودن ترکیبات فعال ثانویه مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و فنولیک‌ها، از دیرباز به عنوان منبعی ارزشمند برای درمان بیماری‌های عفونی مورد استفاده بوده‌اند (۱۰). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بسیاری از این ترکیبات قادرند رشد و تکثیر باکتری‌های پاتوژن را از طریق تخریب دیواره سلولی، مهار سنتز پروتئین یا غیرفعال‌سازی آنزیم‌های حیاتی متوقف کنند و جایگزین مؤثری برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی باشند (۱۱). در سال‌های اخیر مطالعات متعددی اثرات ضد میکروبی گیاهانی را علیه باکتری‌های پاتوژن انسانی از جمله *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* گزارش کرده‌اند. بر همین اساس مطالعه حاضر به بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره آبی گیاه کاکوتی و بالنگ بر علیه باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس پرداخته است. نتایج نشان داد عصاره‌های آبی تنها علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اثر بازدارندگی رشد داشته و علیه باکتری اشریشیاکلی تاثیری نداشت. همچنین عصاره کاکوتی اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به بالنگ علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد و در هر چهار غلظت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به روش دیسک دیفیوژن بر باکتری گرم مثبت بررسی شده موثر بود. در حالی که عصاره گیاه بالنگ تنها در غلظت ۲۰۰، مانع از رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شد و در غلظت‌های پایین‌تر تاثیری نشان نداد. دلیل اصلی این مساله را می‌توان در میزان کمتر خواص ضد میکروبی عصاره‌های آبی در مقایسه با عصاره‌های اتانولی و متانولی جستجو نمود که در عصاره‌های آبی غلظت کمتر ماده موثره گیاهان یافت می‌شود (۱۲). همچنین در تفسیر نتایج بدست آمده در مورد اثربخشی عصاره آبی بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌توان استدلال کرد که باکتری‌های گرم منفی مانند اشریشیاکلی به علت داشتن دیواره لیپوپلی ساکاریدی خارجی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت از جمله



استافیلوکوکوس اورئوس نشست مواد سلولی کمتری از خود نشان می‌دهند و در نتیجه مقاومت بیشتری نسبت به عوامل خارجی تهدیدکننده دارند (۱۳). همچنین آسیب‌پذیری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با *E. coli* در یک مطالعه دیگری نیز تایید شده که با یافته‌های پژوهش حاضر همسو است. سطح *E. coli* دارای یک لایه لیپوپلی ساکارید بیرونی ضخیم است، در حالی که *S. aureus* دارای ساختار لایه مونوپتیدی است، به همین دلیل باکتری‌های گرم منفی دارای دو لایه لیپیدی هستند که محافظت بیشتری در برابر ترکیبات ضد میکروبی ایجاد می‌کند (۱۴). همچنین ذکر این نکته ضروری است که در نتایج مطالعه حاضر مشاهده شد در غلظت‌های بالاتر اثر بازدارندگی رشد باکتری‌ها بهتر صورت می‌گیرد که در توجیه این نکته می‌توان گفت ترکیبات موثره گیاهان در غلظت بالا قادر به آزاد کردن الکترون‌ها و در نتیجه توقف واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد می‌شود. همچنین در غلظت‌های بالاتر عصاره‌های گیاهی، ترکیبات لیپوفیل از غشای سیتوپلاسم عبور کرده و ساختار لایه‌های متفاوت پلی ساکاریدی، اسیدهای چرب و فسفولیپیدی آن را به هم ریخته و مختل نموده و آنها را نفوذپذیر می‌کند (۱۵). عصاره‌های گیاهی می‌توانند سیتوپلاسم را کواگوله کرده و به پروتئین‌ها و لیپیدها آسیب وارد کنند. آسیب به دیواره سلولی و غشای سلولی منجر به نفوذپذیری ماکرومولکول‌ها می‌شوند. عصاره‌های گیاهی واکنش‌های زنجیره‌ای دیواره سلولی یا غشای بیرونی سلول، کل سلول را مورد حمله قرار داده، از غشای ارگانل‌هایی مانند میتوکندری عبور می‌کند (۱۶). نتایج نشان داد که عصاره گیاه کاکوتی و بالنگ ۲۴ ساعت بعد از تیمار، هیچ تاثیری بر باکتری اشیریشیاکلی نداشت. در حالی که عصاره‌های مورد مطالعه روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس موثر بود و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) آنها به ترتیب ۶۴ و ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. آلامول و شجاعی‌مهر^۳ فعالیت آنتی باکتریایی عصاره‌های الکلی و آبی بالنگ را روی ده پاتوزن انسانی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان داد این گیاه دارای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی قابل توجهی است و اثر بازدارندگی بر رشد عصاره آبی این گیاه علیه باکتری‌های اشیریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است (۱۷). این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر اندکی تفاوت دارد که از دلایل آن می‌توان به عوامل مختلفی مانند شرایط آزمایش، متدهای آزمون و شرایط کشت اشاره نمود. حاتمی (۲۰۲۴) در مطالعه‌ای نشان داد که عصاره‌های برگ کاکوتی سرشار از پولگون و سایر منوترپن‌های زیست فعال هستند. همچنین دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی قوی می‌باشند. این مطالعه نشان داد عصاره گیاه کاکوتی فعالیت مهارکننده قابل توجهی در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارد که با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر همسو است (۱۸).

نتیجه‌گیری

بررسی گیاهانی که دارای ترکیبات فعال زیستی هستند، می‌تواند مسیر تازه‌ای برای شناسایی عوامل ضد میکروبی ایمن، مؤثر و زیست سازگار فراهم سازد. در این راستا، هدف پژوهش حاضر تعیین توان مهار رشد باکتری‌هایی مانند *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* توسط عصاره‌های گیاهان، ارزیابی غلظت‌های مؤثر و مقایسه میزان بازدارندگی هر گیاه به صورت منفرد و سینرژیک، به منظور شناسایی گزینه‌های طبیعی در کنترل آلودگی‌های میکروبی بوده است. یافته‌های این تحقیق نشان داد که از عصاره آبی گیاهان کاکوتی و بالنگ می‌توان در درمان عفونت‌های باکتریایی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس استفاده نمود. نتایج حاصل می‌تواند مبنایی علمی برای توسعه فرآورده‌های گیاهی ضد میکروبی در صنایع دارویی،

³ Alamholo & Shojaemehr



بهداشتی و نیز در مدیریت آلودگی‌های محیطی و بیمارستانی باشد و گامی در جهت کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی و مهار روند فزاینده مقاومت میکروبی تلقی گردد.

References

1. World Health Organization. *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022*. World Health Organization; 2022.
2. Wang L, Li T, Wu C, Fan G, Zhou D & Li X. Unlocking the potential of plant polyphenols: advances in extraction, antibacterial mechanisms, and future applications. *Food science and biotechnology*. 2025; 34(6):1235-59.
3. Álvarez-Martínez FJ, Barrajón-Catalán E, Herranz-López M & Micol V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*. 2021; 90:153626.
4. Vahidi R, Pourahmad R & Mahmoudi R. Chemical compounds and antibacterial and antioxidant properties of citron (*Citrus medica* L.) peel essential oil. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*. 2019; 2(1):71-6.
5. Dahan A, Yarmolinsky L, Nakonechny F, Semenova O, Khalfin B & Ben-Shabat S. Etrog Citron (*Citrus medica*) as a Novel Source of Antimicrobial Agents: Overview of Its Bioactive Phytochemicals and Delivery Approaches. *Pharmaceutics*. 2025;17(6):761.
6. Anzabi Y & Khaki A. Antibacterial Activity of Ziziphora Tenuior Lam. Extract and Essential Oil against Bacteria Isolated from Urogenital Tract Infections. *Medical Laboratory Journal*. 2016;10(6).
7. Ilhan M, Gürbüz P, Süntar İ. An Updated Review on Ziziphora L.: A Valuable Source of Phytoconstituents for Potential Health Benefits. *Records of Natural Products*. 2025; 2(19).
8. Mohammadi-Aloucheh R, Habibi-Yangjeh A, Bayrami A, Latifi-Navid S & Asadi A. Green synthesis of ZnO and ZnO/CuO nanocomposites in *Mentha longifolia* leaf extract: characterization and their application as anti-bacterial agents. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 2018; 29(16):13596-605.
9. Tan JB & Lim YY. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food chemistry*. 2015; 172: 814-22.
10. Benedetto N, Carlucci V, Faraone I, Lela L, Ponticelli M, Russo D, Mangieri C, Tzvetkov NT & Milella L. An insight into *citrus medica* linn.: a systematic review on phytochemical profile and biological activities. *Plants*. 2023;12(12): 2267.
11. Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, Albayrak S. Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices in Turkey. *Journal of Food Biochemistry*. 2012; 36(5): 547-54.
12. Adham AN. Phytochemical analysis and evaluation antibacterial activity of *Citrus medica* peel and juice growing in Kurdistan/Iraq. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015; 5(10):136-41.
13. Jayaram S, Sarojini S, Anand SB, Raj AA, Parakadan A, Philip I & Biswas S. Citrus for wellness: Exploring the bioactive properties of *Citrus medica* fruit peel with emphasis on its anticancer, antioxidant, antimicrobial and anthelmintic properties. *Plant Sci Today*. 2024;11: 616-25.
14. Benedetto N, Carlucci V, Faraone I, Lela L, Ponticelli M, Russo D, Mangieri C, Tzvetkov NT & Milella L. An insight into *citrus medica* linn.: a systematic review on phytochemical profile and biological activities. *Plants*. 2023;12(12): 2267.



15. Jayaram S, Sarojini S, Anand SB, Raj AA, Parakadan A, Philip I & Biswas S. Citrus for wellness: Exploring the bioactive properties of Citrus medica fruit peel with emphasis on its anticancer, antioxidant, antimicrobial and anthelmintic properties. *Plant Sci Today*. 2024; 11:616-25.
16. Yong AL, Ooh KF, Ong HC, Chai TT & Wong FC. Investigation of antibacterial mechanism and identification of bacterial protein targets mediated by antibacterial medicinal plant extracts. *Food chemistry*. 2015; 186: 32-6.
17. Shojaemehr M & Alamholo M. Antibacterial Activity of Alcoholic and Aqueous Extracts of Various Organs of Citrus medica on 10 Human Pathogenic in Vitro. *Iran J Med Microbiol*. 2019; 13(4): 310-320
18. Hatami A. Phytochemical characterisation of dichloromethane and methanolic extracts of the Ziziphora tenuior leaves and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Natural Product Research*. 2024:1-8.